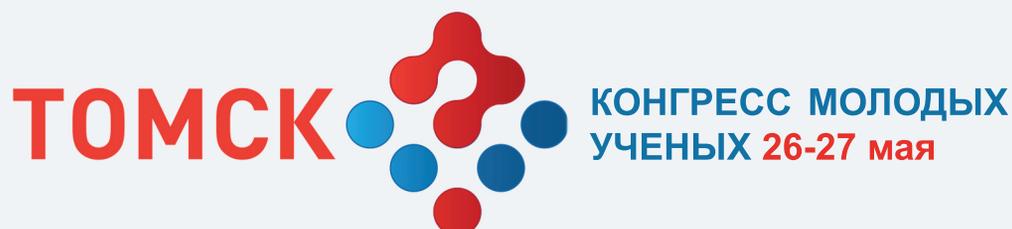


ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Сборник материалов Конгресса молодых ученых

26 - 27 мая 2022 г.



ТОМСКИЙ НИМЦ

ТОМСК

ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Сборник материалов конгресса молодых ученых
26–27 мая 2022 г.



Издательство Томского университета
2022

ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК: 616
ББК: 5

Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 26–27 мая 2022 г. [Электронный ресурс] / под ред. В.А. Степанова, Е.Л. Чойнзонова, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.В. Жданова, М.И. Бессоновой; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2022. – 395 с. – URL: http://tntmc.ru/upload/publications/proceedings/2022_young.pdf

ISBN 978-5-7511-2645-2

Сборник содержит материалы конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» и отражает основные достижения исследований молодых специалистов разных уровней – от студентов, практических врачей до докторов наук. Материалы, вошедшие в сборник, отличаются междисциплинарным характером. В нем представлены научные статьи онкологов, кардиологов, медицинских генетиков, психиатров, фармакологов, радиологов, молекулярных биологов, химиков, физиков и специалистов смежных областей. Для исследователей в области как фундаментальной, так и клинической медицины.

УДК: 616
ББК: 5

Рецензенты:

проф. Н.В. Чердынцева, к.б.н. М.К. Ибрагимова, д.м.н. В.В. Рябов,
д.м.н. Бощенко А.А., к.м.н. А.В. Мочула, проф. Т.П. Ветлугина,
д.м.н. Симуткин Г.Г., д.м.н. Федоренко О.Ю., проф. А.Н. Кучер,
д.б.н. С.А. Васильев, к.б.н. Н.П. Бабушкина, проф. В.В. Удут,
проф. Г.Н. Зюзьков.

ISBN 978-5-7511-2645-2

Издание посвящено юбилею Российской академии наук

©Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, 2022

©Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 2022

TOMSK NATIONAL RESEARCH MEDICAL CENTER
OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

PROCEEDINGS
OF THE CONFERENCE OF YOUNG SCIENTISTS

CURRENT ISSUES OF BASIC AND CLINICAL MEDICINE

26–27 MAI 2022



Publishing house of Tomsk University
2022

TOMSK NATIONAL
RESEARCH MEDICAL CENTER
OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

UDC: 616
LLC: 5

Current issues in basic and clinical medicine: proceedings of the conference of young scientists, Mai 26–27, 2022 [Electronic resource] / ed. by V.A. Stepanov, E.L. Choinzonov, S.V. Popov, N.A. Bohan, V.V. Zhdanov, M.I. Bessonova; Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. – Tomsk: Publishing house of Tomsk University, 2020. – 395 p. – URL: http://tnimc.ru/upload/publications/proceedings/2020_young.pdf

ISBN 978-5-7511-2612-4

The Proceedings contain the papers presented at the Conference of Young Scientists and describe achievements of young researches in the field of basic and clinical medicine. The conference is distinguished by its interdisciplinary approach. The Proceeding provide the papers of oncologists, cardiologists, medical geneticists, psychiatrists, pharmacologists, radiologists, molecular biologists, chemists, physicists and specialists in related fields.

UDC: 616
LLC: 5

Reviewers:

prof. N.V. Cherdynseva; M.K. Ibragimova, PhD; V.V. Ryabov, D.Sc.; A.A. Boshchenko, D.Sc.;
A.V. Mochula, Ph.D.; prof. T.P. Vetlugina, G.G. Simutkin, D.Sc.; O.Yu. Fedorenko, D.Sc.;
prof. A.N. Kucher; S.A. Vasilyev, D.Sc.; N.P. Babushkina, PhD; prof. V.V. Udut; prof. G.N. Zyuzkov.

ISBN 978-5-7511-2612-4

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА И ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИОННО-СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ПРЕЭКЛАМПСИИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ ДЕЦИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ

**А.А. Бабовская¹, Е.А. Трифонова^{1,2}, В.Н. Сереброва¹, М.Г. Сваровская^{1,2},
А.А. Зарубин¹, Л.В. Рычкова³, В.А. Степанов¹**

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального
исследовательского медицинского центра, г. Томск, Россия¹

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия³

Аннотация

К настоящему времени исследования в области популяционной транскриптомики сосредоточены на характеристике паттернов транскриптома опухолевых клеток и тканей, тогда как нарушения со стороны репродуктивной системы остаются малоизучены с этой точки зрения. В данной работе исследована популяционная дифференциация транскриптома профиля децидуальных клеток плаценты при преэклампсии. По данным полнотранскриптома профилирования выявлены дифференциально-экспрессирующиеся гены (ДЭГ) между представителями монголоидной и европеоидной популяций, выполнена их функциональная аннотация. Построена сеть белок-белковых взаимодействий продуктов идентифицированных ДЭГ, в которой выделены наиболее функционально-активные гены (hub genes). Результаты проведенного анализа демонстрируют вовлеченность путей системы иммунного ответа в наблюдаемые различия по уровням экспрессии генов среди изученных популяций.

Ключевые слова: RNA-seq, транскриптом, популяции, плацента, преэклампсия.

IDENTIFICATION OF POPULATION-SPECIFIC MARKERS OF PREECLAMPSIA USING WHOLE-TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF PLACENTAL DECIDUAL CELLS

**A.A. Babovskaya¹, E.A. Trifonova^{1,2}, V.N. Serebrova¹, M.G. Svarovskaya^{1,2},
A.A. Zarubin¹, L.V. Rychkova³, V.A. Stepanov¹**

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia¹

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia³

Abstract

To date, studies in the field of population transcriptomics have focused on the characterization patterns of tumor transcriptome, while disorders of the reproductive system remain poorly understood. In this work, we studied the population differentiation of the transcriptomic profile of placental decidual cells in preeclampsia. According to full transcriptome profiling were identified differentially expressed genes (DEGs) between representatives of the Mongoloid and Caucasoid populations and was performed their functional annotation. Has been constructed a network of protein-protein interactions of the identified DEGs and have been identified the most functionally active genes (hub genes) for this network. The results of the performed analysis demonstrate the involvement of immune response pathways in the observed differences in gene expression levels among the studied populations.

Key words: RNA-seq, transcriptome, populations, placenta, preeclampsia.

Введение

Понимание процессов регуляции экспрессии генов на популяционном уровне имеет фундаментальное значение, как для биомедицинских исследований, так и для эволюционной биологии. После первоначальных работ, основанных на анализе вариабельности транскриптома с помощью микрочипов [1; 2], динамическое развитие высокопроизводительных методов секвенирования (NGS) привело к ряду исследований, в которых помимо подтверждения популяционных различий в уровне экспрессии значительного числа генов также делается упор на анализ механизмов, лежащих в основе этих различий. Однако до настоящего времени в литературе встречаются лишь единичные работы, связанные с анализом популяционной транскриптомики при какой-либо патологии, а интерес всех описанных экспериментов с подобным дизайном сосредоточен в области онкогенетики [3; 4] и совсем не затрагивает заболевания репродуктивной системы. В связи с этим, актуальной проблемой становится изучение преэклампсии (ПЭ) – тяжелого акушерского осложнения, выступающего ведущей причиной материнской и неонатальной заболеваемости и смертности во всем мире [5]. Преэклампсия является одной из патологий, для которой была показана расовая и популяционная дифференциация в частоте встречаемости. Важным патогенетическим звеном ПЭ являются нарушения в процессе трансформации стромальных клеток плаценты в децидуальные клетки (ДК) и формирование децидуальной оболочки [6]. Децидуализация клеток эндометрия вызывает глубокие изменения профиля экспрессии их генов и секреции биоактивных медиаторов, действующих на всех этапах ремоделирования плаценты. В этом контексте анализ дифференциально-экспрессирующихся генов (ДЭГ) на уровне транскриптома децидуальных клеток (ДК) представителей разных популяций позволит идентифицировать возможные ключевые патогенетические пути и специфические биомаркеры ПЭ. Целью данной работы явился поиск популяционно-специфичных маркеров тяжелой формы ПЭ с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (RNA-seq), а также аннотация их возможной роли в патогенезе ПЭ.

Материал и методы

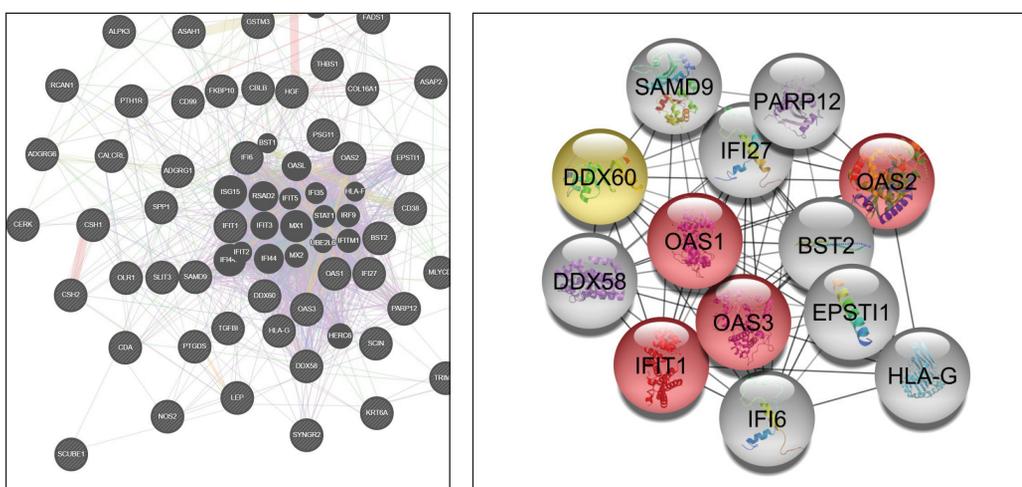
Осуществлен полнотранскриптомный анализ ДК плаценты представителей двух этнических групп (русские (n=4) и буряты (n=4)). Единичные децидуальные клетки были получены с помощью технологии лазерной микродиссекции (Laser Capture Microdissection) препаратов тонких окрашенных срезов на приборе PALM MicroBeam UV (Carl Zeiss). Тотальная РНК 1000 морфологически однородных децидуальных клеток была выделена набором Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, США). Синтез библиотек для полнотранскриптомного анализа проводился набором SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara, США). Готовые библиотеки объединяли в пул и выполняли одноконцовое прочтение на платформе Illumina Next-seq 500. Полученные в ходе РНК-секвенирования данные выравнивались на человеческий геном (сборка hg38) с использованием программы STAR. После этого проводился подсчет прочтений, приходящихся на отдельные гены с использованием htseq. Последующий анализ данных секвенирования проводился в программной среде R с использованием пакетов edgeR и limma. На первом этапе была проведена фильтрация транскриптов, имеющих низкий уровень экспрессии, и последующая нормализация. При расчете дифференциальной экспрессии в пакете limma устранялся батч-эффект между запусками, а также учитывалась информация от репликатов. Аннотацию транскрипционных активных областей, полученных в настоящей работе в результате секвенирования децидуальных клеток, проводили в программной среде R с использованием базы данных gencode.v19. Функциональную интерпретацию генов проводили в базе DAVID [7], а также с помощью онлайн-ресурса WebGestalt [8]. Для списка генов, показавших значимый уровень различий (FDR<0,05) в экспрессии между популяционными группами, была построена генная сеть и выполнен поиск центральных генов (hub genes) с использованием плагина cytoHubba [9] программного обеспечения Cytoscape [10].

Экспериментальная часть

В ходе РНК-секвенирования было получено 19 749 транскриптов (CPM>1), выровненных на геном человека. Среднее покрытие на образец составило 10,6 млн прочтений. При сравнении экспрессионных профилей децидуальных клеток в обследованных группах русских и бурят были выявлены статистически значимые различия (FDR<0,05) для 61 транскрипта. Согласно базе Reactome [11], основные биологические пути, в которые вовлечены данные гены, – это пути сигналинга интерферонов альфа, бета типа (HSA-909733), цитокинового сигналинга (HSA-1280215), противовирусного ответа (HSA-8983711) и противовирусного ответа, опосредованного стимуляцией интерферона (HSA-8983711), а также другие раз-

личные процессы иммунной системы (HSA-168256). Таким образом, многие обнаруженные категории были связаны с процессами иммунного ответа на антиген и основными эффекторными молекулами, задействованными в реакциях иммунного типа. Стоит отметить, что для большей части идентифицированных ДЭГ была характерна гиперэкспрессия в образцах русских, тогда как лишь 15 генов (*PTGDS*, *RRAGB*, *ASAH1*, *OLRI*, *THBS1*, *NBPF19*, *SRI*, *EPST11*, *KRT6A*, *ASAP2*, *BST2*, *RN7SL3*, *TRIM29*, *DDX60*, *SPP1*) показали высокий уровень экспрессии у бурят. Данные результаты указывают на преобладающую активацию системы иммунитета у представителей европеоидной расы, что, вероятно, связано со значимостью данных генов в эволюционных процессах адаптации человека к климатическим и эпидемиологическим условиям обитания.

Анализ архитектуры генной сети продемонстрировал коэкспрессию (79,2 %) в качестве основного типа взаимодействий между исследуемыми ДЭГ (рис. 1, а). Следует отметить, что данные коэкспрессированные молекулы в рассматриваемой сети статистически значимо ассоциированы с такими биологическими процессами как сигнальный путь интерферона 1 типа, иммунный ответ на вирусную инфекцию, клеточный ответ на антиген и др., что дополнительно подтверждает значимость этих феноменов в формировании архитектуры транскриптома децидуальных клеток при ПЭ.



а) б)

Рис. 1. Генная сеть, включающая ДЭГ, полученные при сравнительном анализе транскриптомных профилей индивидов из русской и бурятской популяций, (а);

Сеть главных функционально-активных генов (красным отмечены гены с rank=1: *OAS3*, *IFIT1*, *OAS2*, *OAS1*), полученная при анализе 61 транскрипта ДЭГ между индивидами русской и бурятской популяций с помощью программного обеспечения Cytoscape и MCC-анализа, (б)

Впоследствии топология сети была проанализирована с использованием плагина cytoHubba программного обеспечения Cytoscape. Для каждого узла (белка) сети была посчитана степень, учитывающая количество взаимодействий с соседними узлами, длину связи, а также тенденцию белков к образованию кластеров, в результате были отобраны 4 гена с самой высокой степенью (rank = 1; *OAS3*, *IFIT1*, *OAS2*, *OAS1*) (рис. 1, б). Данные гены относятся к генам семейства IFN-индуцированных противовирусных белков, играющих решающую роль во врожденном противовирусном ответе клетки. Показано изменение экспрессии *OAS1-OAS3*, *IFIT1* во время беременности при сопутствующих воспалительных заболеваниях (ревматоидный артрит [12], инфекция, вызванная вирусами Зика и герпеса [13]), кроме того, сообщается, что активность выявленных антимикробных факторов существенно изменяется в зависимости от течения беременности [14].

Врожденная иммунная система является первой линией иммунологической защиты, которая обеспечивает незамедлительный ответ против вторжения патогенов. Кроме очевидной противовирусной функции, врожденный иммунитет на стыке матери и плода имеет фундаментальное значение для создания и поддержания иммунологически толерантной микросреды на всем протяжении беременности. Наши результаты указывают на то, что в популяционной дифференциации транскриптомного профиля децидуальных клеток во время осложненной беременности преобладают пути системы врожденного иммунитета, сопряженные с активностью белков интерферона.

Заключение

Таким образом, анализ дифференциальной экспрессии генов децидуальных клеток в обследованных группах позволил выявить статистически значимые различия при сравнении индивидов из популяционных выборок русские/буряты. Обнаружено, что ключевую роль в наблюдаемой популяционной дифференциации изученных транскриптомных профилей децидуальных клеток бурят и русских играют механизмы локальных и системных ответов, опосредованных молекулами интерферонов. Эти данные имеют большое значение как для изучения здоровой плацентации, так и для исследования потенциальной важности специфических иммунных ответов при различных гистационных осложнениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №20-34-90128, №18-29-13045).

ЛИТЕРАТУРА

1. Idaghdour Y, Storey J.D., Jadallah S.J., Gibson G. A Genome-Wide Gene Expression Signature of Environmental Geography in Leukocytes of Moroccan Amazighs // PLOS Genetics. – 2008. Vol. 4(4). P. e1000052.
2. Göring H.H., Curran J.E., Johnson M.P., Dyer T.D., Charlesworth J., Cole S.A., Jowett J.B., Abraham L.J., Rainwater D.L. et al. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes // Nat Genet. 2007. Vol. 39(10). P.1208–16.
3. Shi Y., Steppi A., Cao Y., Wang J., He M.M., Li L., Zhang J. Integrative Comparison of mRNA Expression Patterns in Breast Cancers from Caucasian and Asian Americans with Implications for Precision Medicine // Cancer Res. 2017. Vol. 77(2). P. 423–433.
4. Mitchell, S.A., Chambers, D.A. Leveraging Implementation Science to Improve Cancer Care Delivery and Patient Outcomes // Journal of oncology practice. 2017. Vol. 13(8). P.523–529.
5. Bokslag A., van Weissenbruch M., Mol B.W., de Groot C.J. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate // Early Hum Dev. 2016. Vol. 102. P. 47–50.
6. Phipps E., Prasanna D., Brima W., Jim B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines // Clin J Am Soc Nephrol. 2016. Vol. 11(6). P.1102–13.
7. Dennis G.Jr, Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery // Genome Biol. 2003. Vol. 4(5). P. 3.
8. Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J., Shi Z., Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47(W1). P. W199–W205.
9. Chin C.H., Chen S.H., Wu H.H., Ho C.W., Ko M.T., Lin C.Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome // BMC Syst Biol. 2014. Vol. 8, suppl 4:S11.
10. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // Genome Res. 2003. Vol.13(11). P.2498–504.
11. Stein L.D. Using the Reactome database // Curr Protoc Bioinformatics. 2004. Vol. 8. Unit 8.7.
12. Goin D.E., Smed M., Pachter L., Purdom E., Nelson J.L., Kjaergaard H., Olsen J., Lund Hetland M., Ottesen B., Zoffmann V., Jawaheer D. Transcriptome Analysis in Women with Rheumatoid Arthritis Who Improve or Worsen during Pregnancy // Arthritis Rheumatol. 2017. Vol. 69, suppl 10.
13. Lim S.J., Seyfang A., Dutra S., Kane B., & Groer M. Gene expression responses to Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant women // MicrobiologyOpen. 2020. Vol. 9(12). P. e1134.
14. Cardenas I., Means R.E., Aldo P., Koga K., Lang S.M., Booth C.J., Manzur A., Oyarzun E., Romero R., Mor G. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor // J Immunol. 2010. Vol. 185(2). P.1248–57.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА 1438G/A ГЕНА *HTR2A* С НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ

**А.А. Бочуров¹, Н.И. Павлова¹, В.А. Алексеев¹, А.Т. Дьяконова¹,
В.В. Додохов², Х.А. Куртанов³**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск, Россия¹

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Арктический государственный агротехнологический университет», г. Якутск, Россия²

³ Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Якутск, Россия³

Аннотация

Курение является одной из причин, приводящих к развитию серьезных заболеваний, которые значительно сокращают продолжительность жизни. Исследовано 292 человека якутской национальности (77 женщин и 215 мужчин), сформированы две группы обследуемых лиц: курящие (n = 141) и некурящие (n = 151). В результате генотипирования полиморфизма 1438G/A гена *HTR2A* установлено, что в исследованной выборке якутов преобладает аллель G.

Частота аллеля А для некурящих мужчин составила 23,7 %, у некурящих женщин – 22,6 %, у курящих

мужчин – 23,7%, а у курящих женщин – 31,5 %. Наибольшая частота генотипа AA была выявлена у курящих женщин (8,7 %), тогда как у курящих мужчин она была наименьшей (1,1 %). Частота гетерозиготного генотипа AG во всех подгруппах курящих была выше, чем в группах некурящих. Сравнение частот аллелей и генотипов в зависимости от степени курения выявил статистически значимую разницу между подгруппой заядлых курильщиков в сравнении с подгруппой курящих в легкой степени ($p \leq 0,05$). Анализ отношения рисков (RR) показал статистически значимую связь с риском при сравнении злостных курильщиков и курильщиков легкой степени ($RR=1,086$; 95 % CI=1,032–1,142; $p=0,049$). Используя генотипы AA и AG в качестве рискованных генотипов, анализ отношения шансов (OR) и RR между этими подгруппами показал, что эти генотипы связаны с повышенным риском заядлого курения ($OR=9,714$; 95 % CI=1,196–78,874; $RR=1,126$; 95 % CI=1,027–1,235; $p=0,026$). Полученные результаты исследования указывают на связь полиморфизма 1438G/A со степенью тяжести курения.

Ключевые слова: никотиновая зависимость, курение, *HTR2A*, полиморфизм, якуты.

ASSOCIATION OF THE 1438G/A POLYMORPHISM OF THE *HTR2A* GENE WITH NICOTINE ADDICTION

A.A. Bochurov¹, N.I. Pavlova¹, V.A. Alekseev¹, A.T. Dyakonova¹,
V.V. Dodokhov², Kh.A. Kurtanov³

Federal State Budgetary Scientific Institution «Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems», Ykutsk, Russia¹

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Arctic State Agrotechnological University», Ykutsk, Russia²

Institute for Biological Problems of the Permafrost of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center «Yakutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Ykutsk, Russia³

Abstract

Smoking is one of the causes leading to the development of serious diseases that significantly reduce life expectancy. 292 people of Yakut nationality (77 women and 215 men) were studied, two groups of examined persons were formed: smokers ($n = 141$) and non-smokers ($n = 151$). As a result of genotyping of the 1438G/A polymorphism of the *HTR2A* gene, it was found that the G allele predominated in the studied sample of Yakuts.

The allele frequency A for non-smoking men was 23,7 %, for non-smoking women 22,6 %, for smoking men it was 23,7 %, and for smoking women 31,5 %. The highest frequency of the AA genotype was found in female smokers (8,7 %), while in male smokers it was the lowest (1,1 %). The frequency of the heterozygous AG genotype in all subgroups of smokers was higher than in non-smokers. Comparison of allele and genotype frequencies depending on the degree of smoking revealed a statistically significant difference between the subgroup of heavy smokers compared to the subgroup of light smokers ($p \leq 0,05$). Risk ratio (RR) analysis showed a statistically significant association with risk when comparing heavy and mild smokers ($RR=1,086$; 95 % CI=1,032–1,142; $p=0,049$). Using the AA and AG genotypes as risk genotypes, an analysis of the odds ratio (OR) and RR between these subgroups showed that these genotypes are associated with an increased risk of heavy smoking ($OR=9,714$; 95 % CI=1,196–78,874; $RR=1,126$; 95 % CI=1,027–1,235; $p=0,026$). The results of the study indicate the relationship of 1438G/A polymorphism with the severity of smoking.

Keywords: nicotine addiction, smoking, *HTR2A*, polymorphism, Yakutsk.

Актуальность

Никотиновая зависимость – хроническое заболевание, аналогичное другим видам зависимости от каких-либо веществ, требующее повторных вмешательств для достижения и поддержания стойкого отказа от курения. Содержащийся в табаке никотин вызывает развитие стойкой приверженности к курению. Никотин действует как полный агонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (н-АХР) в центральной нервной системе, активирует дофаминергические пути в мезолимбической системе головного мозга и таким образом способствует развитию влечения и зависимости [1, 2]. По оценкам Всемирной организации здравоохранения в 2018 г. в России 28,3 % населения курят, это 34,2 млн жителей страны старше 15 лет [3]. По данным Росстат на 2019 г. больше всего курящих на Чукотке:

39 % взрослого населения, на 2-м месте – Еврейская автономная область: 37,3 %, на 3-м – Забайкальский край: 36,3 %, Республике Саха (Якутия) – на 5-м месте, доля курящего населения 34,4 % [4].

Ген *HTR2A* расположен на 13-й хромосоме и включает три экзона и два интрона протяженностью более 63 т.п.н., этот ген имеет два известных функциональных однонуклеотидных полиморфизма (SNP): T102C (rs6313) и 1438G/A (rs6311), которые были связаны с привычкой к курению [5–7]. В исследованиях полиморфизма 1438G/A гена *HTR2A*, Neto E.S et al. (2014) установили статистически значимую связь аллеля А с тяжестью курения [1].

Цель исследования – изучить ассоциацию полиморфизма 1438G/A гена *HTR2A* с никотиновой зависимостью.

Материал и методы. Исследования были проведены в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). В ходе молекулярно-генетического исследования протестировано 292 человека якутской национальности (77 женщин и 215 мужчин), исследование проведено с письменного информированного согласия всех участников. Были сформированы две группы обследуемых лиц: курящие (n = 141) и некурящие (n = 151). Для определения ассоциации исследуемого гена со степенью курения разделили на три подгруппы: заядлые курильщики, курильщики легкой степени и некурящие. Курящих классифицировали в зависимости от их потребления сигарет в день (с/д) следующим образом: курильщики легкой степени (ЛК, n = 10), те, кто потреблял от 1 до 10 сигарет в день, и заядлые курильщики (ЗК, n = 131), те, кто потреблял более 10 с/д. Генотипирование образцов ДНК осуществляли путем ПЦР- и ПДРФ-анализа. Статистический анализ был проведен с помощью программы Office Microsoft Excel 2010, Statistica 8.0. Частоты аллелей и генотипов 1438G/A определяли путем прямого подсчета по общепринятым формулам. Критерии оценки значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска вычисляли с помощью критерия χ^2 -Пирсона. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты.

При сравнении частот аллелей и генотипов 1438G/A 4 между курящими и некурящими не выявлено статистически значимых различий (Таблица).

Расчет отношения шансов и относительного риска полиморфизма А-1438G гена *HTR2* в зависимости от степени курения в популяции якутов

	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %		Отношение шансов (OR) для аллеля риска (A)	Отношение рисков (RR) для аллеля риска (A)	p	Отношение шансов (OR) для AA+AG	Отношение рисков (RR) для AA+AG	p*
	AA	AG	GG	A	G						
Курящие	3,5	45,4	51,1	26,2	73,8	1,578 (0,753–3,308)	1,242 (0,947–1,631)	0,303	1,184 (0,746–1,878)	1,099 (0,867–1,393)	0,435
Некурящие	2,6	41,7	55,6	23,5	76,5						
Курящие женщины	8,7	45,7	45,7	31,5	68,5	1,578 (0,753–3,308)	1,242 (0,947–1,631)	0,303	1,648 (0,657–4,134)	1,222 (0,844–1,769)	0,286
Некурящие женщины	3,2	38,7	58,1	22,6	77,4						
Курящие мужчины	1,1	45,3	53,7	23,7	76,3	0,996 (0,637–1,559)	1,040 (0,804–1,345)	0,922	1,054 (0,614–1,810)	1,030 (0,762–1,392)	0,848
Некурящие мужчины	2,5	42,5	55	23,7	76,3						
Заядлые курильщики	3,8	48,1	48,1	27,9	72,1	1,257 (0,860–1,836)	1,127 (0,929–1,366)	0,278	1,353 (0,846–2,164)	1,175 (0,915–1,510)	0,207
Некурящие	2,6	41,7	55,6	23,5	76,5						
Заядлые курильщики	3,8	48,1	48,1	27,9	72,1	7,339 (0,965–55,820)	1,086 (1,032 – 1,142)	0,049**	9,714 (1,196 – 78,874)	1,126 (1,027 – 1,235)	0,026**
Курящие в легкой степени	0	10	90	5	95						

p* - уровень значимости генотипов AA+ AG по хи-квадрату Пирсона; **с поправкой Йейтса

Наибольшая частота генотипа AA была выявлена у курящих женщин (8,7 %), тогда как у курящих мужчин она была наименьшей (1,1 %). Частота гетерозиготного генотипа AG во всех подгруппах курящих была выше, чем в группах некурящих. Сравнение частот аллелей

и генотипов в зависимости от степени курения выявил, статистически значимую разницу между подгруппой заядлых курильщиков в сравнении с подгруппой курящих в легкой степени ($p \leq 0,05$).

Для вычисления отношения шансов и отношения рисков, в качестве риска к курению мы использовали, так же? как E.S. Neto et al. (2014), аллель А. Анализ отношения рисков (RR) показал статистически значимую связь с риском при сравнении злостных курильщиков и курильщиков легкой степени ($RR=1,086$; 95 % $CI=1,032-1,142$; $p=0,049$). Используя генотипы AA and AG в качестве рискованных генотипов, анализ отношения шансов (OR) и RR между этими подгруппами показал, что эти генотипы связаны с повышенным риском заядлого курения ($OR= 9,714$; 95 % $CI=1,196-78,874$; $RR=1,126$; 95 % $CI=1,027-1,235$; $p=0,026$).

Заключение

Полученные результаты исследования указывают на связь полиморфизма 1438G/A со степенью тяжести курения. Однако также необходимо учитывать тот факт, что испытуемые самовольно сообщали о курении и о количестве потребления сигарет. В идеале количество потребляемого никотина следует измерять по уровню котинина в сыворотке крови, поскольку потребление табака (с/д) влияет на уровень никотина в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neto E.S., Mágulas J.O., Sousa J.J.S., Moura A.C.M., Pinto G.R., Yoshioka F.K.N., Canalle R., Motta F.J.N. Study of polymorphic variants of the serotonin 2A receptor gene (5-HT_{2A}) and its possible effects on smoking habits of a population from northeastern Brazil // Genet. Mol. Res. 2014. Vol. 13, № 4. P. 8268–8277.
2. Pérez-Rubio G., Ramírez-Venegas A., Noé Díaz V., García Gómez L., Elvira Fabián K., García Carmona S., López-Flores L.A., Ambrocio-Ortiz E., Contreras Romero R., Alcantar-Ayala N., Sansores R.H., Falfán-Valencia R. Polymorphisms in HTR2AA and DRD4 Predispose to Smoking and Smoking Quantity // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 1. P. e0170019.
3. Стандартизированные по возрасту оценки потребления табака, табакокурения и курения сигарет в настоящее время. Данные по странам. [Электронный ресурс]: интернет-сайт Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Режим доступа: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.TOBAGESTDCURR?lang=en>
4. Выборочное наблюдение за поведенческими факторами, влияющими на состояние здоровья населения [Электронный ресурс]: интернет-сайт. Федеральная служба государственной статистики. Режим доступа: https://www.gks.ru/free_doc/new_site/ZDOR/Factors2018_2812/index.html
5. Polina E.R., Contini V., Hutz M.H., Bau C.H. The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking // Drug Alcohol Depend. 2009. Vol. 101, № 1–2. P.128–131
6. Diakonova A.T., Pavlova N.I., Solovyeva N.A., Varlamova M.A., Alexandrova T.N., Kurtanov Kh.A. Molecular-genetic analysis of the connection of the SLC6A3 gene with nicotine addiction in Yakutia // Yakut Medical Journal. 2018. Vol. 64, № 4. P. 6–8.
7. Levran O., O'Hara K., Peles E., Li D., Barral S., Ray B., Borg L., Ott J., Adelson M., Kreek M.J. ABCB1 (MDR1) genetic variants are associated with methadone doses required for effective treatment of heroin dependence // Hum Mol Genet. 2008. Vol. 14, № 17. P. 2219–27

ПРОФИЛЬ СОБЫТИЙ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА В ДЕЦИДУАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

М.М. Гавриленко, А.А. Бабовская, А.А. Зарубин, Е.А. Трифонова, В.А. Степанов

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия

Аннотация

Альтернативный сплайсинг (АС) мРНК – ключевой этап посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который обеспечивает пластичность транскрипции и контроль экспрессии изоформ РНК в данный момент времени в данном типе клеток. Предположительно этот механизм играет важную роль в развитии и функционировании плаценты. В качестве объекта исследования выбраны децидуальные клетки, которые имеют ключевую роль как в поддержании физиологической беременности, так и в развитии ее неблагоприятных исходов, что связано с их участием в процессах гемостаза, воспалении и иммунном ответе. В исследовании проведено глубокое полнотранскриптомное секвенирование с детальным анализом событий альтернативного сплайсинга в плацентарной ткани при физиологическом течении беременности. В децидуальных клетках идентифицированы 151 233 события АС, аннотированных в GENCODE v.26. Только 581 событие АС из данного массива для 373 генов соответствовало установленным критериям ($CPM > 10$; доля транскрипта от 0,5 до 0,95). Из них два и более транскрипта имели 130 генов, чьи функции, согласно GeneOntology, связаны с каноническим сигнальным путем Wnt, регуляцией субстрат-зависимой миграции клеток, активацией андрогенных рецепторов, сплайсингом мРНК. Построена сеть генных взаимодействий, которая позволила выявить кластер ко-экспрессии из 24 генов, центральное место в которой заняли *CTNNB1*, *EIF4A2*, *EIF4G1*, *EIF4G2*, *FLNA*, *FN1*, *HNRPA2B1*, *HNRNPH1*, *HNRNPK*, *HNRNPU*, *RBFOX2*,

RBM25, *SRSF5*, их функции ассоциированы с эмбриогенезом, дифференцировкой клеток, инвазией цитотрофобласта, эндотелиальной дисфункцией и различными путями онкогенеза. Установлено, что на ген *FN1* пришлось 10 альтернативных транскриптов, что является максимальным показателем среди полученных данных. Известно, что продукт гена *FN1* – плодовый фибронектин является скрининговым маркером преждевременных родов. Полученные результаты подтверждают важность альтернативного сплайсинга, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие и представляет собой важный механизм регуляции генов в децидуальных клетках. Исследование показало, что многие гены, подверженные альтернативному сплайсингу в децидуальных клетках, ассоциированы с осложнениями беременности, в связи с чем представляется актуальным дальнейшее изучение данного механизма процессинга РНК в когорте пациенток с акушерской патологией.

Ключевые слова. альтернативный сплайсинг, изоформа, транскрипт, полнотранскриптомное секвенирование, плацента, децидуальные клетки, человек.

PROFILE OF ALTERNATIVE SPLICING EVENTS IN PLACENTAL DECIDUAL CELLS AT NORMAL PREGNANCY

M.M. Gavrilenko, A.A. Babovskaya, A.A. Zarubin, E.A. Trifonova, V.A. Stepanov

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMC, Russia, Tomsk

Abstract

Alternative mRNA splicing is a key stage of post-transcriptional regulation of gene expression, since it provides both transcription plasticity and control of the expression of the RNA isoform at each time in different cell types. Supposedly, this mechanism plays an important role in the development and functioning of the placenta. Decidual cells were chosen as the object of research due to their key role in both maintaining physiological pregnancy and in the development of its adverse outcomes. Whole transcriptome sequencing was accompanied by a detailed analysis of alternative splicing events in placental tissue under the conditions of the physiological pregnancy. Alternative splicing events are identified in existing genome annotations. We detected 151233 alternative splicing events in decidual cells, annotated in GENCODE v.26. Only 581 alternative splicing events from this array for 373 genes meet the criteria (CPM > 10; the proportion of transcript ranges from 0.5 to 0.95). Of these, two or more transcripts had 130 genes whose functions, according to GeneOntology, are associated with the canonical Wnt signaling pathway, regulation of substrate-dependent cell migration, activation of androgen receptors, mRNA splicing. The maximum number 10 of alternative transcripts corresponds to the *FN1* gene. A systematic review of the medical literature found that fetal fibronectin is a good predictor of spontaneous preterm birth. The construction of a network of gene interactions revealed a cluster of co-expression of 24 genes. Their functions are associated with embryogenesis, cell differentiation, endothelial dysfunction and various pathways of oncogenesis. The data obtained confirm the importance of alternative splicing in decidual cells. The study showed that many genes subject to alternative splicing in decidual cells are associated with pregnancy pathologies, therefore, the continuation of research is declared in the direction of using obstetric pathology data.

Key words: alternative splicing, isoform, transcript, whole transcriptome sequencing, placenta, decidual cells, human.

Актуальность. Альтернативный сплайсинг мРНК (АС) – ключевой этап посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который представляет собой регуляторный механизм, продуцирующий отдельные молекулы мРНК из одной пре-мРНК и играющий важную роль в развитии и функционировании клеток и тканей. Различные исследования показали, что некоторые многофакторные заболевания ассоциированы с aberrантным АС, например такие, как болезнь Альцгеймера [1], рак различной локализации [2], сердечно-сосудистые заболевания [3] и др. Несмотря на всесторонний анализ альтернативного сплайсинга пре-мРНК во многих тканях и клетках человека в норме и при патологии, ранее не проводился глобальный скрининг изменений альтернативного сплайсинга как в целом в плацентарной ткани, так и в отдельных клеточных популяциях, формирующих ее. Примечательно, что децидуальные клетки (ДК) плаценты имеют ключевую роль как в поддержании физиологической беременности, так и при развитии ее неблагоприятных исходов, предположительно, данные функции связаны с их участием в процессах гемостаза, воспалении и иммунном ответе [4]. В связи с этим ДК являются наиболее интересным объектом для исследования событий АС при беременности.

Цель исследования – анализ и характеристика событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках при физиологической беременности.

Материал и методы

Объем выборки составил 7 женщин с физиологическим течением беременности. Сбор биоптатов материнской части плаценты осуществлен по стандартной методике [5] акушерами-гинекологами на базе ОГАУЗ «ОПЦ им. И.Д. Евтушенко» г. Томска. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. У всех пациенток срезы плацентарной ткани охарактеризованы гистологически с окрашиванием гематоксилин-эозином. Лазерная микродиссекция осуществлена на оборудовании PALM (Carl Zeiss, Германия) с технологией автоматизированного захвата фрагментов (Laser Capture Microdissection). Для выделения тотальной РНК использован набор Single Cell RNA Purification Kit (Norgen, США). Концентрация и качество РНК оценены с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer. Приготовление библиотек проведено по протоколу SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 (Takara, США). Массовое параллельное секвенирование выполнено на приборе Next-seq 2000 (Illumina). Выравнивание транскриптов по эталону проведено в программе STAR. Анализ событий альтернативного сплайсинга выполнен в среде R с помощью пакета SGSeq [6].

Результаты

Идентифицированы 151233 транскрипта, которые проверены на соответствие нескольким условиям. Во-первых, CPM должно быть больше 10, во-вторых, доля альтернативного транскрипта больше или равна 0,05 и меньше или равна 0,95. Согласно указанным критериям, выявлен 581 транскрипт, которым соответствовали 373 гена, из них два и более транскрипта имели 130 генов, чьи функции, согласно GeneOntology, связаны с каноническим сигнальным путем Wnt, регуляцией субстрат-зависимой миграции клеток, активацией андрогенных рецепторов, сплайсингом мРНК. Для дальнейшего анализа выбраны 36 генов, имеющих три и более транскрипта (*FN1*, *HNRNPH1*, *HNRPA2B1*, *SRSF5*, *TNFAIP3*, *TCF7L2*, *EIF4G2*, *OS9*, *TPM1*, *CORO6*, *QSOX1*, *SERPINE2*, *EIF4A2*, *CTSL*, *TAF1D*, *ARHGDI3*, *TNFAIP2*, *FLNA*, *CD46*, *HNRNPU*, *TRIP12*, *CTNNB1*, *EIF4G1*, *SLC4A7*, *RASA1*, *CAST*, *HNRNPK*, *PARD3*, *IGF2*, *PFDN5*, *LIMA1*, *RBM25*, *NFE2L1*, *NARS1*, *CALR*, *RBFOX2*). На ген *FN1* пришлось 10 альтернативных транскриптов, что является максимальным показателем среди полученных данных. По данным базы DisGeNET, эти гены преимущественно ассоциированы с онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, но для двух генов показана связь с акушерскими патологиями. Ген *CD46* ассоциирован с развитием HELLP-синдрома (score = 0.330), а ген *IGF2* связан с задержкой роста плода (score = 0.900). Построена сеть генных взаимодействий и оценена функциональная значимость 36 генов в онлайн-ресурсе STRING. Центральными генами (hub genes) считали гены, имеющие score $\geq 0,9$. Выявлен кластер ко-экспрессии, включающий 24 гена. Центральное место в построенной сети с наибольшим числом взаимодействий занимают гены *CTNNB1*, *EIF4A2*, *EIF4G1*, *EIF4G2*, *FLNA*, *FN1*, *HNRPA2B1*, *HNRNPH1*, *HNRNPK*, *HNRNPU*, *RBFOX2*, *RBM25*, *SRSF5*.

Согласно аннотации биологических процессов в базе GeneOntology, гены этой сети связаны с сигнальным Wnt-путем и путем регуляции миграции цитотрофобласта. Анализ литературных данных показал, что к развитию акушерской патологии имеют отношения только некоторые из центральных генов. По литературным данным, продукт гена *CTNNB1* – β -катенин является ключевым ядерным эффектором сигнального пути Wnt, который регулирует эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей. Сниженная экспрессия этого белка может быть связана с развитием ПЭ [7]. Известно, что мутации в этом гене могут приводить к развитию эндометриоидной карциномы [8]. Интересно, что ген *EIF4G1* усиленно экспрессируется при серозном раке яичников и что повышение экспрессии его продукта – белка eIF4G1, который является компонентом белкового комплекса eIF4F. Кроме того, пациенты с более низкой экспрессией eIF4G1, как правило, имеют более высокую выживаемость, таким образом, он может способствовать возникновению и метастазированию рака яичников [9]. Известно, что возможными маркерами эндотелиальной дисфункции и инвазии цитотрофобласта являются фибронектин и ингибитор активатора плазминогена-2 (PAI-2). Повышение уровня фибронектина и снижение уровня PAI-2 предшествуют возникновению ПЭ уже на 20-й неделе беременности [10]. В то же время этот белок ингибирует апоптоз трофобластов человека путем активации сигнального пути PI3K/Акт и способствует сохранению беременности [11]. Примечательно, что фетальный фибронектин является скрининговым маркером риска спонтанных преждевременных родов [12]. Известно, что белки RBFOX2, RBM25, SRSF5 являются активно изучаемыми факторами альтернатив-

ного сплайсинга. Преимущественно они связаны с патологическими путями развития раков различной локализации и нейродегенеративных заболеваний. Однако на данный момент известно, что только RBFOX2 ассоциирован с развитием гинекологических заболеваний. Он является главным регулятором тканеспецифичного альтернативного сплайсинга [13]. RBFOX2 – единственный представитель семейства, который обнаруживается в тканях яичников и молочной железы. Недавно было показано, что RBFOX2 может взаимодействовать с сайтами сплайсинга, используя три конфигурации связывания [14].

Заключение

Полученные результаты подтверждают важность альтернативного сплайсинга, который существенно увеличивает транскрипционное разнообразие и представляет собой важный механизм регуляции генов в децидуальных клетках. Исследование показало, что многие гены, подверженные альтернативному сплайсингу в децидуальных клетках, ассоциированы с осложнениями беременности, в связи с чем представляется актуальным дальнейшее изучение данного механизма процессинга РНК в когорте пациенток с акушерской патологией. Например, продукт гена *FNI* – белок фибронектин является скрининговым маркером преждевременных родов и ассоциирован с развитием преэклампсии. Необходимо отметить, что продукты альтернативно сплайсированных генов, по литературным данным также ассоциированы с развитием онкогинекологических заболеваний через различные сигнальные пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-34-90128.

ЛИТЕРАТУРА

1. Raj T., Li Y.I., Wong G. et al. Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer's disease susceptibility // *Nat Genet.* 2018. Vol. 50, № 11. P. 1584-1592.
2. Kahles A., Lehmann K., Toussaint N.C. et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients // *Cancer Cell.* 2018. Vol. 34, № 2. P. 211–224.
3. Tejedor J.R., Tilgner H., Iannone C., et al. Role of six single nucleotide polymorphisms, risk factors in coronary disease, in OLR1 alternative splicing // *RNA.* 2015. Vol. 6. P. 1187–1202.
4. Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S. et al. The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // *Hum Reprod Update.* 2016. Vol. 4. P. 497–515.
5. Robson S.C., Simpson H, Ball E. et al. Punch biopsy of the human placental bed. // *Am J Obstet Gynecol.* 2002. Vol. 187, № 5. P. 1349–1355.
6. Goldstein L.D., Cao Y., Pau G. et al. Prediction and Quantification of Splice Events from RNA-Seq Data // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 5. A. e0156132.
7. Zhang Z., Li H., Zhang L. et al. Differential expression of β -catenin and Dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies: a comparative study // *Reprod Biol Endocrinol.* 2013. Vol. 11, № 17.
8. Watanabe T., Nanamiya H., Kojima M. et al. Clinical relevance of oncogenic driver mutations identified in endometrial carcinoma // *Transl Oncol.* 2021. Vol. 3. A. 101010.
9. Li L., Luo Q., Xie Z. et al. Characterization of the Expression of the RNA Binding Protein eIF4G1 and Its Clinicopathological Correlation with Serous Ovarian Cancer // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 9. A. e0163447.
10. Bodova K. B., Biringer K., Dokus K. et al. Fibronectin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and uterine artery Doppler velocimetry as markers of preeclampsia // *Dis Markers.* 2011. Vol. 30, № 4. P. 191–196.
11. Ji J., Chen L., Zhuang Y., Han Y. et al. Fibronectin 1 inhibits the apoptosis of human trophoblasts by activating the PI3K/Akt signaling pathway // *International Journal of Molecular Medicine.* 2020. Vol. 46, № 5. P. 1908–1922.
12. Honest H., Bachmann L. M., Gupta J. K. et al. Accuracy of cervicovaginal fetal fibronectin test in predicting risk of spontaneous preterm birth: systematic review // *Bmj.* 2002. Vol. 325, №. 7359. P. 301.
13. Venables J. P., Brosseau J. P., Gadea G. et al. RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues // *Molecular and cellular biology.* 2013. Vol. 33, №2. P. 396–405.
14. Zhou D., Couture S., Scott M.S., Elela S.A. RBFOX2 alters splicing outcome in distinct binding modes with multiple protein partners // *Nucleic Acids Research.* 2021. Vol. 49, № 14. P. 8370–8383.

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ *TERT*, *TERC* И *STN1* В РАЗВИТИИ ДЕПРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ

Ю.Д. Давыдова^{1,2}, Р.Ф. Еникеева^{1,2}, А.В. Казанцева^{1,2,3}

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия¹

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, Россия, г. Уфа, Россия²

ФГБОУ ВО Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа, Россия³

Аннотация

Несмотря на большое количество исследований, посвященных выявлению генетической компоненты в развитии депрессивного поведения, результаты их зачастую являются противоречивыми, что может быть обусловлено различиями в используемых выборках, диктуя проведение ассоциативных работ

с включением различных взаимодействующих систем генов, а также средовых факторов. **Целью настоящего исследования** являлась оценка роли полиморфных локусов генов *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) и *STN1* (*rs2487999*), а также ген-средовых взаимодействий в фенотипических вариациях уровня депрессивности у 1065 психически здоровых индивидов с учётом половой и этнической принадлежности. В результате линейного регрессионного анализа был выявлен этноспецифичный характер ассоциации полиморфного локуса гена *STN1* (*rs2487999*) с развитием депрессивности.

Ключевые слова: депрессия, депрессивность, депрессивное поведение, теломеры, теломераза, ген-средовые взаимодействия.

THE ROLE OF POLYMORPHIC LOCI OF TERT, TERC AND STN1 GENES IN THE DEVELOPMENT OF DEPRESSIVE BEHAVIOR

Yu.D. Davydova^{1,2}, R.F. Enikeeva^{1,2}, A.V. Kazantseva^{1,2,3}

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia¹

Bashkir State University, Ufa, Russia²

Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia³

Abstract

Despite multiple studies examining the genetic component in developing depressive behavior, their results are frequently contradictory, which may be due to samples differences, which points to the necessity of association studies based on various gene-gene interactions together with environmental factors. **The present study** aimed to assess the role of *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) and *STN1* (*rs2487999*) gene polymorphisms together with gene-environment interactions on individual differences in depression in 1065 mentally healthy individuals controlling for gender and ethnicity. As a result of linear regression analysis, ethnicity-specific association of *STN1* (*rs2487999*) gene polymorphism with the development of depression was revealed.

Key words: depression, depressiveness, depressive behavior, telomeres, telomerase, gene-environment interactions.

Актуальность. Депрессия, или депрессивное расстройство (ДР), – это психическое расстройство, которое сопровождается гипотимией, снижением когнитивного функционирования и двигательной активности, негативной самооценкой и пессимистической оценкой своего будущего [1]. Согласно последним данным, по всему миру диагностировано более 322 млн случаев депрессии у индивидов из самых разных социальных и возрастных групп [2], а заметный рост числа случаев тяжёлой депрессии среди населения стал наблюдаться в период с 2019 по 2020 г. на фоне ограничений, введенных в связи с ухудшением эпидемиологической обстановки, вызванной пандемией COVID-19 [3].

Несмотря на проводимые исследования, этиология ДР всё ещё остается не до конца изученной, что обусловлено сложным взаимодействием как средовых, так и генетических факторов, среди которых особого внимания заслуживает гипотеза влияния длины хромосомных теломер на развитие ДР. Так, предполагается, что уменьшение длины теломер может быть связано с воздействием окислительного стресса и воспаления – процессов, потенциально вовлечённых в развитие ДР [4].

Согласно литературным данным, в регуляцию длины теломер вовлечены: обратная транскриптаза (ген *TERT*, 5p15.33), теломеразный РНК-компонент (ген *TERC*, 3q26.2), содержащий матричный участок для синтеза теломер, а также олигонуклеотид-связывающий белок-1 (ген *STN1*, 10q24.33), связывающийся с одонитевой теломерной ДНК и, таким образом, участвующий в регуляции функционирования теломер [5]. Таким образом, гены, кодирующие данные белки, могут рассматриваться в качестве кандидатных для изучения предрасположенности к развитию ДР. Кроме того, не вызывает сомнения, что ряд средовых факторов (место проживания, характер детско-родительских взаимоотношений, наличие хронических заболеваний, зависимостей, а также этническая и половая принадлежность индивида и др.) может оказывать влияние на механизмы эпигенетической регуляции, детерминирующей индивидуальный уровень поведенческих характеристик [6], в том числе депрессивности. Исходя из этого, в рамках психогенетических исследований особо актуальным представляется

учёт модулирующего эффекта средового компонента в анализе ассоциаций полиморфных локусов генов с исследуемым признаком.

Цель исследования – оценка роли полиморфных локусов генов *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) и *STN1* (*rs2487999*), а также ген-средовых взаимодействий в развитии депрессивности у психически здоровых индивидов с учётом социодемографических параметров.

Материал и методы

Исследованы когорты психически здоровых индивидов в возрасте 18–25 лет, сформированные в период 2017–2021 гг. по результатам случайной репрезентативной выборки Республики Башкортостан (средний возраст $20,33 \pm 1,88$ года; 79,58 % женщин; по этнической принадлежности: русские – 357, татары – 340, метисы – 134) и Удмуртской Республики (средний возраст $18,96 \pm 1,17$ года; 78,63 % женщин; по этнической принадлежности: удмурты – 234). От всех участников было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Для определения уровня депрессивности была использована шкала депрессии Бека (Beck Depression Inventory, BDI). Генотипирование полиморфных локусов генов *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) и *STN1* (*rs2487999*) осуществлялось методом ПЦР в реальном времени. Для оценки роли полиморфных локусов генов-кандидатов и ген-средовых взаимодействий (англ. gene-environment interactions, G×E) в фенотипических вариациях уровня депрессивности был проведен линейный регрессионный анализ (PLINK Vol. 1.9), где в качестве независимых переменных выступали генотипы и социально-демографические параметры, а в качестве зависимой – уровень депрессивности. В качестве социально-демографических факторов были исследованы: половая и этническая принадлежность до трёх поколений, возраст, сезон рождения индивида, количество детей в семье и порядок их рождения, воспитание в полной/неполной семье, характер детско-родительских отношений (уровни материнской и отцовской заботы/опеки, оцененные с помощью юношеского отчета о родительском отношении (Parental Bonding Instrument, PBI)), место рождения и проживания, гестационный возраст, возраст матери и отца на момент рождения, случаи жестокого обращения в детстве, билингвизм, наличие хронических заболеваний у респондента, статус табакокурения, физическая активность, рост, масса тела, обхват талии, приём лекарственных препаратов, особенности питания.

Для категориальных переменных с количеством категорий более двух была создана матрица фиктивных переменных, которые и использовались в G×E-анализе. Для оценки эффекта G×E-взаимодействий была проведена серия линейных регрессионных анализов, выходными данными в которых являлись регрессионные коэффициенты, отрицательный или положительный знак которых позволял судить об эффекте от наличия каждого дополнительного минорного аллеля. Так, отрицательный знак регрессионного коэффициента свидетельствовал об уменьшении средних значений в уровне депрессивности (или об уменьшении эффекта G×E-взаимодействий) при наличии минорного аллеля исследуемого полиморфного локуса, в то время как положительный знак, наоборот, свидетельствовал об увеличении средних показателей по тесту. При выявлении статистически значимых моделей G×E-взаимодействий проводился множественный регрессионный анализ с включением половой и этнической принадлежности в качестве ковариат в программе STATA Vol. 9.0.

Результаты

Наблюдаемые частоты генотипов полиморфных локусов генов *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) и *STN1* (*rs2487999*) соответствовали ожидаемым при равновесии Харди–Вайнберга ($p = 0,84$ для *rs7726159*, $p = 0,63$ для *rs1317082*, $p = 0,56$ для *rs2487999*). В результате линейного регрессионного анализа не было выявлено ассоциации полиморфных локусов генов *TERT* (*rs7726159*), *TERC* (*rs1317082*) и *STN1* (*rs2487999*) с вариациями уровня депрессивности в общей выборке ($p > 0,05$). Однако последующий анализ, проведенный отдельно в группах мужчин, женщин, индивидов русской, татарской и удмуртской этнических принадлежностей, показал, что в группе индивидов татарской этнической принадлежности наблюдался повышенный уровень депрессивности при наличии аллеля *rs2487999**T по сравнению с носителями генотипа *rs2487999**C/C ($\beta = 1,85$; $p = 0,03$). Известно, что продукт данного гена может действовать как фактор репликации, связываться с односторонней теломерной ДНК и, таким образом, участвовать в регуляции функционирования теломер [7]. Однако молекулярный механизм, посредством которого данный локус вовлечен в регуляцию депрессивности (особенно учитывая этно-специфичный характер ассоциации), в настоящий момент неизвестен и требует проведения дополнительных исследований. К настоящему времени было опубликовано одно исследование, в котором проводился анализ ассоциаций полиморфного локуса *rs2487999* гена *STN1* с риском развития болезни Альцгеймера [8],

однако авторами также не было выявлено ассоциаций с данным заболеванием. Что касается полиморфных локусов *rs7726159 (TERT)* и *rs1317082 (TERC)*, то авторами также не было выявлено ассоциаций с риском развития болезни Альцгеймера [8], что в определенной степени согласуется с результатами нашего исследования и дает основания предполагать, что потенциальное укорочение теломерных участков при особенностях психоэмоциональной сферы может быть не связано с функциональной активностью генов *TERT* и *TERC*.

Дальнейший анализ ген-средовых взаимодействий не обнаружил ассоциаций полиморфных локусов генов *TERT (rs7726159)*, *TERC (rs1317082)* и *STN1 (rs2487999)* с вариациями уровня депрессивности ($P > 0,05$).

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании была продемонстрирована вовлечённость полиморфного локуса *rs2487999* гена *STN1* в развитие депрессивности, однако существенное влияние на ассоциацию оказывает такой фактор, как этническая принадлежность индивидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№ АААА-А16-116020350032-1) при частичной поддержке мегагранта Правительства Республики Башкортостан (соглашение № 1 от 28.12.2021) и мегагранта Правительства Российской Федерации (№ 075-15-2021-595). Образцы ДНК взяты из ЦКП «Коллекция биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Смулевич А.Б. Депрессии при психических и соматических заболеваниях. М.: Медицинское информационное агентство. 2015. 640 с.
2. WHO: Depression and other common mental disorders Global health estimates. 2017. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>.
3. Shah S.M.A., Mohammad D., Qureshi M.F.H. et al. Prevalence, psychological responses and associated correlates of depression, anxiety and stress in a global population, during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic // Community Mental Health Journal. 2021. Vol. 57, № 1. P. 101–110.
4. Cai Z., Yan L.-J., Ratka A. Telomere shortening and Alzheimer's disease // Neuromolecular Medicine. 2012. Vol. 15, № 1. P. 25–48.
5. Рубцова М.П., Василькова М.П., Малякко А.Н. и др. Функции теломеразы: удлинение теломер и не только // Acta Naturae. 2012. Т. 4, № 2. С. 44–61.
6. Давыдова Ю.Д., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф. и др. Роль полиморфных локусов гена рецептора окситоцина (OXTR) в развитии агрессивного поведения у здоровых индивидов // Генетика. 2020. Т. 56, № 9. С. 1087–1097.
7. Wan M., Qin J., Songyang Z., Liu D. OB fold-containing protein 1 (OBFC1), a human homolog of yeast Stn1, associates with TPP1 and is implicated in telomere length regulation // The Journal of Biological Chemistry. 2009. Vol. 284, № 39. P. 26725–26731.
8. Madrid A.S., Rasmussen K.L., Rode L. et al. // Observational and genetic studies of short telomeres and Alzheimer's disease in 67,000 and 152,000 individuals: a Mendelian randomization study // European Journal of Epidemiology. 2019. doi: 10.1007/s10654-019-00563-w

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *NUP153* И *YWHAB* С КАНОНИЧЕСКИХ И АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПРОМОТОРОВ *LINE-1* В ПЛАЦЕНТЕ ПЕРВОГО ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ

**В.В. Деменева¹, Е.Н. Толмачева¹, Т.В. Никитина¹, Е.А. Саженова¹,
С.Ю. Юрьев², А.Ш. Махмутходжаев², А.С. Зуев¹, С.А. Филатова³,
А.Е. Дмитриев³, Я.Ю. Даркова³, И.Н. Лебедев¹, С.А. Васильев¹**

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск, Россия²

НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия³

Аннотация

Плацента имеет уникальный гипометилированный эпигенетический ландшафт. Профиль метилирования плаценты неравномерен по всему геному и меняется на протяжении всей беременности, особенно в области повторяющихся ДНК. В течение первого триместра беременности потенциально повышается активность регуляторных элементов, происходящих из ретровирусов и ретротранспозонов, которые подавляются метилированием ДНК во взрослом организме. Ранее нами было обнаружено аномальное повышение уровня метилирования ретротранспозона *LINE-1* в трофобласте хориона спонтанных абортусов. **Целью данного исследования** было проанализировать экспрессию генов *NUP153* и *YWHAB*,

высокоактивных в плаценте, с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 в зародышевой части плаценты спонтанных и медицинских абортусов. Анализ экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в реальном времени в ворсинах хориона и экстраэмбриональной мезодерме спонтанных и медицинских абортусов, а также в лимфоцитах взрослых индивидов в качестве группы сравнения. Индекс метилирования LINE-1 оценивали в ворсинах хориона спонтанных абортусов с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Уровень экспрессии обоих генов с канонических промоторов был выше в лимфоцитах крови, чем в тканях плаценты. Однако уровень экспрессии гена *NUP153* с альтернативного промотора LINE-1 был выше в ворсинах хориона и экстраэмбриональной мезодерме по сравнению с лимфоцитами. Между группами спонтанных и медицинских абортусов статистически значимых различий по уровню экспрессии генов выявлено не было. Индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии генов как с канонических, так и с альтернативных промоторов LINE-1. Таким образом, повышение индекса метилирования LINE-1 в плаценте спонтанных абортусов связано со снижением экспрессии генов не только с альтернативных промоторов, но и с канонических, что может влиять на нормальный эмбриогенез.

Ключевые слова. плацента, ретротранспозон LINE-1, метилирование ДНК, *NUP153*, *YWHAB*.

EXPRESSION OF THE *NUP153* AND *YWHAB* GENES FROM CANONICAL AND ALTERNATIVE LINE-1 PROMOTERS IN THE PLACENTA OF THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

V.V. Demeneva¹, E.N. Tolmacheva¹, T.V. Nikitina¹, E.A. Sazhenova¹, S.Y. Yuriev², A.S. Makhmutkhodzhaev², A.S. Zuev¹, S.A. Filatova³, A.E. Dmitriev³, Y.A. Darkova³, I.N. Lebedev¹, S.A. Vasilyev

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia³

Abstract

The placenta has a unique hypomethylated epigenetic landscape. The placental methylation profile is uneven across the genome and changes throughout pregnancy, especially in the area of repetitive DNA. During the first trimester of pregnancy, the activity of retrovirus- and retrotransposon-derived regulatory elements potentially increases, which are suppressed by DNA methylation in the adult body. Previously, we found an abnormal increase in the level of methylation of the LINE-1 retrotransposon in the chorion trophoblast of spontaneous abortions. **The aim of this study** was to analyze the expression of the *NUP153* and *YWHAB* genes, which are highly active in the placenta, from canonical and alternative LINE-1 promoters in the germinal part of the placenta of spontaneous and induced abortions. Analysis of the genes expression was performed using real-time PCR in chorionic villi and extraembryonic mesoderm of spontaneous and induced abortions, as well as in adult lymphocytes as a comparison group. The LINE-1 methylation index was assessed in chorionic villi from miscarriages by targeted bisulfite massive parallel sequencing. The level of expression of both genes from canonical promoters was higher in the blood lymphocytes than in the placental tissues. However, the expression level of the *NUP153* gene from the alternative LINE-1 promoter was higher in chorionic villi and extraembryonic mesoderm compared to lymphocytes. There were no statistically significant differences in the level of genes expression between the groups of spontaneous and induced abortions. The LINE-1 methylation index negatively correlated with the level of gene expression from both canonical and alternative LINE-1 promoters. Thus, an increase in the LINE-1 methylation index in the placenta of spontaneous abortions is associated with decrease in gene expression not only from alternative promoters, but also from canonical ones, which can affect normal embryogenesis.

Key words: placenta, retrotransposon LINE-1, DNA methylation, *NUP153*, *YWHAB*.

Актуальность. Для человека характерны частые репродуктивные потери на ранних сроках беременности по сравнению с другими периодами онтогенеза. Одним из основных факторов, вносящим существенный вклад в этиологию ранней эмбриональной гибели являются хромосомные аномалии и в первую очередь анеуплоидия. Возникновение анеуплоидии в мейозе и на стадии дробления совпадает с волнами эпигенетического репрограммирования. Плацента, как самостоятельный орган, имеет уникальный гипометилированный геном по сравнению с другими экстраэмбриональными и эмбриональными тканями, что говорит о

довольно раннем развитии данного органа и его особых функциях [1]. Гипометилирование плацентарной ДНК неравномерно по всему геному, а происходит в основном в «частично метилированных доменах». Это большие (>100 т.п.н.) участки с пониженным метилированием ДНК, чередующиеся с областями с более высоким метилированием ДНК [2].

В плаценте также наблюдается пониженное метилирование ДНК некоторых типов повторяющихся ДНК [3]. Ретротранспозоны LINE-1 (long interspersed nuclear element 1) представляют самый большой класс (приблизительно 17 % генома человека). LINE-1 – наиболее эволюционно молодой класс ретротранспозонов у человека, еще сохраняющий способность к транспозиции; следовательно, его транскрипционная активность подавляется метилированием ДНК в течение большинства периодов онтогенеза. Метилирование ретротранспозонов в плаценте не всегда совпадает с глобальным уровнем метилирования генома. В одном из исследований были показаны изменения статуса метилирования LINE-1 и его экспрессия в плаценте первого и третьего триместра, в котором наблюдалось значительное снижение уровня метилирования LINE-1 в третьем триместре плаценты по сравнению с первым. При этом между первым и третьим триместрами не было обнаружено глобального изменения метилирования ДНК [4].

Таким образом, существует временная регуляция метилирования и активации LINE-1 во время нормального развития плаценты. LINE-1 содержит смысловой промотор, который управляет транскрипцией двух белков ORF1 и ORF2p, необходимых для ретротранспозиции, и антисмысловой промотор, который может управлять транскрипцией химерных транскриптов, – 5'-антисмысловых последовательностей LINE-1, сплайсированных с экзонами соседних генов. Антисмысловые транскрипты LINE-1 затрагивают до 4 % всех генов человека, а антисмысловые промоторы LINE-1 активно транскрибируются в различных типах клеток человека, в том числе и в эмбриональных тканях [5]. Всего на данный момент идентифицировано 988 генов, способных экспрессироваться с альтернативных промоторов LINE-1 [6]. Из них, по данным STRING, были отобраны гены *NUP153* и *YWHAB*, имеющие значимые функциональные связи с белками, участвующими в дифференцировке трофобласта (по данным Gene Ontology). Ген *NUP153* функционирует как каркасный элемент в ядерной фазе комплекса ядерных пор и необходим для нормального ядерно-цитоплазматического транспорта белков и мРНК как во время митоза соматических клеток [7], так и в эмбриональных стволовых клетках мыши [8]. Ген *YWHAB* относится к группе генов, отвечающих за передачу сигнала путем связывания с фосфосеринсодержащими белками. Белок, кодируемый геном, взаимодействует с фосфатазами *RAF1* и *CDC25*, что может играть роль в митогенной передаче сигналов и механизмах клеточного цикла. В клетках эмбриональных фибробластов мышей было показано, что сверхэкспрессия *YWHAB* стимулирует и поддерживает независимый от крепления рост клеток [9].

Цель исследования – оценить уровень экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 в плаценте первого триместра беременности.

Материал и методы

В качестве материала для исследования были отобраны образцы ворсин хориона и экстраэмбриональной мезодермы спонтанных абортусов с нормальным кариотипом (n=10), трисомией по 16-й хромосоме (n=8) и моносомией X (n=6), а также медицинские абортусы (n=10). Все образцы хранились в жидком азоте. Для группы сравнения кДНК была получена из лимфоцитов периферической крови взрослых (n=10). Анализ экспрессии генов проводился с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В качестве референсного гена для анализа был использован ген «домашнего хозяйства» фермента *GAPDH*. Индекс метилирования оценивали в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1 для ворсин хориона спонтанных абортусов с использованием массивного параллельного секвенирования. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0.

Результаты

Уровень экспрессии для всех генов был выше с канонических промоторов в лимфоцитах крови, чем в тканях плаценты (для гена *NUP153* – в 8,4 раза, для гена *YWHAB* – в 2,5 раза, $p < 0,05$). Однако уровень экспрессии с альтернативных промоторов LINE-1 был выше в ворсинах хориона (для гена *NUP153* – в 64 раза, для гена *YWHAB* – в 20,3 раза, $p < 0,05$) и в экстраэмбриональной мезодерме (*NUP153* – в 44,9 раза, $p < 0,05$). Между группами спонтанных и медицинских абортусов статистически значимых различий в уровне экспрессии генов выявлено не было. Индекс метилирования LINE-1 отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии генов как с канонических (*NUP153* – $R = -0,59$, $p < 0,003$; *YWHAB* – $R = -0,52$,

$p < 0,01$), так и с альтернативных промоторов LINE-1 (*NUP153* – $R = -0,46$, $p = 0,03$; *YWHAB* – $R = -0,66$, $p = 0,001$).

Заключение

Повышение индекса метилирования LINE-1 в плаценте спонтанных абортусов может приводить к снижению экспрессии генов не только с альтернативных промоторов, но и с канонических. В дальнейшем данный процесс можно рассматривать как причину, влияющую на нормальный эмбриогенез.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-10026.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Robinson W.P., Price E.M.* The human placental methylome // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015. Vol. 5(5).
2. *Schroeder D.L., Blair J.D., Lott P., Yu H.O., Hong D., Cray F., Ashwood P., Walker C., Korfl, Robinson W.P. et al.* The human placenta methylome // *Proc Natl Acad Sci* 2013. Vol. 110. P. 6037–6042.
3. *Price E.M., Cotton A.M., Peñaherrera M.S., McFadden D.E., Kobor M.S., Robinson W.* Different measures of «genome-wide» DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues // *Epigenetics.* 2012. Vol. 7. P. 652–663.
4. *He Z.M., Li J., Hwa Y.L., Brost B., Fang Q., Jiang S.W.* Transition of LINE-1 DNA methylation status and altered expression in first and third trimester placentas // *PLoS One.* 2014. Vol. 9(5). P. e96994.
5. *Criscione S.W., Theodosakis N., Micevic G. et al.* Genome-wide characterization of human L1 antisense promoter-driven transcripts // *BMC Genomics.* 2016. Vol. 17. P. 463.
6. *Criscione S.W., Teo Y.V., Neretti N.* The Chromatin Landscape of Cellular Senescence // *Trends Genet.* 2016. Vol. 32(11). P. 751–761.
7. *Bilir S., Kojidani T., Mori C., Osakada H., Kobayashi S., Koujin T., Hiraoka Y., Haraguchi T.* Roles of Nup133, Nup153 and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis // *Genes Cells.* 2019. Vol. 24(5). P. 338–353.
8. *Souquet B., Freed E., Berto A. et al.* Nup133 Is Required for Proper Nuclear Pore Basket Assembly and Dynamics in Embryonic // *Stem Cells.* 2018. Vol. 23(8). P. 2443–2454.
9. *Sasaki Y., Taya Y., Saito K., Fujita K., Aoba T., Fujiwara T.* Molecular contribution to cleft palate production in cleft lip mice // *Congenit Anom (Kyoto).* 2014. Vol. 54(2). P. 94–9.

СТРУКТУРА CNV ПРИ ПРИВЫЧНОМ И СПОРАДИЧЕСКОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Г.В. Дроздов, А.А. Кашеварова, Т.В. Никитина, Е.Н. Толмачева, Е.А. Саженова, Е.А. Фонова, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

В качестве одной из возможных причин невынашивания беременности долгое время рассматриваются вариации числа копий участков ДНК (Copy number variations, CNV). Однако до сих пор не выявлено строгой ассоциации между CNV и невынашиванием беременности. Нами было исследовано 7 абортусов с эуплоидным кариотипом из группы ПНБ и 4 из группы СНБ методом aCGH. Всего было обнаружено 113 CNV (77 в группе ПНБ, 36 в группе СНБ). Для CNV из группы ПНБ было характерно преобладание дупликаций над делециями, преимущественное возникновение *de novo*, больший размер и количество затронутых генов по сравнению с группой СНБ. Для CNV из группы СНБ соотношения дупликаций к делециям и *de novo* к унаследованным вариантам было равным. При определении клинической значимости CNV в обеих группах были обнаружены патологические варианты, приводящие к нарушениям развития нервной системы. В группе ПНБ соотношение вариантов с неизвестным значением и полиморфизмом было равным. В группе СНБ преобладали полиморфные варианты. Анализ обогащения показал значимыми следующие категории: аномальная эпигенетическая регуляция экспрессии генов и гибель эмбриона во время органогенеза с неполной пенетрантностью для ПНБ. На основании полученных данных можно предположить, что CNV играют большую роль в патогенезе привычного невынашивания беременности, чем в спорадических случаях.

Ключевые слова: Вариации числа копий участков ДНК; невынашивание беременности; спонтанный аборт.

STRUCTURE OF CNV IN CASES OF SPORADIC AND RECURRENT PREGNANCY LOSS

G.V. Drozdov, A.A. Kashevarova, T.V. Nikitina, E.N. Tolmacheva,
E.A. Sazhenova, E.A. Fonova, I.N. Lebedev

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

Abstract

For a long time CNVs has been considered to be one of causative factors for pregnancy loss. However, there is still no strong association between CNVs and miscarriage. In total we analyzed 7 abortions with a balanced karyotype from the RPL group and 4 from the SPL group by aCGH. Altogether 113 CNVs were found (77 in RPL group, 36 in SPL group). CNVs from the RPL group were characterized by a predominance of duplications over deletions, prevalence of *de novo* variants over inherited ones, and a larger size and number of affected genes compared to the SPL group. For CNVs from the SNB group, the ratio of duplications to deletions and *de novo* to inherited variants was equal. While determining the clinical significance pathological variants that lead to neurodevelopment disorders were found in both groups. In RPL group ratio of variants of uncertain significance and polymorphisms were equal. In SPL group polymorphisms were more prevalent. Enrichment analysis showed significant categories of abnormal epigenetic regulation of gene expression and embryonic lethality during organogenesis with incomplete penetrance for RPL group. For the SPL group, the significant category was abnormal renal physiology. Based on the obtained data one can be assumed that CNVs play a greater role in the pathogenesis of recurrent miscarriage than in sporadic cases.

Keywords: Copy number variations (CNV); pregnancy loss; spontaneous abortion.

Актуальность. Частота невынашивания беременности составляет от 10 до 25 % [1]. Причинной данного исхода беременности могут быть хромосомные аномалии, аутоиммунные и соматические заболевания матери. Примерно в половине случаев причина остается неизвестной. Одним из возможных этиологических факторов являются вариации числа копий участков ДНК (Copy number variation, CNV), для которых уже была показана ассоциация с заболеваниями развития нервной системы и врожденными пороками развития. На данный момент имеется ряд публикаций [2–14], в которых было проанализировано 7 732 абортуса методами aCGH и NGS на наличие CNV. Всего было найдено 980 CNV неизвестного клинического значения. Происхождение было установлено для 130 из них: 85 (65,4 %) были унаследованы от матери, 34 (26,2 %) от отца, 11 (8,4 %) возникли *de novo*. Ни одна CNV не имела строгой ассоциации с невынашиванием беременности. Сравнительный анализ CNV у абортусов и их родителей с диагнозами привычное (ПНБ) и спорадического (СНБ) невынашивания беременности может более точно показать связь между CNV и невынашиванием беременности как со стороны эмбриона, так и их родителей.

Цель исследования – провести сравнительный анализ спектра и структуры CNV у абортусов и их родителей с диагнозами спорадического и привычного невынашивания беременности.

Материал и методы

В исследование были включены 7 абортусов и их родителей из группы ПНБ и 4 из СНБ. Средний срок гестации составил $7,9 \pm 2,2$ нед. Возраст родителей в среднем составил $30,8 \pm 5,4$ года для матерей и $30,5 \pm 4,2$ года для отцов. Анеуплоидия была исключена стандартным цитогенетическим исследованием. STR-гаплотипирование на ген *SRY* было проведено для исключения материнской контаминации. Все образцы были обследованы методом array-CGH с помощью чипов SurePrint G3 Human CGH+SNP $4 \times 180K$ microarrays (Agilent Technologies, США). Полученные данные были проанализированы с помощью баз данных Database of Genomic Variants (DGV) и Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER). Анализ обогащения был проведен с помощью ресурса Enrichr по онтологии Фенотип млекопитающих. Значимыми считались категории со значением $p < 0,05$

Результаты

У 7 абортусов из группы ПНБ и 4 из группы СНБ было обнаружено 77 и 36 CNV соответственно. Размер CNV варьировал от 0,45 кб до 4,5 Мб в группе ПНБ (со средним значением 308,45 кб), в группе СНБ – от 0,13 кб до 2,5 Мб (со средним значением 193,62 кб).

В группе ПНБ наблюдалась тенденция к увеличению частоты дупликаций по отношению к делециям (52:24) в сравнении с группой СНБ (21:15) ($p=0,4$). Данное соотношение было характерно для пяти из семи абортусов из группы ПНБ и для двух из четырех из группы СНБ. CNV, возникшие *de novo*, преобладали над унаследованными в группе ПНБ (55:21) и СНБ (19:17) ($p<0,05$). Данные результаты позволяют предположить, что в случаях привычного невынашивания могут присутствовать общие генетические/эпигенетические факторы, предрасполагающие к появлению CNV в первичных половых клетках или на ранних этапах дробления бластомеров. Среди унаследованных вариантов в группе ПНБ было пятнадцать материнских и пять отцовских CNV, в то время как в группе СНБ - десять и семь ($p=0,48$) соответственно. В CNV из группы ПНБ было суммарно вовлечено 186 уникальных генов, в то время как в группе СНБ—67. По результатам анализа обогащения значимыми категориями для ПНБ оказались аномальная эпигенетическая регуляция экспрессии генов MP:0012167 (*GNAS*, *H19*, *IGF2*, *PEG3*) ($p < 0,05$) и гибель эмбриона во время органогенеза с неполной пенетрантностью MP:0011108 (*SHH*, *TH*, *PEG3*, *TSC2*, *SMN1*, *PKD1*, *ABCD1*) ($p < 0,05$). В группе ПНБ было обнаружено 37 вариантов с неясным клиническим значением и 35 полиморфизмов. В группе СНБ эти значения составили 10 и 21 соответственно ($p=0,09$). В обеих группах были обнаружены патогенные варианты, ассоциированные с нарушениями развития нервной системы у детей (*del22q13*, *dupXq28* в группе ПНБ, *dup16p11.2* в группе СНБ). Предположительно эти CNV могут объяснить высокий риск рождения ребенка с нарушением развития нервной системы у женщин с невынашиванием беременности [15].

Заключение

Для CNV из группы ПНБ характерно преобладание дупликаций над делециями и *de novo* вариантов над унаследованными. Затронутые ими гены и их вовлеченность в развитие потенциально эмбриолетальных фенотипов могут указывать на большую роль CNV в патогенезе привычного невынашивания беременности по сравнению со спорадическими случаями.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017>.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самигуллина А.Э., Кушубекова А.К. Анализ частоты и структуры невынашивания беременности // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 6.
2. Rajcan-Separovic E., Qiao Y., Tyson C., Harvard C., Fawcett C., Kalousek D., Stephenson M., Philipp T. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects // Molecular Human Reproduction. 2009. Vol. 16, № 2. P. 125–134
3. Rajcan-Separovic E., Diego-Alvarez D., Robinson W.P., Tyson C., Qiao Y., Harvard C., Fawcett C., Kalousek D., Philipp T., Somerville M.J., Stephenson M.D. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // Human Reproduction. 2010. Vol. 25, № 11. P. 2913–2922.
4. Viaggi C.D., Cavani S., Malacarne M., Floriddia F., Zerega G., Baldo C., Moggi M., Castagnetta M., Piombo G., Coviello D.A., Camandona F., Lijoi D., Insego W., Traversa M., Pierluigi M. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH // Journal of Applied Genetics. 2013. Vol. 54, № 3. P. 353–359.
5. Levy B., Sigurjonsson S., Pettersen B., Maisenbacher M.K., Hall M.P., Demko Z., Lathi R.B., Tao R., Aggarwal V., Rabinowitz M. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis // Obstetrics & Gynecology. Vol. 124, № 2. P. 202–209.
6. Sato T., Migita O., Hata H., Okamoto A., Hata K. Analysis of chromosome microstructures in products of conception associated with recurrent miscarriage // Reproductive BioMedicine Online. 2019. Vol. 38, № 5. P. 787–795.
7. Reddy U.M., Page G.P., Saade G.R., Silver R.M., Thorsten V.R., Parker C.B., Pinar H., Willinger M., Stoll B.J., Heim-Hall J., Varner M.W., Goldenberg R.L., Bukowski R., Wapner R.J., Drews-Botsch C.D., O'Brien B.M., Dudley D.J., Levy B. Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth // The New England Journal of Medicine. 2012. Vol. 367, № 23. P. 2185–2193.
8. Liu S., Song L., Cram D.S., Xiong L., Wang K., Wu R., Liu J., Deng K., Jia B., Zhong M., Yang F. Traditional karyotyping vs copy number variation sequencing for detection of chromosomal abnormalities associated with spontaneous miscarriage // Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2012. Vol. 46, № 4. P. 472–477.
9. Zhou Q., Wu S., Amato K., DiAdamo A., Li P. Spectrum of Cytogenomic Abnormalities Revealed by Array Comparative Genomic Hybridization on Products of Conception Culture Failure and Normal Karyotype Samples // Journal of Genetics and Genomics. 2016. Vol. 43, № 3. P. 121–131.
10. Wang Y., Li Y., Chen Y., Zhou R., Sang Z., Meng L., Tan J., Qiao F., Bao Q., Luo D., Peng C., Wang Y.S., Luo C., Hu P., Xu Z. Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss // Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2020. Vol. 55, № 1. P. 96–104.
11. Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Никитина Т.В., Лопаткина М.Е., Саженова Е.А., Жигалина Д.И., Савченко Р.Р., Лебедев И.Н. Онтогенетическая плейотропия генов, вовлеченных в CNV у спонтанных абортусов человека // Генетика. 2019. Т. 55, № 10, С. 1158–1171.
12. Rosenfeld J.A., Tucker M.E., Escobar L.F., Neill N.J., Torchia B.S., McDaniel L.D., Schultz R.A., Chong K., Chitayat D. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss // Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2015. Vol. 46, № 4. P. 478–486.
13. Kasak L., Rull K., Söber S., Laan M. Copy number variation profile in the placental and parental genomes of recurrent pregnancy loss families // Scientific Reports. 2017.
14. Luo S., Chen X., Yan T., Ya J., Xu Z., Cai P., Yuan D., Tang N. Application of Copy Number Variation Sequencing in Genetic Analysis of Miscarriages in Early and Middle Pregnancy // Cytogenetic and Genome Research. 2020. Vol. 160, № 11–12. P. 634–642.
15. Ji H., Yu Y., Miao M., Qian X., Yuan W., Lin Y., Liang H., Li Jiong. Risk of intellectual disability and maternal history of spontaneous abortion: a nationwide cohort study // Developmental Medicine & Child Neurology. 2014. Vol. 63, № 7. P. 831–838.

РОЛЬ ГЕНОВ *IL1A* И *IL1B* В ФОРМИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ В ОБЪЕМЕ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ

**Р.Ф. Еникеева^{1,4}, А.В. Казанцева^{1,4,5}, Ю.Д. Давыдова¹, Р.Н. Мустафин²,
З.Р. Тахирова⁴, М.М. Лобаскова³, А.Г. Абушахмина⁴, К.С. Федореева⁴,
С.Б. Малых³, Э.К. Хуснутдинова^{1,4}**

Институт биохимии и генетики ФГБУ УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия¹

ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Уфа, Россия²

ФГБ НУ Психологический институт Российской академии образования, г. Уфа, Россия³

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия⁴

ФГБОУ ВО Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа, Россия⁵

Аннотация

Одной из наиболее важных функций познавательной (когнитивной) деятельности является рабочая память – удержание и манипулирование информацией в течение времени, необходимого для решения когнитивных задач и выполнения актуальной деятельности. Роль рабочей памяти особенно существенна на начальном этапе обучения. Она является необходимой составляющей процессов, лежащих в основе чтения и письма, поскольку от объема рабочей памяти зависит количество символов и понятий, которыми можно оперировать в единицу времени для достижения лучшего понимания текста в целом. Согласно данным близнецовых исследований, значительная часть дисперсии объема рабочей памяти связана с генетическими факторами: оценки наследуемости варьируют от 50 до 65 %. В литературе показано, что одним из молекулярно-генетических механизмов, регулирующих работу памяти, является иммунная система организма. В связи с этим **целью данного исследования** стала оценка основного эффекта полиморфных локусов генов *IL1A* и *IL1B*, а также эффекта ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных различий в объеме рабочей памяти на выборке здоровых индивидов. В исследовании приняли участие 1 011 индивидов (80 % испытуемых были женского пола; средний возраст составил 19,79±1,69 года) различной этнической принадлежности (535 русских, 231 татар, 160 удмуртов и 85 лиц смешанной этнической принадлежности). Объем рабочей памяти измерялся при помощи компьютеризированного теста «Последовательности». Генотипический анализ проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке. Статистическая обработка проводилась при помощи линейного регрессионного анализа с использованием программы Plink v.1.09. Результаты линейного регрессионного анализа свидетельствуют об ассоциации минорного аллеля локуса *rs1800587* гена *IL1A* с высоким объемом рабочей памяти в группе лиц с низким уровнем дохода в семье ($p < 0,001$; $\beta = 1,877$).

Ключевые слова: рабочая память, гены регуляции воспалительного ответа организма, интерлейкин 1, анализ генов-кандидатов.

THE ROLE OF *IL1A* AND *IL1B* GENES IN INDIVIDUAL DIFFERENCES IN WORKING MEMORY

**R.F. Enikeeva^{1,4}, A.V. Kazantseva^{1,4,5}, Yu.D. Davydova¹, R.N. Mustafin²,
Z.R. Takhirova⁴, M.M. Lobaskova³, A.G. Abushakhmina⁴, K.S. Fedoreeva⁴,
S.B. Malых³, E.K. Khusnutdinova^{1,4}**

Institute of Biochemistry and Genetics of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia¹

Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Ufa, Russia²

Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Ufa, Russia³

Bashkir State University, Ufa, Russia⁴

Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia⁵

Abstract

One of the most important functions of cognitive activity is working memory - retention and manipulation of information during the time necessary to solve cognitive tasks and perform relevant activities. The role of

working memory is especially important at the initial stage of learning. It is a necessary component of the processes underlying reading and writing, since the amount of working memory depends on the number of characters and concepts that can be operated on per unit of time to achieve a better understanding of the text. According to twin studies, a significant part of the variance in the amount of working memory is associated with genetic factors: heritability estimates vary from 50 to 65 %. It has been shown in the literature that one of the molecular genetic mechanisms regulating the work of memory is the immune response of the organism. In this connection, the purpose of this study was to evaluate the main effect of polymorphic loci of the *IL1A* and *IL1B* genes, as well as the effect of gene-environment interactions in the formation of individual differences in the amount of working memory in a sample of healthy individuals. The study involved 1011 individuals (80 % of the subjects were female; the average age was 19,79± 1,69 years) of various ethnicities (535 Russians, 231 Tatars, 160 Udmurts and 85 persons of mixed ethnicity). The amount of working memory was measured using a computerized test «Corsi block-tapping test». Genotypic analysis was performed by real-time PCR on a CFX96 amplifier (BioRad, USA) with the possibility of fluorescence analysis at the endpoint. Statistical processing was carried out using linear regression analysis using the Plink v.1.09 program. The results of linear regression analysis indicate the association of the minor allele of the *rs1800587* locus of the *IL1A* gene with a high amount of working memory in the group of people with low income in the family ($p < 0,001$; $\beta=1,877$).

Key words: working memory, immune response of the organism, interleukin 1, analysis of candidate genes.

Актуальность. Под когнитивными функциями принято понимать наиболее сложные функции головного мозга, включающие в себя восприятие, обработку, анализ, запоминание, хранение и обмен информацией, а также построение и осуществление программы действий. Рабочая память играет существенную роль во всех когнитивных функциях, включая внимание и исполнительные функции, а также уровень интеллекта. Актуальность изучения рабочей памяти определяется, прежде всего, ее ролью в процессах обучения, которая показана в целом ряде психологических работ. Например, было показано, что такая характеристика рабочей памяти, как объем, непосредственно влияет на формирование индивидуальных различий по целому спектру показателей успешности в обучении – от освоения родного языка до математики [1]. Отмечается также, что индивидуальные различия в рабочей памяти объясняют до половины индивидуальных различий по показателю общего интеллекта, что, в конечном счете, влияет на общую академическую успешность [2]. В психогенетических исследованиях, направленных на количественную оценку генетических и средовых факторов, выявлено, что значительная часть дисперсии объема рабочей памяти связана с генетическими факторами: оценки наследуемости варьируют от 50 до 65 %, в том числе в зависимости от сложности предъявляемых заданий и возраста участников [3]. Одной из перспективных биологических систем, принимающих участие в развитии индивидуальных различий в объёме рабочей памяти, может являться иммунная система организма. Известно, что при воспалительных процессах в мозге цитокины – сигнальные молекулы иммунной системы – оказывают нейротропное действие, позволяя нормально функционировать сети нейронов. Например, противовоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-1, регулируют функцию нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и психических расстройствах. Эффекты этих веществ связаны в основном с модуляцией ионотропных рецепторов, которые чувствительны к глутамату – возбуждающему нейромедиатору. В рамках данной работы был проведен анализ ассоциаций двух локусов генов, белковые продукты которых принимают участие в регуляции воспалительного ответа в центральной нервной системе (*IL1A rs1800587* и *IL1B rs16944*).

Цель исследования – оценка основного эффекта полиморфных локусов генов *IL1A* и *IL1B*, а также эффекта ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных различий в объёме рабочей памяти на выборке здоровых индивидов.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 1 011 индивидов (80 % испытуемых были женского пола; средний возраст составил 19,79±1,69 года) различной этнической принадлежности (535 русских, 231 татар, 160 удмуртов и 85 лиц смешанной этнической принадлежности). Все участники являлись студентами университетов Республики Башкортостан и Республики Удмуртия. Участники отрицали у себя наличие наследственной отягощенности по психическим заболеваниям и дали добровольное согласие на участие в исследовании. В качестве материала для исследования служили образцы ДНК, выделенные из венозной крови участников по методу Mathew [4]. Объем рабочей памяти измерялся при помощи компьютеризированного теста «Последовательности» («Corsi Block-Tapping Task», [5])

из интернет-версии тестовой батареи «Когнитивные характеристики» [6]. Генотипирование полиморфных вариантов генов *IL1A rs1800587* и *IL1B* проводили методом ПЦР с флуоресцентной детекцией («BioRad», США). Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга использовался модифицированный критерий χ^2 , определяемый с помощью программы RxC на основе алгоритма, описанного D. Roff и P. Bentzen (1989) [7]. Проверка на подчинение количественных данных нормальному распределению (распределению Гаусса) проводилась с помощью W-теста Шапиро–Уилка: при уровне значимости p большем, чем 0,05, распределение считалось близким к нормальному. Так как результаты генотипирования свидетельствуют о небольшой частоте отдельных генотипов, то для избегания получения ошибки первого рода исследование фенотипических различий в уровне объема рабочей памяти было проведено в двух группах в зависимости от генотипа. Разделение на группы осуществлялось по принципу: носители минорных аллелей против гомозигот по мажорному аллелю. Для оценки основного эффекта полиморфных локусов генов-кандидатов в вариации объема рабочей памяти был проведен линейный регрессионный анализ в программе PLINK v.1.09 с включением половой принадлежности в качестве ковариаты.

Результаты

Для полиморфных вариантов *IL1A rs1800587* и *IL1B rs16944* наблюдалось соответствие эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Значения показателей объема рабочей памяти в изученной выборке подчинялись закону нормального распределения ($W=0,98$; $p=0,16$). При линейном регрессионном анализе не было выявлено ассоциации полиморфных локусов *IL1A rs1800587* и *IL1B rs16944* с объемом рабочей памяти на общей выборке. Однако дальнейший анализ ген-средовых взаимодействий позволил выявить модулирующий эффект такого социодемографического параметра, как уровень дохода в семье, на ассоциацию *IL1A rs1800587* с вариациями в уровне рабочей памяти ($p < 0,001$; $\beta=1,877$). А именно, у носителей аллеля *rs1800587*A* был показан больший объем рабочей памяти среди индивидов, воспитывающихся в семьях с низким доходом. Согласно литературным данным, полиморфный локус *rs1800587* расположен в регуляторной области гена *IL1A*. Наличие аллеля *rs1800587*A*, ассоциированного в данном исследовании с более высоким объемом рабочей памяти, приводит к повышенной экспрессии гена *IL1A*.

Заключение

Показано, что полиморфный локус *rs1800587* гена рецептора *IL1A*, вовлеченного в регуляцию воспалительного ответа организма, ассоциирован с фенотипическими вариациями в объеме рабочей памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Республики Башкортостан соглашение №1 от 28 декабря 2021 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербицкая Л.А., Зинченко Ю.П., Малых С.Б., Тихомирова Т.Н. Когнитивные основы успешности обучения русскому языку: кросскультурное исследование // Вопросы психологии. 2017. № 1. С. 26–40.
2. Еникеева Р.Ф., Лобаскова М.М., Казанцева А.В., Романова А.Р., Карунас А.С., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К., Тихомирова Т.Н. Роль генов регуляции синаптической пластичности в формировании индивидуальных различий в объеме рабочей памяти // Теоретическая и экспериментальная психология. 2017. Т. 10, № 4. С. 6–15.
3. Kremen W.S., Jacobsen K.C., Xian H., Eisen S.A., Eaves L.J., Tsuang M.T., & Lyons M.J. Genetics of verbal working memory processes: A twin study of middle-aged men // Neuropsychology. 2007. Vol. 21, № 5. P. 569–580.
4. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Molecular Biology. 1984. Vol. 2. P. 31–34.
5. Pagulayan K.F., Busch R.M., Medina K.L. et al. Developmental normative data for the Corsi Block-Tapping task // Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology. 2006. Vol. 28, № 6. P. 1043–1052.
6. Tosto M.G., Tikhomirova T., Galajinsky E., Akimova K., Kovas Y. Development and Validation of a Mathematics-number sense Web-based Test Battery // Procedia – Social and Behavioral Sciences. 2013. Vol. 86. P. 423–428.
7. Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA: 2 and problem of small samples // Molecular Biology and Evolution. 1989. Vol. 6. P. 539–545.

ОСОБЕННОСТИ АССОЦИИАЦИИ ГЕНОВ *TNF* И *CXCL10* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

И.Ж. Жалсанова¹, Н.П. Бабушкина¹, О.В. Колоколова², Е.Ю. Брагина¹

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия²

Аннотация

В настоящее время туберкулез (ТБ) остается одной из глобальных проблем здравоохранения. Треть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis* и более 9 млн новых случаев туберкулеза регистрируется каждый год. Известно, что наследственность является существенным фактором в развитии заболевания и его фенотипических особенностей. **Цель настоящего исследования** состояла в исследовании ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов *IL10*, *TNFA*, *TNFB*, *IL8*, *IL1B*, *TNFRSF1B*, *CXCL10*, *SLC11A1* с развитием ТБ легких в зависимости от периода тубинфицирования (первичный и вторичный ТБ). **Материал и методы.** Генотипирование выполнено у 421 больных ТБ легких (первичный ТБ: n=125; вторичный ТБ: n=296), с использованием ПЦР-ПДРФ-анализа и ПЦР в режиме реального времени. **Результаты.** Установлена ассоциация вариантов rs2239704 гена *TNF* и rs56061891 гена *CXCL10* с развитием вторичного ТБ.

Ключевые слова: туберкулез легких, период тубинфицирования, предрасположенность, ген, полиморфизм.

FEATURES OF *TNF* AND *CXCL10* GENE ASSOCIATIONS DEPENDING ON THE PULMONARY TUBERCULOSIS CLINICAL POLYMORPHISM.

I.Zh. Zhalsanova¹, N.P. Babushkina¹, O.V. Kolokolova², E.Yu. Bragina¹

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Abstract

Tuberculosis (TB) remains one of the global health problems today. One-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* and more than 9 million new cases of tuberculosis are registered every year. It is known that not only external factors but also genetic susceptibility play an important role in the development of the phenotypic features of TB. The aim of this study was to determine associations between primary and secondary pulmonary tuberculosis and polymorphisms of candidate genes *IL10*, *TNFA*, *TNFB*, *IL8*, *IL1B*, *TNFRSF1B*, *CXCL10*, *SLC11A1*. **Material and methods.** 421 TB patients were examined, including 125 patients with primary TB and 296 with secondary TB. Genotyping was performed using PCR-RFLP analysis and real-time PCR. Results. An association between the rs2239704 of the *TNF* gene and rs56061891 of the *CXCL10* gene with secondary tuberculosis. The obtained results suggested that the *TNF* and *CXCL10* genes are associated with predisposition to secondary form of tuberculosis infection in the Russian population.

Key words: tuberculosis pulmonary, primary tuberculosis, secondary tuberculosis, gene, polymorphism.

Актуальность. Туберкулез (ТБ) – хроническое инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis*. По данным Всемирной организации здравоохранения, ТБ остается в числе 10 основных причин смерти во всем мире [1]. Известно, что заражения человека микобактерией туберкулеза недостаточно для того, чтобы ТБ перешел в клиническую форму. Только около 10 % инфицированных заболевают в активной форме, в

то время как остальные остаются латентно инфицированными. Туберкулез классифицируют как первичный, если начало заболевания приходится на первый год после первичного инфицирования. Первичный туберкулез чаще всего встречается у младенцев и детей до 5 лет, у взрослых доля первичного ТБ составляет до 34 % всех случаев заболевания [2]. Постпервичный, также известный как взрослый тип или вторичный туберкулез, включает реактивацию, если заболевание началось более чем через 1 год после первоначального заражения.

Генетические факторы индивида, играют важную роль как в определении предрасположенности к ТБ, так и формировании клинических особенностей заболевания, такие как тяжесть, локализация и исход. Среди наиболее важных генов, связанных с развитием ТБ, прежде всего гены макрофагального белка, ассоциированного с естественной резистентностью (*NRAMP1*), главного комплекса гистосовместимости (*HLA-DRB1*), манноза-связывающего лектина (*MBL*), Toll-подобных рецепторов (в большей степени *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* и *TLR9*) и др. [3–5].

Поскольку воздействие микобактерии вызывает каскад специфических реакций, направленных на сдерживание патогена, то нарушение функционирования белков, участвующих в этих процессах, может специфическим образом способствовать развитию первичного или вторичного ТБ. Так, функционирование основных мембранных клеточных рецепторов, участвующих в захвате *M. tuberculosis*, включая макрофагальный маннозный рецептор (CD206), рецептор комплемента 3 (CD11b/CD18), мембранный рецептор семейства лектинов С-типа (CD209), Toll-подобные рецепторы (в большей степени *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* и *TLR9*), вероятно, могут быть связаны с развитием первичной формы заболевания. Для развития вторичного ТБ наибольший интерес представляют гены, кодирующие белки воспалительной реакции, включая провоспалительные цитокины (преимущественно *TNF*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-10* и *IL-18*) и хемокины (*CXCL8*, *MCP-1*, *RANTES*, *CXCL10*).

В настоящем исследовании изучены ассоциации полиморфных вариантов генов *IL10*, *TNFA*, *TNFB*, *IL8*, *IL1B*, *TNFRSF1B*, *CXCL10*, *SLC11A1* в связи с развитием первичного и вторичного ТБ.

Материал и методы

В работе было изучено 421 пациента (274 мужчин, средний возраст – 29,9 года, 147 женщины, средний возраст – 29,6 года) с диагнозом ТБ легких, среди которых 125 пациентов с первичным ТБ (67 мужчин, средний возраст – 29,7 года, 58 женщин, средний возраст – 29,6 года) и 296 с вторичным ТБ (207 мужчин, средний возраст – 30,1 года, 89 женщин, средний возраст – 29,7 года). Группа контроля представлена практически здоровыми индивидами (n=576), среди которых 206 мужчин, средний возраст – 39,8 года и 361 женщина, средний возраст – 40,0 года. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ медицинской генетики (протокол № 4 от 21.11.2016 г.). Для всех участников получены информированные согласия.

Для ассоциативного анализа были выбраны 14 однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) в 8 генах: *IL10* – rs1800872, *TNF* – rs2239704 и rs1800629, *IL8* – rs4073, *IL1B* – rs1143627 и rs16944, *TNFRSF1B* – rs652625, rs525891 и rs603151, *CXCL10* – rs4386624, rs4256246 и rs56061891, *SLC11A1* – rs2276631 и rs2695343. Генотипирование ДНК образцов проводилось методами ПЦР-ПДРФ и ПЦР в режиме реального времени. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, полиморфизмы, не соответствующие равновесию, были исключены из дальнейшего анализа. Анализ ассоциации исследуемых вариантов с исследуемыми заболеваниями проводился путем сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых индивидов с использованием критерия χ^2 . Расчет величины отношения шансов (OR) и доверительных интервалов (95 % CI) в отношении риска развития заболевания вычисляли с помощью калькулятора, доступного онлайн (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Значимыми считали различия (p-value) <0,05.

Результаты

Различные исследования показали, что некоторые люди более подвержены риску развития активного ТБ, чем другие. У большинства инфицированных после заражения развивается эффективный клеточный иммунитет, который прекращает дальнейшее размножение микобактерии, однако у некоторых людей возбудитель не уничтожается полностью ввиду ослабленного иммунитета. Такие факторы, как курение, сахарный диабет, кортикостероидная терапия или другие инфекционные заболевания, например ВИЧ-инфекция, могут снизить резистентность организма и привести к развитию вторичного ТБ. Различия в иммунном статусе пациента, обусловленные структурными нарушениями в последовательности генов,

могут лежать в основе клинического полиморфизма ТБ. В результате исследования выявлено, что ген фактора некроза опухоли *TNF* и хемокин *CXCL10* ассоциированы с развитием вторичного ТБ. Частота минорного аллеля С полиморфного варианта rs2239704 гена *TNF* преобладала среди пациентов с вторичным ТБ (52,0 %) по сравнению со здоровыми индивидами (43,0 %; $p=0,004$) (таблица). Отношение шансов (OR) для развития вторичного ТБ у носителей аллеля С составляет 1,43 (95 % CI: 1,13–1,83; $p=0,003$), свидетельствуя о рисковой значимости этого аллеля. Известно, что *TNF* является важным цитокином в патогенезе туберкулеза, поскольку он играет роль в формировании и поддержании гранулемы [6]. Сывороточный уровень *TNF* значительно повышен у пациентов с поздней формой туберкулеза по сравнению с уровнями пациентов с легкой формой и здоровых [7]. Этот белок также опосредует широкий спектр воспалительных, иммуностимулирующих и противовирусных реакций.

Полиморфный вариант rs56061891 гена *CXCL10* также ассоциирован только с вторичным ТБ. Частота аллеля А в целом невысока как среди пациентов с различными формами заболевания, так и среди здоровых (см. таблицу). Однако в группе пациентов с вторичным ТБ частота аллеля А практически в два раза выше (7,0 %) по сравнению с контрольной группой (4,0 %; $p=0,008$) (таблица), соответственно, риск развития вторичного ТБ значительно выше у носителей аллеля А (OR=1,88 (95 % CI: 1,19–2,97; $p=0,007$)). Ген *CXCL10* кодирует белок, индуцируемый хемокиновым интерфероном- γ 10, является членом семейства хемокинов СХС. Активация семейства хемокинов приводит к плеiotропным эффектам, включая стимуляцию моноцитов, миграцию естественных киллеров и Т-клеток и модуляцию экспрессии молекул адгезии.

Ассоциации полиморфных вариантов генов с развитием заболеваний в группах первичного ТБ, вторичного ТБ, контроля

Ген	SNP	Генотип	Первичный ТБ, n, доли	Вторичный ТБ, n, доли	Контроль, n, доли	p-value Первичный ТБ/Контроль	p-value Вторичный ТБ/Контроль
<i>TNFB</i>	rs2239704	a/a	17 (0,29)	59 (0,24)	104 (0,36)	0,466	0,011
		a/c	29 (0,49)	115 (0,47)	120 (0,41)		
		c/c	13 (0,22)	71 (0,29)	66 (0,23)		
		MAF: C	55 (0,47)	257 (0,52)	252 (0,43)		
<i>CXCL10</i>	rs56061891	g/g	77(0,93)	244(0,87)	451(0,93)	0,841	0,029
		g/a	6(0,07)	34(0,12)	34(0,07)		
		a/a	0(0)	3(0,01)	2(0)		
		MAF: A	6(0,04)	40(0,07)	38(0,04)		

Заключение

Таким образом, изученные полиморфные варианты в генах *TNF* (rs2239704) и *CXCL10* (rs56061891) влияют на восприимчивость к вторичной форме ТБ и, несмотря на то, что ассоциированные гены важны для эффективного иммунного ответа на воздействие микобактерии, все еще мало данных об их влиянии на патогенез ТБ, и данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ №15-04-05852 и Комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН (№ 0550-2018-0003).

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization (2020) Global tuberculosis report 2020, Geneva. Available via <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf> Accessed 24 April 2021
2. Restrepo C.S., Katre R., Mumbower A. Imaging manifestations of thoracic tuberculosis // Radiol Clin North Am. 2016. Vol. 54. P. 453–473. doi: 10.1016/j.rcl.2015.12.007
3. Brown D.H., Miles B.A., Zwilling B.S. Growth of Mycobacterium tuberculosis in BCG-resistant and -susceptible mice: establishment of latency and reactivation // Infection and immunity. 1995. Vol. 63 № 6. P. 2243–2247.
4. Tong X., Chen L., Liu S., Yan Z., Peng S., Zhang Y., Fan H. Polymorphisms in HLA-DRB1 gene and the risk of tuberculosis: a meta-analysis of 31 studies // Lung. 2015. №. 193. P. 309–18. doi: 10.1007/s00408-015-9692-z
5. Turner M.W., Hamvas R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations // Rev Immunogenet. 2000. Vol. 2. № 3. P. 305–22.
6. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // Annu Rev Immunol. 2001. Vol. 19. P. 93–129.
7. Fiorenza G., Rateni L., Farroni M.A., Bogue C., Dlugovitzky D.G. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity // Immunol Lett. 2005. №. 98. P.45–48.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК БЛАСТОЦИСТ ЧЕЛОВЕКА

Д.И. Жигалина¹, О.Р. Канбекова², В.А. Шитов³, А.А. Зарубин¹, А.А. Сивцев¹,
Е.В. Денисов⁴, Т.С. Геращенко⁴, М.Е. Меняйло⁴, Н.А. Скрябин¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

ОГАУЗ «Областной перинатальный центр», г. Томск, Россия²

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия³

НИИ онкологии Томский НИМЦ, г. Томск, Россия⁴

Аннотация

В связи с развитием методов секвенирования РНК был накоплен значительный массив данных относительно изменения профиля экспрессии у эмбрионов человека с этапа дробления до стадии бластоцисты. Тем не менее, отсутствует информация о дифференциальной экспрессии между бластоцистами 5–7 дня развития. **Целью настоящей работы** стало выявление особенностей экспрессии бластоцист человека 5–7-го дня эмбрионального развития. В исследование включено 9 криоконсервированных бластоцист человека 5–7-го дня развития. Каждый эмбрион был разделен на внутреннюю клеточную массу и трофэктодерму, которые дополнительно были поделены на клеточные фрагменты ($n = 37$). Подготовка библиотек была проведена с помощью коммерческого набора QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen). Секвенирование осуществлялось с помощью приборов NextSeq 550 и NextSeq 2000 (Illumina). По результатам исследования было продемонстрировано увеличение экспрессии генов, кодирующих рибосомальные белки, в бластоцистах при переходе от 5-го к 7-му дню эмбрионального развития ($FDR < 0,001$). В то же время экспрессия генов семейства TSPY в бластоцистах 6-го дня развития ниже по сравнению с бластоцистами 5-го дня ($p = 0,01$).

Ключевые слова: Бластоциста человека, секвенирование РНК, экспрессия, преимплантационное развитие.

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF SINGLE CELLS OF HUMAN BLASTOCYSTS

D.I. Zhigalina¹, O.R. Kanbekova², V.A. Shitov³, A.A. Zarubin¹, A.A. Sivtsev¹,
E.V. Denisov⁴, T.S. Gerashchenko⁴, M.E. Menyailo⁴, N.A. Skryabin¹

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

Tomsk Regional Perinatal center, Tomsk, Russia²

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia³

Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia⁴

Abstract

Due to the development of RNA sequencing techniques, a lot of data has been accumulated about the change in the expression profile in human embryos from the cleavage stage to the blastocyst stage. However, there is no information on differential expression between blastocysts on days 5 and 7 of development. This work aimed to identify the features of the expression of human blastocysts on days 5, 6, and 7 of embryonic development. The study included 9 cryopreserved human blastocysts 5-7 days of development. Each embryo was divided into inner cell mass and trophectoderm, which were further separated into fragments ($n = 37$). Libraries were prepared using the QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen). Sequencing was performed using NextSeq 550 and NextSeq 2000 instruments (Illumina). The results of the study revealed an increase in the expression of genes encoding ribosomal proteins during the transition from day 5 to day 7 of embryonic development, which may be associated with an increase in the spectrum and amount of proteins required for further differentiation. At the same time, the expression of TSPY family genes in blastocysts of the 6th day of development is lower compared to the blastocysts of the 5th day.

Key words: human blastocyst, RNA-seq, gene expression, preimplantation development.

Актуальность. Благодаря развитию технологий, позволяющих анализировать транскриптом единичных клеток, в последние годы стала накапливаться информация об экспрессии генов на ранних этапах эмбрионального развития [1, 2]. Так, были оценены различия в экспрессии эмбрионов человека и мыши на этапе дробления, морулы и бластоцисты [3]. Экспрессия клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЭ) эмбрионов на стадии бластоцисты была проанализирована с использованием экспрессионных микрочипов, что позволило определить маркерные транскрипты, специфичные для ВКМ (например, OCT4/POU5F1, NANOG, HMGB1 и DPPA5) и ТЭ (например, CDX2, ATP1B3, SFN и IPL), а также описать метаболические сигнальные пути [4]. Кроме того, было проведено сравнение транскриптомов и полученных на их основе молекулярных кариотипов клеток [2]. В исследовании M. Starostik было показано, что анеуплоидные клетки демонстрируют активацию генов иммунного ответа, а также подавление генов, участвующих в пролиферации, метаболизме и обработке белков, что соответствует ранее описанному ответу на стресс. В своей работе S. Petropoulos et al. представили полную карту изменения транскрипции развивающегося человеческого эмбриона. В рамках исследования были получены транскриптомы 1 529 отдельных клеток от 88 преимплантационных эмбрионов человека. Эти данные показали, что клетки находятся в промежуточном состоянии коэкспрессии генов, за которыми следует параллельное формирование трофэктодермы, эпибласта и линии примитивной энтодермы, которые совпадают с формированием бластоцисты [1]. Тем не менее основная часть этой работы посвящена обсуждению динамики экспрессии X-хромосомы у преимплантационных эмбрионов человека. Несмотря на наличие детальной информации об изменении экспрессии у эмбрионов со стадии 2 клеток и до стадии бластоцисты, данные по дифференциальной экспрессии между бластоцистами 5–7-го дня развития в литературе отсутствуют. В связи с этим, в настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ результатов полнотранскриптомного секвенирования бластоцист человека на 5, 6 и 7-й дни развития.

Цель исследования – выявить особенности экспрессии бластоцист человека 5, 6 и 7-го дня эмбрионального развития.

Материалы и методы

В исследование было включено 9 бластоцист человека 5–7-го дня развития, полученных в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в ОГАУЗ «Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко». Кримоконсервированные эмбрионы были переданы семейными парами в пользу проведения научного исследования после подписания информированного согласия. Всего в исследовании участвовало 6 женщин, средний возраст которых составил $34,7 \pm 1,7$ года. С помощью лазерного микроманипулятора OCTAX Laser Shot (MTG, Германия) бластоцисты были механически разделены на ВКМ и ТЭ ($n = 3$). Для остальных 6 бластоцист каждый образец ВКМ был дополнительно разделен эмбриологом на 2 части, а образец ТЭ – на 3 части. Таким образом, всего было проанализировано 37 образцов. Полученные клетки помещались в микроцентрифужную пробирку, содержащую 3 мкл 1x PBS, и хранились до начала пробоподготовки при температуре -80 °C. Обратная транскрипция, полнотранскриптомная амплификация и подготовка библиотек для секвенирования РНК проводились с помощью коммерческого набора QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen, Germany) по протоколу «Amplification of Poly A+ mRNA». Концентрация кДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen Corporation, США) и коммерческого набора Qubit DNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество отдельных библиотек, а также качество пула проверялись с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, США) и чипов High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). При проведении пробоподготовки был взят протокол получения фрагментов ДНК размером 300 п.о. Секвенирование было произведено с помощью прибора NextSeq 550 (Illumina, США) и коммерческого набора NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) sequencing kit (Illumina, США), а также с помощью прибора NextSeq 2000 (Illumina, США) и коммерческого набора NextSeq 2000 P3 reagents (300 cycles) (Illumina, США). Картирование на эталонный геном GRCh38 было проведено с помощью STAR, таблицы подсчета были получены с использованием featureCounts и проанализированы с помощью DeSeq2 в RStudio.

Результаты

На первом этапе нами были проанализированы наиболее экспрессирующиеся гены во всех исследуемых образцах. К этим генам были отнесены *FGF4*, *GATA6*, *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*, которые экспрессируются в ВКМ, а также гены *KRT7*, *KRT18*, *EOMES*, *CDX2*, *GATA3*,

TEAD4, *CGA*, экспрессия которых характерна для ТЭ. Сравнение бластоцист 7-го дня с бластоцистами 5-го дня развития после оплодотворения позволило выявить 52 дифференциально экспрессирующихся гена, функции которых связаны с установлением локализации белка в эндоплазматическом ретикулуме и мембране, с процессом биосинтеза пептидов и амидов. Большинство генов, сверхэкспрессированных в бластоцистах 6-го и 7-го дня по сравнению с бластоцистами 5-го, кодируют рибосомальные белки ($FDR < 0,001$). Эти гены необходимы для нормального протекания оогенеза, оплодотворения и раннего эмбрионального развития [5]. На основе данных по экспрессии с помощью биоинформатических методов, описанных в литературе ранее, нами был определен пол эмбрионов [6]. В результате было обнаружено 8 эмбрионов мужского пола и 1 женского. Пол двух эмбрионов был подтвержден результатами преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А), проводимого в рамках циклов ЭКО. N.Y. Rho было показано значительное увеличение экспрессии *TSPY* у эмбрионов крупного рогатого скота с 4-клеточной стадии до стадии бластоцисты [7]. В настоящем исследовании экспрессия генов семейства *TSPY* (*TSPY2*, *TSPY3*, *TSPY4*, *TSPY8*, *TSPY10*) была значительно выше в бластоцистах человека 5-го дня развития по сравнению с бластоцистами 6-го дня ($p = 0,01$). Достоверных различий в экспрессии *TSPY* между эмбрионами 6-го и 7-го дней не наблюдалось, однако была обнаружена тенденция к дальнейшему снижению экспрессии *TSPY*. Существует предположение, что гены семейства *TSPY* являются фактором пролиферации половых клеток [8]. Известно, что первичные половые клетки были обнаружены у мышинных эмбрионов через 8,5 дня после оплодотворения [9]. У мышей отделение зародышевой линии начинается в проксимальном отделе эпибласта в небольшой популяции клеток [10]. Полученные нами данные, вероятно, могут указывать на то, что первичные половые клетки начинают специализироваться на более раннем этапе эмбрионального развития – в начале стадии бластоцисты. Стоит отметить, что настоящее исследование имеет ряд ограничений, одним из которых является объем выборки. В связи с этим для подтверждения выявленной тенденции необходимы более масштабные исследования. Кроме того, не исключена взаимная контаминация клеток между ВКМ и ТЭ или между эпибластом, гипобластом и полярными линиями трофэктодермы.

Заключение

Экспрессия генов, кодирующих рибосомальные белки, возрастает в бластоцистах при переходе от 5-го к 7-му дню эмбрионального развития, что может быть связано с увеличением спектра и количества белков, необходимых для дальнейшей дифференцировки. В то же время экспрессия генов семейства *TSPY* в бластоцистах 6-го дня развития ниже по сравнению с бластоцистами 5-го дня.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-74-00064 по теме: «Реконструкция мутационных процессов у эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития на основе цифрового кариотипирования единичных клеток бластоцист».

ЛИТЕРАТУРА

1. Petropoulos S., Edsgård D., Reinius B., Deng Q. et al. Single-cell RNA-seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos // *Cell*. 2016. Vol. 165, № 4. P. 1012–1026.
2. Starostik M.R., Sosina O.A., McCoy R.C. Single-cell analysis of human embryos reveals diverse patterns of aneuploidy and mosaicism // *Genome research*. 2020. Vol. 30, № 6. P. 814–825.
3. Blakeley P., Fogarty N.M., Del Valle I., Wamaitha S.E. et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq // *Development*. 2015. Vol. 142, № 18. P. 3151–3165.
4. Adjaye J., Huntriss J., Herwig R., BenKahla A. et al. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophoctoderm cells // *Stem cells*. 2005. Vol. 23, № 10. P. 1514–1525.
5. Plaks V., Gershon E., Zeisel A., Jacob-Hirsch J. et al. Blastocyst implantation failure relates to impaired translational machinery gene expression // *Reproduction*. 2014. Vol. 148, № 1. P. 87–98.
6. Groff A.F., Resetskova N., DiDomenico F., Sakkas D. et al. RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence // *Genome research*. 2019. Vol. 29, № 10. P. 1705–1718.
7. Rho N. Key role of testis specific protein y encoded (*TSPY*) in bovine early embryo development: Doctoral dissertation, University of Guelph, 2020.
8. Schubert S., Kamino K., Böhm D., Adham I. et al. *TSPY* expression is variably altered in transgenic mice with testicular feminization // *Biology of reproduction*. 2008. Vol. 79, № 1. P. 125–133.
9. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse // *Developmental biology*. 2003. Vol. 262, № 1. P. 1–15.
10. Nikolic A., Volarevic V., Armstrong L., Lako M. et al. Primordial germ cells: current knowledge and perspectives // *Stem cells international*. 2016. P. 1–8.

ВЛИЯНИЕ МИКРОРНК НА МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ

А.А. Зарубин¹, А.Р. Дягель², М.С. Назаренко¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

Атеросклеротические бляшки образованы различными популяциями клеток, которые взаимодействуют между собой через множественные лиганды и рецепторы. Дисфункция эндотелиальных клеток является драйвером атеросклеротического поражения артерий, а изменение уровня экспрессии микроРНК в эндотелиальных клетках и в атеросклеротической бляшке, в целом, может регулировать множество генов-мишеней на уровне мРНК, модулируя лиганд-рецепторные взаимодействия. **Цель исследования** заключалась в идентификации экспрессии микроРНК и их мишеней, которые регулируют лиганд-рецепторные взаимодействия эндотелиальных и других клеток в атеросклеротической бляшке. **В результате** выявлено, что одним из потенциальных механизмов реализации межклеточных взаимодействий эндотелиальных клеток в атеросклеротически поражённых артериях является влияние miR-145-5p на VEGFA, который, в свою очередь, действует на рецепторы FLT1, KDR, и ITGB1.

Ключевые слова: микроРНК, атеросклероз, секвенирование единичных клеток, эндотелиальные клетки.

INFLUENCE OF MIRNAS ON INTERCELLULAR COMMUNICATIONS OF ENDOTHELIAL CELLS IN ATHEROSCLEROTIC PLAQUES

A.A. Zarubin¹, A.R. Diagel², M.S. Nazarenko^{1,2}

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMC, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Abstract

Atherosclerotic plaques are formed by various cell populations that communicate through multiple ligand-receptor interactions. Endothelial cell dysfunction is driver of atherosclerosis. miRNA expression changes in endothelial cells and in whole atherosclerotic plaque can regulate many miRNA-targets and modify ligand-receptor interactions. **In this study**, we identified miRNA and miRNA-targets expression changes which can regulate ligand-receptor interactions between endothelial cells and others in atherosclerotic plaque. **As a result**, it was found that miR-145-5p and VEGFA-FLT1/KDR/ITGB1 axis is one of the potential mechanisms of the intercellular interactions of endothelial cells in atherosclerotic plaque.

Keywords. miRNA, atherosclerosis, single cell sequencing, endothelial cells.

Актуальность. Атеросклеротическая бляшка – сложная структура, состоящая из различных клеток и изменённого межклеточного матрикса. Эндотелиальные клетки (ЭК) играют важную роль в процессе формирования атеросклеротической бляшки, выполняя не только барьерную, но и регуляторную функцию, которая реализуется в том числе через экспрессию микроРНК [1]. МикроРНК, малые молекулы, являются регуляторами экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне в ЭК, в том числе они участвуют в патологических процессах в атеросклеротической бляшке [2]. С появлением технологий РНК секвенирования единичных клеток [3,4,5] появляется возможность реконструировать межклеточные взаимодействия в атеросклеротических бляшках, а использование данных секвенирования микроРНК, выполненного в нашем исследовании, позволит обнаружить те микроРНК, которые отвечают за регуляцию этого взаимодействия.

Цель исследования – оценить потенциальное влияние экспрессии микроРНК на взаимодействия эндотелиальных клеток между собой и с другими популяциями клеток, представленными в атеросклеротических бляшках.

Материал и методы

В работе были использованы четыре парных образца поражённой атеросклерозом и относительно интактной части стенки сонной артерии, полученные в ходе каротидной эн-дартерэктомии. Экспрессию микроРНК определяли с помощью набора NEBNext Multiplex Small RNA Library и секвенирования с использованием HiSeq 1500 (Illumina). Аннотацию результатов проводили с помощью инструментов и баз данных FANTOM5, miRTarBase, WebGestalt. Также к анализу были привлечены данные секвенирования единичных клеток атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий из открытых источников (GSE131778, GSE155512, GSE159677). Данные из внешних источников были объединены и обработаны в программной среде R с применением пакетов Seurat, scTalk.

Результаты

Всего в образцах артерий обнаружено 352 (18%) микроРНК из 1 917 известных микроРНК человека, описанных в базе miRbase v.22. Из них 125 микроРНК были дифференциально экспрессированы между поражённой атеросклерозом и относительно интактной частью стенки сонной артерии: в 54 микроРНК повышена экспрессия в атеросклеротической бляшке, а в 71 – снижена.

Для 107 (86 %) из 125 выявленных в исследовании дифференциально-экспрессированных микроРНК определен хотя бы один ген-мишень, имеющий высокий уровень экспериментальной доказательности, согласно базе данных miRTarBase. Обнаружено, что данные 107 микроРНК регулируют 1 371 ген. МикроРНК со сниженной экспрессией в атеросклеротических бляшках относительно интактных частей сонных артерий, регулируют 855 генов, а микроРНК с увеличением уровня экспрессии в атеросклеротических бляшках связаны с 765 генами.

Следует отметить, что 249 (18 %) из 1371 генов-мишеней регулируются 38 микроРНК, которые имеют разнонаправленное изменение экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий по сравнению с их интактными частями. Аннотация 249 генов-мишеней по базам GO, KEGG, Reactome, Disgenet, DrugBank, позволила выявить также 2 216 различных биологических процессов и заболеваний для генов, которые регулировались микроРНК, демонстрирующими разнонаправленное изменение экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий (в том числе атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа, воспаление, а также миграция, пролиферация и адгезия ЭК).

При интегральном анализе данных секвенирования единичных клеток атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий, полученных из открытых источников, обнаружено 22 клеточные популяции, из которых 3 приходились на ЭК (таблица).

Тип ЭК	Описание
1	Экспрессируют гены белка, связывающего жирные кислоты (<i>FABP4</i>), маркеры ангиогенеза (<i>ADGRL4</i>) и специфического регулятора хемотаксиса эндотелиоцитов (<i>ECSCR</i>)
2	Экспрессируют гены, кодирующие молекулы адгезии клеток сосудов (<i>VCAM1</i>)
3	Экспрессируют гены, кодирующие молекулы адгезии клеток сосудов (<i>VCAM1</i>), эластину и сосудосуживающих факторов (эндотелин-1)

Эндотелиальные клетки взаимодействовали друг с другом и с другими клетками через 212 лигандов и рецепторов. Из них 74 (35%) являются генами-мишенями для 14 микроРНК, характеризующихся разнонаправленным изменением экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий по сравнению с их интактными частями (hsa-miR-1-3p, -125a-5p, -133a-(3p, 5p), -133b, -143-3p, -145-5p, -146a-5p, -149-5p, -155-5p, -210-3p, -222-3p, -504-5p, -543). МикроРНК miR-143/145 и -155 являются механо-чувствительными микроРНК, т. е. изменяют свою экспрессию в ЭК под влиянием нарушенного кровотока в артерии, регулируя их дисфункцию при атеросклерозе [6].

Максимальное различие по уровню экспрессии между атеросклеротическими бляшками и интактной частью сонных артерий, из этих микроРНК показывала miR-145-5p (log2FC=2,89; pFDR=6,73x10⁻⁷). Она регулирует 47 генов, из которых наиболее представленным во взаимодействиях был VEGFA (сосудистый эндотели-

альный фактор роста A), действующий на рецепторы *FLT1*, *KDR* и *ITGB1*. Через эти механизмы, по-видимому, реализуются межклеточные взаимодействия эндотелиальных клеток с гладкомышечными (ГМК) и иммунными клетками, а также с фибробластами.

Анализ экспрессии генов *VEGFA*, *FLT1*, *KDR* и *ITGB1* в популяциях клеток атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий показал, что экспрессия генов *FLT1* и *KDR*, в большей степени, регистрируется в ЭК, причём последний ген функционально активен, в основном, в ЭК 2 типа. Ген *ITGB1* экспрессируется во всех типах клеток, но более существенно в ГМК. В свою очередь, ген *VEGFA*, в большей степени, экспрессируется в макрофагах и моноцитах (Рис. 1).

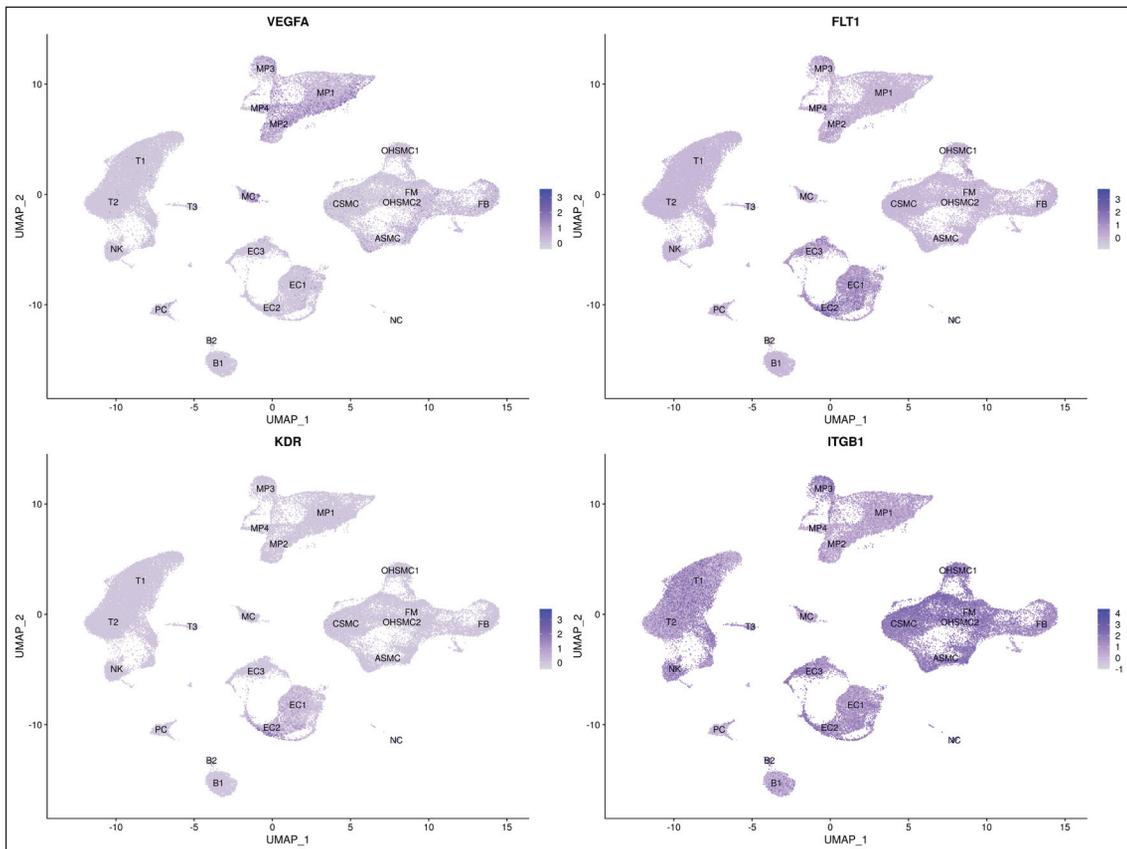


Рис.1. Экспрессия генов *VEGFA*, *FLT1*, *KDR* и *ITGB1* в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий.

Примечание: Т – Т-лимфоциты, MP – моноцитарно-макрофагальные клетки, FM – фибромиоциты, EC – эндотелиальные клетки, CSMC – сократительные гладкомышечные клетки атеросклеротических бляшек коронарных и сонных артерий, ASMC – активированные гладкомышечные клетки сосудов, FB – фибробласты, В – В-лимфоциты, NK – натуральные киллеры, OHSMC – гладкомышечные клетки с остеохондрогенным фенотипом, PC – плазматические клетки, MC – тучные клетки, NC – нейроны.

Полученные нами результаты по увеличению экспрессии miR-145-5p в атеросклеротических бляшках сонных артерий относительно их интактных частей согласуются с данными литературы. Так, артериальная гипертензия связана с увеличением экспрессии miR-145 в атеросклеротических бляшках сонных артерий, причем больший уровень данной микроРНК регистрируется в симптоматических бляшках (пациенты, которые перенесли ишемический инсульт или транзиторную ишемическую атаку) по сравнению с таковыми без острых сосудистых событий в анамнезе [7, 8]. Данная микроРНК ко-транскрибируется с miR-143, регулируя фенотип и функцию ГМК и ЭК. В частности, внеклеточные везикулы с miR-143/145, продуцируемые ЭК, переносятся к ГМК, где снижают экспрессию их генов-мишеней, предотвращая де-дифференцировку данных клеток и прогрессию атеросклеротического поражения артерий [9].

Белок VEGFA, согласно имеющимся представлениям, оказывает двоякое действие при атерогенезе. Так, являясь мощным фактором роста ЭК и индуктором ангиогенеза, он важен

для поддержания целостности эндотелия и репарации его повреждений, следовательно, для функции сосудов. Он защищает ЭК через индукцию экспрессии анти-апоптотических белков и продукцию оксида азота. С другой стороны, VEGFA может усиливать патофизиологический механизм образования и дестабилизации бляшек на поздних стадиях атеросклеротического поражения артерий, увеличивая проницаемость эндотелия и экспрессию моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1), что способствует адгезии моноцитов, их миграции через клетки эндотелия и активации [10].

Заключение

Изменение уровня экспрессии микроРНК в атеросклеротической бляшке является потенциальным механизмом регуляции активности широкого спектра генов, в том числе связанных с дисфункцией эндотелиальных клеток и развитием атеросклеротического поражения артерий. Взаимодействия между эндотелиальными и другими клетками в атеросклеротических бляшках потенциально регулируются через miR-145-5p и VEGFA, который, в свою очередь, действует на рецепторы FLT1, KDR и ITGB1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gimbrone Jr M. A., Garcia-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis // *Circulation research*. 2016. Vol. 118. № 4. P. 620–636.
2. Sun X., Belkin N., Feinberg M. W. Endothelial microRNAs and atherosclerosis // *Current atherosclerosis reports*. 2013. Vol. 15. №. 12. P. 1–13.
3. Wirka R. C. et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis // *Nature medicine*. 2019. Vol. 25. № 8. P. 1280–1289.
4. Alsaigh T. et al. Decoding the transcriptome of atherosclerotic plaque at single-cell resolution // *bioRxiv*. 2020.
5. Pan H. et al. Single-cell genomics reveals a novel cell state during smooth muscle cell phenotypic switching and potential therapeutic targets for atherosclerosis in mouse and human // *Circulation*. 2020. Vol. 142. № 21. P. 2060–2075.
6. Kumar S. et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014. Vol. 34. № 10. P. 2206–2216.
7. Santovito D. et al. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients // *Expert opinion on therapeutic targets*. – 2013. – Vol. 17. – № 3. – С. 217–223.
8. Mairias P. et al. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque // *Journal of vascular surgery*. 2015. Vol. 62. № 5. P. 1245–1250.
9. Hergenreider E. et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs // *Nature cell biology*. 2012. Vol. 14. № 3. P. 249–256.
10. Holm P. W. et al. Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF // *Annals of medicine*. 2009. Vol. 41. №. 4. P. 257–264.

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ГЕНОВ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ И ВАРИАБЕЛЬНОСТЬЮ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА И ГЕМОДИНАМИКИ

Е.В. Ижойкина^{1,2,3}, М.М. Гавриленко¹, Е.А. Трифонова^{1,2}, О.В. Жилиякова², И.Г. Куценко², В.А. Степанов¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

СибГМУ, г. Томск, Россия²

ОПЦ, г. Томск, Россия³

Аннотация

Преэклампсия (ПЭ) является одним из распространенных осложнений беременности. Она поражает 2–8 % беременных и характеризуется отеками, артериальной гипертензией и протеинурией. В России среди беременных ПЭ выявляется в 7–13 % случаев, а при наличии хронических заболеваний, особенно касающихся сердечно-сосудистой системы, – в 18–42 %. Несмотря на большое количество научных работ, посвященных данной проблеме, этиопатогенез преэклампсии до конца не определен. В последнее время большую значимость приобрели генетические факторы, а именно вклад отдельных полиморфизмов различных генов, кодирующих единые биологические пути, которые вовлечены в развитие ПЭ. **Цель исследования.** Анализ роли регуляторных полиморфных маркеров плацентарных генов в развитии преэклампсии, а также вариабельности показателей гемостаза и уровня артериального давления. Были исследованы 48 регуляторных полиморфных маркеров 27 плацентарных генов. Из 48 исследованных полиморфных маркеров статистически значимые различия между контрольной выборкой и группой с ПЭ в частотах аллелей и генотипов выявлены для 4 из них: rs10093975 гена *ADAM9* ($\chi^2=6.546$, $p=0.038$), rs10253374 гена *AQP1* ($\chi^2=6.970$, $p=0.031$), rs3752237 гена *ABCA7* ($\chi^2=8.436$, $p=0.015$), rs984458 гена *EDNRA* ($\chi^2=7.922$, $p=0.020$). Обнаружены ассоциации изученных

rSNPs с такими патогенетически значимыми для ПЭ количественными признаками, как уровень диастолического артериального давления и содержание фибриногена. Так, для полиморфного варианта rs3752237 в группе с преэклампсией выявлена ассоциация с количеством фибриногена. Рисковый генотип rs984458 в группе с преэклампсией был связан с повышенным уровнем диастолического артериального давления. Таким образом, данное исследование позволяет рассматривать выявленные полиморфные варианты в качестве кандидатов для дальнейшего изучения в отношении их влияния на манифестацию заболевания, тяжести его течения, а также в совокупности с влиянием средовых факторов как предикторов в диагностике преэклампсии.

Ключевые слова: преэклампсия, полиморфные маркеры, ADAM9, AQP1, ABCA7, EDNRA, гемостаз.

ASSOCIATIONS OF POLYMORPHIC MARKERS OF PLACENTAL GENES WITH PREECLAMPSIA AND VARIABILITY IN COAGULATION HEMOSTASIS AND HEMODYNAMICS

Izhoykina E.V.^{1,2,3}, Gavrilenko M.M.¹, Trifonova E.A.^{1,2}, Zhilyakova O.V.², Kutsenko I.G.², Stepanov V.A.¹

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMC, Tomsk, Russia¹

Siberian State Medical University, Russia²

Regional Perinatal Center named after I.D. Evtushenko, Russia³

Abstract

Preeclampsia is one of the most common complications of pregnancy. This disease affects 2-8% of pregnant women and is characterized by edema, hypertension, and proteinuria. In Russia, preeclampsia is detected among pregnant women in 7-13% of all pregnancies, and in the presence of chronic diseases, especially those related to the cardiovascular system in 18-42%. Despite a large number of studies devoted to this problem, the etiopathogenesis of the disease has not been fully determined. Recently, genetic factors have become more important, namely the contribution of individual polymorphisms of various genes encoding common biological pathways that are involved in the development of this pathology. **The purpose of the study:** to analyze the role of regulatory polymorphic markers of placental genes in the development of preeclampsia, as well as the variability of hemostasis and blood pressure. 48 regulatory polymorphic markers of 27 placental genes were studied. Statistically significant differences were found for four of them: rs10093975 of the *ADAM9* gene, rs10253374 of the *AQP1* gene, rs3752237 of the *ABCA7* gene, rs984458 of the *EDNRA* gene. The study showed the association of two polymorphic markers with such important pathogenic indicators as the level of diastolic blood pressure and fibrinogen. The rs3752237 in the group with preeclampsia is associated with the amount of fibrinogen. The risk genotype of rs984458 in the preeclampsia group was associated with elevated diastolic blood pressure. Thus, this study allows us to consider the identified polymorphic variants as candidates for further study in relation to their influence on the manifestation of the disease, the severity of its course, as well as in conjunction with the influence of environmental factors as predictors in the diagnosis of preeclampsia.

Key words: preeclampsia, great obstetrical syndromes, polymorphic markers, ADAM9, AQP1, ABCA7, EDNRA, hemostasis.

Актуальность. Акушерские синдромы, ответственные за высокую степень материнской и перинатальной заболеваемости, получили название «большие акушерские синдромы» (БАС) [1, 2]. Особое место в этой группе занимает преэклампсия (ПЭ), тяжелое течение которой является причиной 10–15 % всех случаев материнской смертности в мире, по данным ВОЗ, что составляет по меньшей мере 70 000 человек в год [3, 4]. ПЭ является многофакторным заболеванием, изучение молекулярно-генетических механизмов которого остается актуальным по сей день, что обусловлено тяжелыми последствиями данной патологии не только во время беременности и родов, но и в отдаленный период наблюдения. У большинства женщин, перенесших ПЭ, формируются хроническая патология почек, гипертоническая болезнь, эндокринные нарушения [5]. Согласно литературным данным, механизмы этого осложнения беременности связаны с синдромом системного воспалительного ответа, обусловленного нарушением инвазии цитотрофобласта и ремоделирования спиральных артерий миометрия, вследствие чего возникает плацентарная ишемия [6, 7]. В связи с этим, особую актуальность приобретает изучение молекулярных механизмов ПЭ, связанных с нарушениями, происходящими в плацентарной ткани.

Цель исследования – провести анализ ассоциации регуляторных полиморфных маркеров генов с преэклампсией и вариабельностью показателей гемостаза и уровня артериального давления.

Материал и методы

Суммарный объем выборки составил 575 женщин, которые согласно течению и исходам беременности были разделены на группу с физиологическим течением беременности (N=354) и группу с преэклампсией (N=221). Диагноз «преэклампсия» установлен врачами-акушерами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Клиническое обследование пациенток проводилось на базе ОГАУЗ «Родильный дом № 4» и ОГАУЗ «ОПЦ им. И.Д. Евтушенко» г. Томска. Исследование одобрено комитетом по биоэтической этике ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН. На базе НИИМГ ТНИМЦ проведены следующие этапы работы: выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции; генотипирование методами ПЦР в реальном времени и MALDI-TOF масс-спектрометрии на платформе «Sequenom MassARRAY4». Исследованы 48 регуляторных полиморфных маркеров 27 плацентарных генов. Клинические и лабораторные показатели для проведения ретроспективного анализа получены в ходе работы с историями болезни. Для анализа ассоциаций rSNP генов с развитием ПЭ использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса, а также рассчитывали показатель отношения шансов. Связь изучаемых полиморфных маркеров с клинико-лабораторными показателями оценивали с помощью H-критерия Крускала–Уоллеса.

Результаты

Из 48 исследованных полиморфных маркеров статистически значимые различия между контрольной выборкой и группой с ПЭ в частотах аллелей и генотипов были выявлены для четырех: rs10093975 гена *ADAM9* ($\chi^2=6,546$, $p=0,038$), rs10253374 гена *AQP1* ($\chi^2=6,970$, $p=0,031$), rs3752237 гена *ABCA7* ($\chi^2=8,436$, $p=0,015$), rs984458 гена *EDNRA* ($\chi^2=7,922$, $p=0,020$). Для дальнейшего определения рисков и протективного генотипов, а также минорного аллеля были посчитаны отношения шансов. Показано, что для rs10093975 гена *ADAM9* протективным генотипом является генотип СТ ($\chi^2=6,008$; $p=0,015$). Для rs10253374 гена *AQP1* протективным генотипом является генотип СТ ($\chi^2=4,526$; $p=0,034$), а рисковым – СС ($\chi^2=6,457$; $p=0,012$), а также частота протективного аллеля Т статистически значимо понижена в группе с ПЭ ($\chi^2=5,383$; $p=0,021$) в сравнении с группой с физиологическим течением беременности. Важно отметить, что для полиморфного маркера rs3752237 гена *ABCA7* рисковым является генотип АА ($\chi^2=7,346$; $p=0,007$) и аллель А ($\chi^2=6,165$; $p=0,014$). Для rs984458 гена *EDNRA* протективным генотипом является СТ ($\chi^2=7,253$; $p=0,008$), рисковым же генотипом является СС ($\chi^2=6,217$; $p=0,013$). Согласно функциональной аннотации данные гены вовлечены в различные патофизиологические процессы, включая эндотелиальную дисфункцию (*EDNRA*), межклеточное взаимодействие (*ADAM9*), активацию естественных киллеров и экспорт фосфатидилсерина (*ABCA7*), а также в процесс пассивного переноса воды по осмотическому градиенту (*AQP1*), нарушение которых может являться важными звеньями этиопатогенеза преэклампсии. Исходя из того, что одними из важных звеньев патогенеза ПЭ являются генерализованный спазм сосудов, изменение коагуляционных и реологических свойств крови, в качестве патогенетически значимых показателей были выбраны систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД), а также данные коагулограммы – фибриноген, активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), международное нормализованное отношение (МНО).

Дополнительным доказательством значимости полученных ассоциаций являются наблюдаемые в настоящей работе ассоциации изученных rSNPs с патогенетически значимыми для ПЭ количественными признаками. Так, рисковый генотип АА rs3752237 гена *ABCA7* показал ассоциацию с пониженными значениями фибриногена ($\chi^2=6,722$; $p=0,035$). Известно, что для ПЭ характерно состояние гиперкоагуляции. Однако есть публикации, в которых авторы отмечают, что на фоне прогрессирования заболевания, уровень фибриногена и протромбинового времени ниже, чем у здоровых беременных [8, 9]. Кроме того, для rs984458 гена *EDNRA* показана ассоциация с уровнем ДАД ($\chi^2=6,681$; $p=0,035$): рисковый генотип СС ассоциирован с наибольшим диапазоном уровня ДАД, а также с максимальными зафиксированными значениями этого клинического показателя в группе пациенток с ПЭ. Данный факт, вероятнее всего, обусловлен функциональными свойствами продукта гена *EDNRA*, который кодирует рецептор эндотелина-1, обладающего мощным вазоконстрикторным и митогенным свойствами в отношении гладкомышечных клеток [6, 10]. Изменение экспрессии этого локуса, обусловленное влиянием регуляторных вариантов в промоторе,

может привести к эндотелиальной дисфункции и последующей артериальной гипертензии, являющейся ведущим симптомом ПЭ [11].

Заключение

Проведенный анализ продемонстрировал, что регуляторные генетические маркеры локусов *ADAM9*, *AQP1*, *ABCA7*, *EDNRA* ассоциированы с ПЭ. На основании полученных результатов можно предположить, что молекулярно-генетические механизмы ПЭ связаны, в первую очередь, с эндотелиальной дисфункцией и нарушением в системе гемостаза в плацентарной ткани. Данное исследование позволяет рассматривать исследованные полиморфные варианты в качестве кандидатов для формирования групп риска в отношении манифестации данного осложнения беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brosens I.* The «Great Obstetrical Syndromes» are associated with disorders of deep placentation // *Am J Obstet Gynec.* 2011. Vol. 204, № 3. P. 193–201.
2. *Di Renzo G.C.* The great obstetrical syndromes // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2009. Vol. 22. P. 633–635
3. *Lo J.O., Mission J.F., Caughey A.B.* Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality // *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013. Vol. 25, № 2. P. 124–32.
4. *Knight M., Nair M., Tuffnell D.* Saving Lives, Improving Mothers' care: Surveillance of maternal deaths in the UK 2012-14 and lessons learned to inform maternity care from the UK and Ireland Confidential Enquiries in Maternal Deaths and Morbidity 2009-14. Oxford: National Perinatal Epidemiology Unit, 2016. 102 p.
5. *Адамян Л.В., Артымук Н.В., Башмакова Н.В.* Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия. Клинические рекомендации. М., 2016. 72 с.
6. *Hariharan N., Shoemaker A., Wagner S.* Pathophysiology of hypertension in preeclampsia // *Microvascular Research.* 2017. Vol. 109. P. 34–37.
7. *Ross K.M., Miller G., Culhane J. et al.* Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with measures of inflammation in cord blood // *American Journal Of Reproductive Immunology.* 2016. Vol. 76, № 5. P. 406–414.
8. *Xu Chang M.M., Li YunHui M.M., Zhang Wen M.M., Wang QiuShi Ph.D.* Analysis of perinatal coagulation function in preeclampsia // *Medicine.* July 02, 2021. Vol. 100. Is. 26. P. e26482
9. *Ying C., Li L.* Potential value of coagulation parameters for suggesting preeclampsia during the third trimester of pregnancy // *Am J. Med Sci.* 2017.
10. *Trifonova E.A., Swarovskaya M.G., Ganzha O.A. et al.* The interaction effect of angiogenesis and endothelial dysfunction-related gene variants increases the susceptibility of recurrent pregnancy loss // *J. Assist Reprod Genet.* 2019. Vol. 36, № 4. P. 717–726.
11. *Khedun S.M., Naicker T., Moodley J.* Endothelin-1 activity in pregnancy // *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2002. Vol. 22, № 6. P. 590–593.

СВЯЗЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК С ЧАСТОТОЙ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ РАБОТНИКОВ ПРЕДПРИЯТИЯ АТОМНОЙ ОТРАСЛИ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВНЕШНЕМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Д.С. Исубакова, О.С. Цымбал, Т.В. Усова, М.Ю. Цыпленкова

Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск, Россия

Аннотация

Представлены результаты исследования техногенного радиационного воздействия на степень метилирования ДНК промоторов генов, участвующих в реализации апоптоза, в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности воздействию долговременного внешнего γ -излучения. Объектом исследования послужила кровь 11 условно здоровых мужчин – работников Сибирского химического комбината. Доза внешнего облучения составила 175,88 мЗв (158,20–207,81 мЗв), возраст – 66 лет (54–71 год), стаж – 30 лет (27–40 лет). Определена степень метилирования ДНК генов *APAF1*, *BAD*, *BAX*, *BCL2L11*, *BCLAF1*, *BIK*, *BNIP3L*, *TP53*, *HRK*, *BID*, *BIRC2*, *CASP3*, *CASP9*, *CIDEB*, *CRADD*, *DAPK1*, *DFFA*, *FADD*, *GADD45A*, *LTBR*, *TNFRSF21* и *TNFRSF25*. Для всех обследованных лиц степень метилирования ДНК промоторов генов-индукторов апоптоза колеблется в диапазоне от 0,22 до 50,00 %. Установлена отрицательная корреляция степени метилирования ДНК *BAX* ($p = 0,028$) и *GADD45A* ($p = 0,009$) с повышенной частотой aberrантных клеток, *APAF1* ($p = 0,018$) и *GADD45A* ($p = 0,035$) с повышенной частотой дицентрических хромосом, *CASP9* ($p = 0,026$) и *CIDEB* ($p = 0,003$) с повышенной частотой хроматидных фрагментов. Установлена ассоциация степени метилирования ДНК с возрастом работников СХК для *BCLAF1* и *CIDEB* ($p = 0,034$ и $p = 0,014$ соответственно). Показана отрицательная корреляция степени метилирования ДНК *BAD*, *BID*, *CASP9*, *CIDEB* и *HRK* с дозой внешнего облучения ($p = 0,038$; $p = 0,042$; $p = 0,026$; $p = 0,026$ и $p = 0,010$ соответственно).

Ключевые слова: метилирование ДНК, хромосомные aberrации, ионизирующее излучение, промотор, апоптоз.

ASSOCIATION BETWEEN DNA METHYLATION WITH THE FREQUENCY OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BLOOD LYMPHOCYTES OF WORKERS OF THE NUCLEAR INDUSTRY ENTERPRISE, EXPOSED TO EXTERNAL IRRADIATION

D.S. Isubakova, O.S. Tsymbal, T.V. Usova, M.Yu. Tsypfenkova

Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russia

Abstract

Impaired apoptosis can have serious consequences: the accumulation of mutant cells, the development of teratogenic effects and malignant neoplasms. In this regard, the study of the mechanisms of changes in the activity of apoptosis due to methylation under the influence of long-term irradiation is urgent.

The object of the study was the blood of 11 apparently healthy male workers of the Siberian Chemical Combine. The degree of gene methylation *APAF1*, *BAD*, *BAX*, *BCL2L11*, *BCLAF1*, *BIK*, *BNIP3L*, *TP53*, *HRK*, *BID*, *BIRC2*, *CASP3*, *CASP9*, *CIDEB*, *CRADD*, *DAPK1*, *DFFA*, *FADD*, *GADD45A*, *LTBR*, *TNFRSF21* и *TNFRSF25* ranges from 0,22 to 50,00 %. A negative correlation was found between the degree of methylation of *BAX* ($p = 0,028$) and *GADD45A* ($p = 0,009$) with an increased frequency of aberrant cells, *APAF1* ($p = 0,018$) and *GADD45A* ($p = 0,035$) with an increased frequency of dicentric chromosomes, *CASP9* ($p = 0,026$), and *CIDEB* ($p = 0,003$) with an increased frequency of chromatid fragments. An association of the methylation degree with the age workers was established for *BCLAF1* ($p = 0,034$) and *CIDEB* ($p = 0,014$). A negative correlation of the methylation degree of *BAD* ($p = 0,038$), *BID* ($p = 0,042$), *CASP9* ($p = 0,026$), *CIDEB* ($p = 0,026$), and *HRK* ($p = 0,010$) with the dose of external radiation was shown. The decrease in the level of apoptosis at doses of 100–300 mSv can be explained by the achievement of the demethylation threshold for the promoters of the proapoptotic genes *GADD45A*, *CASP9*, *CIDEB*. This once again testifies in favor of the threshold model of the dependence of the radiation effect on the radiation dose, and further damaged cells no longer have time to be eliminated by apoptosis.

Keywords: DNA methylation, chromosomal aberrations, ionizing radiation, promoter; apoptosis.

Актуальность. Ионизирующее излучение (ИИ) является известным генотоксическим агентом, который индуцирует повреждение клеток посредством прямых и опосредованных механизмов [1]. ИИ помимо непосредственного повреждения структуры ДНК, может влиять на эпигенетическую регуляцию функционирования генома. Среди эпигенетических изменений существенное значение имеет статус метилирования ДНК промоторов генов. Метилирование ДНК – наиболее изученный механизм эпигенетической регуляции, который играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза [2, 3]. Известно, что метилирование ДНК и модификации гистонов связаны с репрессией генов и могут участвовать в регуляции радиочувствительности в клетках [4]. Также показано, что ИИ индуцирует aberrантное метилирование ДНК промоторов генов, участвующих в обеспечении основных функций клетки, в том числе апоптоза [5, 6]. При этом апоптоз является одним из наиболее важных процессов, обеспечивающих клеточный и тканевой гомеостаз, а его нарушение может иметь серьёзные последствия: накопление мутантных клеток, развитие тератогенных эффектов и злокачественных новообразований [7, 8]. В этой связи исследование механизмов изменения активности апоптоза за счёт метилирования ДНК под действием длительного облучения является актуальной задачей.

Цель исследования – изучить степень метилирования ДНК промоторов генов апоптоза в лимфоцитах крови работников Сибирского химического комбината (СХК), подвергшихся действию длительного радиационного техногенного облучения (γ -излучение) в процессе своей профессиональной деятельности.

Материал и методы

Объектом исследования служила кровь 11 мужчин – работников СХК, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности длительному радиационному воздействию (γ -излучение) в дозах 100–328 мЗв. Накопленная доза внешнего облучения всех обследованных работников СХК составила 175,88 мЗв (158,20–207,81 мЗв), возраст – 66 лет (54–71 год), стаж – 30 лет (27–40 лет). Взятие крови для исследования у работников СХК

проводили из локтевой вены в объёме 9 мл в пробирки Vacuette с ЭДТА КЗ и Li-гепарином (Greiner Bio-one, Австрия). Выделение ДНК осуществляли из полученных образцов крови при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США). Для всех обследованных лиц был проведён стандартный цитогенетический анализ, который более подробно описан в статье Н.В. Литвякова и соавт. [9]. Определение степени метилирования ДНК проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием планшетов Human Apoptosis EpiTect Methyl II Signature PCR Array for 22 Genes (Qiagen, Германия) в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя. Для статистической обработки использовали пакет прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc, США). Для оценки корреляции степени метилирования промоторов генов апоптоза с различными показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми различия считали при значении $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе для всех обследованных работников был выполнен стандартный цитогенетический анализ. На следующем этапе проведена оценка степени метилирования ДНК промоторов 22 генов апоптоза, в результате чего было установлено, что степень их метилирования не превышала 50 %. Степень метилирования ДНК промоторов генов варьирует в диапазоне от 0,22 до 50,0 %: *APAF1* (0,22 % (0,04–2,9)), *BAD* (2,98 % (1,03–3,97)), *BAX* (0,63 % (0,3–3,22)), *BCL2L11* (0,59 % (0,19–2,09)), *BCLAF1* (0,85 % (0,45–4,13)), *BID* (14,4 % (3,19–34,79)), *BIK* (0,66 % (0,05–8,92)), *BNIP3L* (5,61 % (3,4–16,52)), *HRK* (50,00 % (35,11–50,00)), *TP53* (3,65 % (1,42–20,45)), *BIRC2* (4,15 % (1,55–8,64)), *CASP3* (5,84 % (2,04–7,34)), *CASP9* (2,68 % (1,18–9,49)), *CIDEB* (1,74 % (1,14–7,43)), *CRADD* (8,19 % (3,67–10,66)), *DAPK1* (1,68 % (0,93–9,98)), *DFFA* (0,56 % (0,27–4,22)), *FADD* (0,98 % (0,51–8,84)), *GADD45A* (0,31 % (0,09–1,75)), *LTBR* (41,75 % (15,56–53,01)), *TNFRSF21* (34,57 % (20,67–64,41)) и *TNFRSF25* (0,47 % (0,15–2,71)).

На следующем этапе установлена ассоциация степени метилирования ДНК с возрастом работников СХК для *BCLAF1* и *CIDEB* ($p = 0,034$ и $p = 0,014$ соответственно).

Далее была определена корреляция степени метилирования ДНК промоторов генов апоптоза с дозой внешнего облучения (табл. 1).

Таблица 1.

Связь дозы внешнего облучения со степенью метилирования ДНК промоторов генов апоптоза у работников СХК

Параметры Гены	Доза внешнего облучения	
	R	p
<i>APAF1</i>	0,2273	0,5015
<i>BAD</i>	-0,6273	0,0388
<i>BAX</i>	-0,4091	0,2115
<i>BCL2L11</i>	-0,1727	0,6115
<i>BCLAF1</i>	-0,5091	0,1097
<i>BID</i>	-0,6182	0,0426
<i>BIK</i>	-0,5273	0,0956
<i>BNIP3L</i>	-0,1636	0,6307
<i>HRK</i>	-0,7342	0,0101
<i>TP53</i>	-0,4455	0,1697
<i>BIRC2</i>	-0,4727	0,1419
<i>CASP3</i>	-0,5000	0,1173
<i>CASP9</i>	-0,6636	0,0260
<i>CIDEB</i>	-0,6636	0,0260
<i>CRADD</i>	-0,4636	0,1509
<i>DAPK1</i>	-0,4636	0,1509
<i>DFFA</i>	-0,3545	0,2847
<i>FADD</i>	-0,4455	0,1697
<i>GADD45A</i>	-0,1000	0,7699
<i>LTBR</i>	-0,5000	0,1173
<i>TNFRSF21</i>	-0,1273	0,7092
<i>TNFRSF25</i>	-0,0909	0,7904

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – уровень статистической значимости; полужирным шрифтом отмечены статистически значимые различия.

Обнаружена отрицательная корреляция степени метилирования ДНК *BAD*, *BID*, *CASP9*, *CIDEB* и *HRK* с дозой внешнего облучения ($p = 0,038$; $p = 0,042$; $p = 0,026$; $p = 0,026$ и $p = 0,010$ соответственно).

Затем оценили связь частоты разных типов хромосомных аберраций (ХА) у работников СХК со степенью метилирования ДНК промоторов изучаемых генов апоптоза (табл. 2).

Таблица 2.

Связь степени метилирования ДНК промоторов генов апоптоза с частотой ХА у работников СХК

Параметры	Аберрантные клетки		Хроматидные фрагменты		Хромосомные фрагменты		Кольцевые хромосомы		Дицентрические хромосомы		Хроматидные обмены		
	Гены	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
APAF1	-0,4818	0,133	0,0000	1,000	-0,1049	0,759	-0,1721	0,613	-0,7062	0,015	0,0526	0,878	
BAD	-0,4545	0,160	-0,5688	0,068	-0,2670	0,427	-0,0651	0,849	-0,1230	0,718	0,3441	0,300	
BAX	-0,6545	0,029	-0,4404	0,175	-0,3432	0,301	-0,1768	0,603	-0,4601	0,154	0,1768	0,603	
BCL2L11	-0,5091	0,109	-0,2385	0,480	-0,3432	0,301	-0,2047	0,546	-0,4146	0,205	0,3298	0,322	
BCLAF1	-0,5818	0,061	-0,4587	0,156	-0,4863	0,129	-0,1535	0,652	-0,1549	0,649	0,2915	0,384	
BID	-0,0818	0,811	-0,3395	0,307	-0,2384	0,480	0,1070	0,754	0,1276	0,708	0,1960	0,564	
BIK	-0,0273	0,937	-0,5046	0,113	0,1716	0,614	0,4187	0,199	0,1002	0,769	0,2342	0,488	
BNIP3L	-0,3091	0,355	0,0642	0,851	-0,0667	0,845	-0,1303	0,703	-0,2916	0,384	-0,1721	0,613	
HRK	-0,2891	0,389	-0,4201	0,198	-0,4123	0,208	0,1391	0,683	-0,0145	0,966	0,2340	0,488	
TP53	-0,2818	0,401	-0,4587	0,156	-0,0095	0,978	0,1489	0,662	-0,0866	0,800	0,0430	0,900	
BIRC2	-0,5000	0,1173	-0,4312	0,1854	-0,0667	0,8454	-0,0837	0,8066	-0,2100	0,5353	-0,0430	0,9001	
CASP3	-0,4273	0,1899	-0,3853	0,2419	-0,2098	0,5359	-0,1303	0,7026	-0,0913	0,7894	0,0956	0,7798	
CASP9	-0,5545	0,0767	-0,6606	0,0269	-0,0191	0,9556	-0,0930	0,7855	-0,1598	0,6388	0,1004	0,7691	
CIDEB	-0,4000	0,2229	-0,7982	0,0032	-0,0858	0,8019	0,2559	0,4476	0,0959	0,7791	0,2676	0,4262	
CRADD	-0,2000	0,5554	-0,3028	0,3655	-0,0191	0,9556	-0,0326	0,9243	0,0137	0,9681	0,2581	0,4435	
DAPK1	-0,3636	0,2716	-0,4863	0,1294	0,0381	0,9114	-0,0093	0,9783	-0,0137	0,9681	0,0335	0,9222	
DFFA	-0,3727	0,2589	-0,1835	0,5892	-0,3528	0,2873	0,0977	0,7750	-0,2237	0,5084	0,0621	0,8560	
FADD	-0,5091	0,1097	-0,5688	0,0678	0,0667	0,8454	-0,0698	0,8384	-0,1963	0,5628	-0,0143	0,9666	
GADD45A	-0,7364	0,0098	-0,3486	0,2934	-0,1430	0,6748	-0,3675	0,2661	-0,6347	0,0359	0,1051	0,7583	
LTBR	-0,2182	0,5192	-0,1560	0,6470	-0,3909	0,2345	-0,0233	0,9459	0,0137	0,9681	0,0382	0,9111	
TNFRSF21	0,2727	0,4171	-0,0367	0,9147	0,3623	0,2735	0,4839	0,1316	0,2100	0,5353	-0,1912	0,5734	
TNFRSF25	-0,4545	0,1601	-0,3578	0,2800	0,0000	1,0000	0,0605	0,8598	-0,5297	0,0938	0,1482	0,6637	

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена; p – уровень статистической значимости; полужирным шрифтом отмечены статистически значимые различия.

Отмечается отрицательная корреляция степени метилирования ДНК промоторов проапоптотических генов *BAX* ($p = 0,028$) и *GADD45A* ($p = 0,009$) с повышенной частотой аберрантных клеток, *APAF1* ($p = 0,018$) и *GADD45A* ($p = 0,035$) с повышенной частотой дицентрических хромосом, известных маркеров радиационного облучения, *CASP9* ($p = 0,026$) и *CIDEB* ($p = 0,003$) с повышенной частотой хроматидных фрагментов.

Заключение

Обнаружено снижение степени метилирования ДНК генов проапоптотических генов при увеличении дозы (*BAD*, *BID*, *CASP9*, *CIDEB* и *HRK*) с возрастом (*BCLAF1*, *CIDEB*) и при повышенной частоте ХА (*BAX*, *GADD45A*, *CASP9*, *APAF1* и *CIDEB*), что может приводить к усилению апоптоза и является нормальной реакцией клеток на повреждение. Степень метилирования ДНК промоторов этих генов довольно низкая и не превышает 15 %, и только для *HRK* обнаружена высокая степень метилирования ДНК промотора (50 %), что может быть связано с его активацией при высоких дозах облучения. Необычность полученных данных заключается в том, что несмотря на активацию апоптоза в лимфоцитах крови работников СХК, подвергавшихся внешнему облучению, за счёт снижения метилирования ДНК промоторов проапоптотических генов, у них наблюдается увеличение частоты различных типов ХА. Кроме того, наше исследование 2009 г. показало, что интенсивность апоптоза в лимфоцитах крови работников СХК, подвергавшихся длительному радиационному воздействию, начинает снижаться при дозах 100–300 мЗв, и это сочетается с повышением частоты ХА [10]. Таким образом, снижение интенсивности апоптоза при дозах внешнего облучения 100–300 мЗв, показанное нами в работе 2009 г., можно объяснить достижением порога деметилирования ДНК промоторов проапоптотических генов *BAX*, *GADD45A*, *CASP9*, *APAF1* и *CIDEB*, что, в свою очередь, свидетельствует в пользу пороговой модели зависимости эффекта от дозы облучения.

Необходимо продолжение исследований на расширенной выборке и сравнение степени метилирования ДНК этих генов у лиц, не подвергшихся облучению, и у здоровых лиц, подвергшихся радиационному воздействию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Goodhead D.T.* Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA // *International Journal of Radiation Biology*. 1994. Vol. 65. P. 7–17. doi: 10.1080/09553009414550021
2. *Пендина А.А., Гринкевич В.В., Кузнецова Т.В., Баранов В.С.* Метилирование ДНК – универсальный механизм регуляции активности генов // *Экологическая генетика*. 2004. Т. 2, № 1. С. 27–37.
3. *Козлов В.А.* Метилирование ДНК клетки и патология организма // *Медицинская иммунология*. 2008. Т. 10, № 4-5. С. 307-318.
4. *Kim J.-G., Bae J.-H., Kim J.-A. et al.* Combination Effect of Epigenetic Regulation and Ionizing Radiation in Colorectal Cancer Cells // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, No. 8. P. e105405. doi: 10.1371/journal.pone.0105405
5. *Кузьмина Н.С., Мязин А.Е., Лантева Н.Ш., Рубанович А.В.* Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54, № 2. С. 127-139 doi: 10.7868/S0869803114020064
6. *Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др.* Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся внешнему воздействию γ -излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58, № 6. С. 581–588. doi: 10.1134/S0869803118060073
7. *Егорова И.Э., Бахтаирова В.И., Сулова А.И.* Молекулярные механизмы апоптоза, вовлеченные в развитие различных патологических процессов. Инновационные технологии в фармации / под ред. Е.Г. Приваловой. Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2019. С. 107–114.
8. *Дятлова А.С., Дудков А.В., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х.* Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и в процессах клеточного старения // *Успехи современной биологии*. 2018. Т. 138, № 2. С. 126–137. doi: 10.7868/S0042132418020023
9. *Литвяков Н.В., Фрейдин М.Б., Халюзова М.В. и др.* Частота и спектр цитогенетических аномалий у работников Сибирского химического комбината // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54, № 3. С. 283–296.
10. *Литвяков Н.В., Тахауов Р.М., Агеева А.М. и др.* Активность каспазы-3 в лимфоцитах крови у лиц, подвергавшихся облучению // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2009. Т. 54, № 6. С. 41–48.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЬЦАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИПСК ОТ ЗДОРОВОГО ИНДИВИДА И ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Т.Н. Киреева¹, Д.И. Жигалина¹, В.А. Шитов², А.А. Сивцев¹, Н.А. Скрябин¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия²

Аннотация

Несмотря на широкий спектр исследований, направленных на изучение механизмов патогенеза болезни Вильсона–Коновалова (БВК), в настоящее время недостаточно данных о влиянии мутаций в гене *ATP7B* на раннее эмбриональное развитие человека. Удобной модельной системой для изучения данного вопроса являются эмбриоидные тельца. В настоящей работе для анализа функций и оценки роли гена *ATP7B* на ранних этапах онтогенеза было проведено сравнение транскриптомов эмбриоидных телец, полученных из ИПСК здорового индивида и из ИПСК от пациентов с БВК. Анализ полученных профилей дифференциально экспрессирующихся генов выявил снижение уровня экспрессии многих групп генов, вовлеченных в трансмембранный транспорт. Снижение экспрессии наблюдалось в генах из семейств ABC-транспортеров, TRPC (каналы с транзиторным рецепторным потенциалом), SLC (транспортеры растворенных веществ), а также в генах, кодирующих натриевые и калиевые потенциал-зависимые каналы, хлоридные каналы и др. Это может свидетельствовать о возможной роли гена *ATP7B* в регуляции трансмембранного транспорта веществ на раннем этапе онтогенеза.

Ключевые слова: болезнь Вильсона–Коновалова, ген *ATP7B*, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриоидные тельца, дифференциальная экспрессия генов

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN EMBRYOID BODIES OBTAINED FROM IPSCS FROM A HEALTHY INDIVIDUAL AND PATIENTS WITH WILSON DISEASE

T.N. Kireeva¹, D.I. Zhigalina¹, V.A. Shitov², A.A. Sivtsev¹, N.A. Skryabin¹

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Abstract

Despite a wide range of studies aimed at studying the mechanisms of the Wilson's disease (WD) pathogenesis, there is currently a lack of data on the effect of mutations in the *ATP7B* gene on early human embryonic development. Embryoid bodies are a convenient model system for studying this issue. In this work, to analyze the functions and evaluate the role of the *ATP7B* gene at the early stages of ontogeny, we compared the transcriptomes of embryoid bodies obtained from iPSCs from a healthy individual and iPSCs from patients with WD. The analysis of the obtained profiles of differentially expressed genes revealed a decrease in the expression level of many groups of genes involved in transmembrane transport. A decrease in expression was observed in genes from the families of ABC transporters, TRPC (channels with transient receptor potential), SLC (solute transporters), as well as in genes encoding sodium and potassium voltage-gated channels, chloride channels, etc. This indicates a possible role of the *ATP7B* gene in the regulation of transmembrane transport of substances in early embryogenesis.

Keywords: Wilson disease, *ATP7B* gene, induced pluripotent stem cells, embryoid bodies, differential gene expression

Актуальность. Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК, гепатолентикулярная дегенерация, гепатоцеребральная дистрофия, OMIM 277900) относится к аутосомно-рецессивным наследственным заболеваниям. Причиной данной болезни являются мутации в гене *ATP7B*, который кодирует металлопереносящую аденозинтрифосфатазу (АТФазу) Р-типа. Дефицит или полное отсутствие АТФазного протеина Р-типа приводит к нарушению транспорта меди в комплекс Гольджи и затем ее высвобождению лизосомами в желчь. В результате медь накапливается в гепатоцитах, элиминируется в кровь, а затем откладывается в структурах головного мозга, проксимальных извитых канальцах почек и лимбе роговицы глазных яблок, что ведет к появлению печеночной, неврологической и психиатрической дисфункции [1–3]. Данная болезнь обладает широким спектром клинических проявлений, зависящих и от конкретного типа мутаций. К настоящему времени в гене *ATP7B* идентифицировано более 800 различных мутаций, приводящих к снижению стабильности и быстрому разрушению в клетке медь-связывающей функции белка и изменению его внутриклеточной локализации [4, 5]. Частота выявления пациентов с БВК составляет 1 случай на 30 тыс. [1, 6].

В мировой литературе представлено значительное количество работ, посвященных изучению патологических процессов, протекающих при БВК, в том числе с использованием в качестве модельной системы пациент-специфичных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Использование ИПСК дает возможность для исследования молекулярных и наследственных механизмов патогенеза заболевания *in vitro* [7–9]. Однако в большинстве случаев данные работы посвящены изучению экспрессии *ATP7B* у человека в постнатальном периоде. Работы, посвященные анализу влияния мутаций в гене *ATP7B* на эмбриональное развитие, проведены в основном на грызунах: инбредных и нокаутных мышках (*Atp7b*^{-/-}), крысах (ЛЕС), а также на рыбах *Danio rerio* и собаках породы бедлингтон-терьер [10]. Основной причиной отсутствия работ, связанных с проведением экспериментов на эмбрионах человека, является наличие биоэтических ограничений.

Проведение исследований для анализа экспрессии генов эмбриональных клеток человека возможно с использованием биологических систем, разработанных для моделирования эмбрионального развития. Хорошей моделью для анализа функций генов в развитии и дифференцировке являются эмбрионные тельца (ЭТ), полученные из ИПСК человека [11].

В данной работе для анализа функций и оценки роли гена *ATP7B* на ранних этапах онтогенеза было проведено сравнение транскриптомов эмбрионных телец, полученных из ИПСК здорового индивида (ЕВ К7-4LF) и из ИПСК от пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова (ЕВ Пуа23f и ЕВ HF2).

Цель исследования – изучение транскрипционного профиля дифференциально экспрессирующихся генов в модельной системе раннего эмбрионального развития (ЭТ).

Материал и методы

Материалом для исследования послужили эмбрионидные тельца, полученные из ИПСК от двух пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова (линии Пуа23f и HF2). Пациент 1 являлся носителем мутации *ATP7B*:c.3207C>A(p.H1069Q). Пациент 2 – носителем двух мутаций *ATP7B*:c.3207C>A(p.H1069Q), *ATP7B*:c.3036dup(p.K1013fs). А также эмбрионидные тельца, полученные из ИПСК от здорового индивида (линия K7-4LF). Данная линия была представлена коллегами из Института цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирска [12].

Пробоподготовка образцов, содержащих единичные эмбрионидные тельца, была выполнена с использованием коммерческого набора QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. МПС осуществлялось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, США) по рекомендованному производителем протоколу. Проверку качества кДНК библиотек проводили с помощью электрофоретического биоанализатора 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США), в основу работы которого заложен метод капиллярного электрофореза нуклеиновых кислот на чипе.

С помощью полнотранскриптомного массового параллельного секвенирования были получены профили экспрессии генов для эмбрионидных телец, полученных из ИПСК пациентов с БВК и от здорового индивида.

Анализ обогащения групп дифференциально экспрессированных генов проведен с использованием веб-ресурса Gene Set Analysis Toolkit V2 (<http://www.webgestalt.org/>), в котором оценивается представленность генов, группированных по базам данных Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) и KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), по сравнению с представленностью в геноме человека.

Результаты

В результате анализа дифференциально экспрессирующихся генов идентифицирован 3 451 ген с дифференциальной экспрессией в эмбрионидных тельцах, полученных из ИПСК пациента, по сравнению с эмбрионидными тельцами из ИПСК от здорового индивида. Среди них выявлено 783 гена с повышением экспрессии ($\log_2\text{FoldChange} \geq 3,322$) и 2 668 генов со снижением экспрессии в 10 раз и более ($\log_2\text{FoldChange} \leq -3,322$).

Анализ обогащения групп по молекулярным функциям для всех дифференциально экспрессированных генов выявил ряд групп, среди которых преимущественно представлены группы генов, обеспечивающие и/или участвующие в транспортной функции клеток (гены-транспортеры). При разделении дифференциально экспрессирующихся генов на гены со снижением и повышением уровня экспрессии все гены, участвующие в транспортной деятельности клеток, остаются в группе гипоэкспрессирующихся генов.

При анализе обогащенности гипоэкспрессирующихся генов по патогенетическим путям (KEGG) было выявлено, что наиболее представлена группа генов, кодирующих белки из суперсемейства транспортных белков ABC (ATP binding cassette). К данному суперсемейству относятся трансмембранные белки, которые широко экспрессируются почти во всех организмах и расположены в клеточных мембранах и органеллах. Данные белки, являясь транспортерами, переносят самые разные соединения, от небольших органических и неорганических молекул и ионов металлов до полипептидов и белков. Белкам этого семейства свойственно наличие АТФ-связывающего домена, имеющего характерную структуру [13–15].

В клетках с мутациями в гене *ATP7B* наблюдалось снижение экспрессии в 10 раз и более в 13 генах из суперсемейства транспортных белков ABC. Снижение экспрессии в 2 раза и более наблюдалось в 25 генах данной группы из 44. Кроме генов из суперсемейства ABC-транспортеров, наблюдается снижение уровня экспрессии многих групп генов, вовлеченных в трансмембранный транспорт, – гены из семейств TRPC (каналы с транзиторным рецепторным потенциалом) и SLC (семейство транспортеры растворённых веществ), натриевые и калиевые потенциал-зависимые каналы, хлоридные каналы и др.

Заключение

Таким образом, в результате анализа дифференциально экспрессирующихся генов в эмбрионидных тельцах, полученных из ИПСК от пациентов с БВК, в сравнении с эмбрионидными тельцами, полученными из ИПСК здорового индивида, выявлено снижение уровня экспрессии многих групп генов, вовлеченных в трансмембранный транспорт. Снижение экспрессии наблюдалось в генах из семейства ABC-транспортеров, семейства TRPC (каналы с транзиторным рецепторным потенциалом), семейства SLC (транспортеры растворённых

веществ), натриевые и калиевые потенциал-зависимые каналы, хлоридные каналы и др. Это может свидетельствовать о возможной роли гена *ATP7B* в регуляции трансмембранного транспорта веществ на раннем этапе онтогенеза.

Работа выполнена в рамках темы ФНИ №122013100190-6 «Роль аномалий сплайсинга в этиологии и патогенезе орфанных заболеваний»

ЛИТЕРАТУРА

1. Сальков В.Н., Худоерков Р.М., Сухоруков В.С. Патогенетические аспекты повреждений головного мозга при болезни Вильсона–Коновалова // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. 2020. Т. 6, № 69. С. 22–28.
2. Ala A., Walker A.P., Ashkan K., Dooley J.S., Schilsky M.L. Wilson’s disease // The Lancet. 2007. Vol. 369, № 9559. P. 397–408.
3. Maxwell K.L., Kowdley K.V. Metals and the liver // Curr. Opin. Gastroenterol. 2012. Vol. 28, № 3. P. 217–222.
4. Medici V., LaSalle J.M. Genetics and epigenetic factors of Wilson disease// Ann. Transl. Med. AME Publishing Company. 2019. Vol. 7, № 2. P. 58–58.
5. Wang J., Tang L., Xu A., Zhang S., Jiang H., Pei P., Li H., Lv T., Yang Y., Qian N., Naidu K., Yang W. Identification of mutations in the *ATP7B* gene in 14 Wilson disease children // Medicine. 2021. Vol. 100, № 16. P. e25463.
6. Голованова Е.В., Лазебник Л.Б., Конев Ю.В., Шапошникова Н.А. Болезнь Вильсона–Коновалова (гепатоцеребральная дистрофия, гепатолентикулярная дегенерация): диагностика, лечение и диспансерное наблюдение // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015. Т. 7, № 119. С. 108–111.
7. Hirata M., Yamaoka T. Hepatocytic differentiation of iPS cells on decellularized liver tissue // J Artific Organs. 2017. Vol. 20, № 4. P. 318–325.
8. Sakurai F., Kunito T., Takayama K., Hashimoto R., Tachibana M., Sakamoto N., Wakita T., Mizuguchi H. Hepatitis C virus-induced innate immune responses in human iPS cell-derived hepatocyte-like cells // Virus Res. 2017. Vol. 242. P. 7–15.
9. Parisi S., Polishchuk E.V., Allocca S., Ciano M., Musto A., Gallo M., Perone L., Ranucci G., Iorio R., Polishchuk R.S., Bonatti S. Characterization of the most frequent *ATP7B* mutation causing Wilson disease in hepatocytes from patient induced pluripotent stem cells // Sci Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 6247.
10. Roybal J., Endo M., Radu A., Zoltick P.W., Flake A.W. Early gestational gene transfer with targeted *ATP7B* expression in the liver improves phenotype in a murine model of Wilson’s disease // Gene Ther. 2012. Vol. 19. P. 1085–1094.
11. Brickman J.M., Serup P. Properties of Embryoid Bodies// Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2017. Vol. 6, № 2. doi:10.1002/wdev.259.
12. Malakhova A.A., Grigor’eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population// Stem Cell Res. 2020. Vol. 48. P. 101952.
13. Xiong J., Feng J., Yuan D., Zhou J., Miao J. Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily // Sci. Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 1–15.
14. Laub K.R., Marek M., Stanchev L.D., Herrera S.A., Kanashova T., Bourmaud A., Dittmar G., Günther Pomorski T. Purification and characterisation of the yeast plasma membrane ATP binding cassette transporter Pdr11p // PLoS One 2017. Vol. 12, № 9. P. e0184236.
15. Ye Z., Lu Y., Wu T. The impact of ATP-binding cassette transporters on metabolic diseases // Nutr. Metab.(Lond). 2020. Vol. 17, № 1. P. 1–14.

АНАЛИЗ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *MIR127* ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ МЕТОДОМ ТАРГЕТНОГО БИСУЛЬФИТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ю.А. Королёва¹, А.А. Зарубин¹, Н.П. Бабушкина¹, Д.Е. Гомбоева¹,
М.С. Кузнецов², Б.Н. Козлов², М.С. Назаренко¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

НИИ кардиологии Томский НИМЦ, Россия, г. Томск, Россия²

Аннотация

В нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий усиливается экспрессия микроРНК *miR-127*, что может быть связано с вариабельностью метилирования CpG-сайтов в регионе гена *MIR127*. **Целью работы** был анализ связи уровня метилирования ДНК в регионе, включающем ген *MIR127*, с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования. В качестве материала использовались парные ткани сосудов и лейкоциты крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (n=19), а также лейкоциты периферической крови относительно здоровых индивидов (n=18). В результате выявлено, что 38 из 40 CpG-сайтов на участке chr14:101,349,259–101,349,884 (сборка генома GRCh37/hg19), включающем ген *MIR127*, имеют высокий уровень метилирования (>70 %) во всех тканях сосудов и в лейкоцитах периферической крови вне зависимости от атеросклеротического поражения. При этом уровень метилирования ДНК в тканях вен статистически значимо выше, чем в артериях и лейкоцитах. В то же время не обнаружено связи метилирования в регионе гена *MIR127* в тканях сосудов и лейкоцитах крови индивидов с атеросклеротическим поражением артерий. Для CpG-сайта chr14:101,349,764 выявлен значительный межиндивидуальный разброс уровня метилирования (от 0 до 100 %), который объясняется расположением в данной

точке однонуклеотидного полиморфизма rs34163305. Таким образом, в тканях сосудов и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий, а также в лейкоцитах относительно здоровых индивидов продемонстрирован высокий уровень метилирования CpG-сайтов в регионе, включающем ген *MIR127*, не связанный с их атеросклеротическим поражением.

Ключевые слова: *MIR127*, rs34163305, атеросклероз, метилирование ДНК, микроРНК, сосуды.

ANALYSIS OF *MIR127* GENE METHYLATION LEVEL IN CAROTID ATHEROSCLEROSIS BY TARGETED BISULFITE SEQUENCING

I.A. Koroleva¹, A.A. Zarubin¹, N.P. Babushkina¹, D.E. Gomboeva¹,
M.S. Kuznetsov², B.N. Kozlov², M.S. Nazarenko¹

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹
Research Institute of Cardiology Tomsk NRMС, Tomsk, Russia²

Abstract

Expression of miR-127 is increased in unstable carotid atherosclerotic plaques. It can be associated with CpG sites methylation variability in the *MIR127* gene region. The aim of our work was to analyze the association of DNA methylation level in the region of *MIR127* gene with advanced carotid atherosclerosis using targeted bisulfite sequencing. Paired vessel tissues and blood leukocytes of patients with advanced atherosclerosis of the carotid arteries (n=19), as well as blood leukocytes of healthy individuals (n=18) were analyzed. As a result, we revealed that 38 of 40 CpG sites in the chr14:101,349,259-101,349,884 region (GRCh37/hg19 genome assembly), included *MIR127* gene, have a high methylation level (>70 %) in all vascular tissues and in peripheral blood leukocytes, regardless from atherosclerotic lesions. At the same time, the DNA methylation level in the veins was significantly higher than in the arteries and blood leukocytes. At the same time, no association was found between methylation of the *MIR127* gene region in various vascular tissues as well as leukocytes of individuals and carotid atherosclerotic lesions. For the chr14:101,349,764 CpG site we revealed a significant inter-individual variability of methylation level (from 0 to 100 %). It can be explained by the location of the single nucleotide polymorphism rs34163305 at this point. Thus, we demonstrated a high methylation level of CpG sites in the *MIR127* region in vascular tissues and blood leukocytes of patients with advanced carotid atherosclerosis, as well as in leukocytes of healthy persons. Methylation level of *MIR127* gene in vascular tissues and blood leukocytes is not associated with atherosclerotic lesions.

Key words: *MIR127*, rs34163305, atherosclerosis, DNA methylation, microRNA, blood vessels.

Актуальность. Серьёзной проблемой здравоохранения остаются сердечно-сосудистые заболевания, зачастую являющиеся следствием нарушения стабильного течения атеросклероза сонных артерий. Согласно литературным данным, в нестабильных атеросклеротических бляшках по сравнению со стабильными бляшками наблюдается усиление экспрессии miR-127 – представителя микроРНК класса малых регуляторных молекул [1, 2]. Известно, что экспрессия генов может регулироваться путём метилирования CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов), т.е. цитозинов (C), связанных фосфодиэфирной связью с гуанином (G). Преимущественно экспрессию микроРНК регулирует метилирование скоплений CpG-сайтов (CpG-островков), перекрывающих промоторные участки генов микроРНК (*MIR*), однако метилированию могут подвергаться и CpG-сайты, находящиеся непосредственно в самом гене *MIR* («теле» гена) [3]. Согласно онлайн-атласу экспрессии микроРНК FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/>), промотор гена *MIR127* располагается в регионе chr14:101,292,449-101,292,462 (здесь и далее – сборка генома GRCh37/hg19). Ген *MIR127*, согласно браузеру UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu>), располагается в регионе chr14:101,349,316–101,349,412, а в непосредственной близости от него находится CpG-островок протяжённостью около 500 п.н.

Имеющиеся литературные данные об уровне метилирования гена *MIR127* при атеросклерозе противоречивы – имеются сведения как о снижении уровня метилирования в пораженных атеросклерозом артериях по сравнению с интактными [4], так и о значительной вариабельности метилирования скоплений CpG-сайтов в регионе, включающем *MIR127*, в тканях сосудов [5]. В связи с этим изучение состояния метилирования гена *MIR127* при

атеросклеротическом поражении артерий представляет исследовательский интерес.

Цель исследования – проанализировать уровень метилирования гена *MIR127* в тканях сосудов и лейкоцитах крови у пациентов при атеросклеротическом поражении сонных артерий и оценить его тканеспецифичность и связь с заболеванием.

Материал и методы

Формирование выборок и обследование пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий проводили на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. В группу пациентов с атеросклерозом сонных артерий вошли 19 человек в возрасте от 46 до 78 лет, из них 13 мужчин и 6 женщин. У 9 пациентов при ультразвуковом исследовании (УЗИ) был обнаружен стеноз >70 % сонной артерии, что является показанием к каротидной эндартерэктомии; у 10 пациентов в анамнезе наблюдались клинические проявления стеноза – острые нарушения мозгового кровообращения, включая ишемический инсульт. У всех пациентов в ходе оперативного вмешательства были получены образцы атеросклеротических бляшек (САБ), макроскопически неизмененных подлежащих участков сонных артерий (САН) и больших подкожных вен, используемых в качестве «заплаты» (БПВ). Образцы лейкоцитов периферической крови (ЛКБ) получены от тех же пациентов до оперативного вмешательства.

Контрольную группу составили 18 человек в возрасте от 53 до 78 лет без клинических признаков поражения сердечно-сосудистой системы; из них 12 мужчин и 6 женщин. Проведённое УЗИ сонных артерий не выявило гемодинамически значимых изменений (толщина комплекса интима-медиа $0,8 \pm 0,2$ мм). От индивидов данной группы получены образцы периферической крови (ЛКЗ).

ДНК была выделена из образцов с использованием стандартного фенол-хлороформного метода и обработана бисульфитом натрия. Последовательность праймеров для таргетного бисульфитного секвенирования гена *MIR127* была подобрана с помощью онлайн-инструмента MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Таргетное бисульфитное секвенирование было проведено на приборе MiSeq (Illumina, США). Проанализированный регион приходится на участок chr14:101,349,259–101,349,884, включает как ген *MIR127* полностью, так и близлежащий CpG-островок и охватывает 40 CpG-сайтов. Для каждого образца были получены данные об уровне метилирования изучаемых CpG-сайтов в процентах. Статистический анализ данных был выполнен в свободно распространяемой программной среде R (версия 4.1.2). Для оценки уровней метилирования CpG-сайтов были использованы непараметрические оценки распределения в виде $M [Q1; Q3]$, где M – медиана, $Q1$ – 1-й квартиль (25-й перцентиль), $Q3$ – 3-й квартиль (75-й перцентиль). Сравнение уровней метилирования в группах исследования также проводилось с использованием непараметрических критериев: критерия Уилкоксона – при сравнении связанных выборок разных тканей, полученных от одних и тех же пациентов, а также U-критерия Манна-Уитни – при сравнении независимых групп исследования (образцов лейкоцитов крови, полученных от пациентов и относительно здоровых индивидов). Контроль ложноположительных результатов (FDR) при множественном тестировании статистических гипотез проведен по методу Бенджамини-Хохберга с использованием поправки к полученным значениям p на уровне значимости 0,05.

Результаты

В результате таргетного бисульфитного секвенирования получены данные о метилировании 39 из 40 CpG-сайтов исследуемого региона, за исключением сайта chr14:101,349,742, что связано с его недостаточным покрытием при секвенировании. Из проанализированных CpG-сайтов 38 показали высокий уровень метилирования (>70 %) во всех тканях сосудов и в лейкоцитах периферической крови как исследуемой, так и контрольной группы. Для сайта chr14:101,349,764 обнаружен значительный межиндивидуальный разброс уровня метилирования (от 0 до 100 %), который объясняется расположением в данной точке однонуклеотидного полиморфизма rs34163305 с мажорным аллелем С. Наличие альтернативного аллеля Т, с частотой в европейской популяции, равной 0,24 (согласно <https://gnomad.broadinstitute.org/variant/14-101349764-C-T>), приводит к отсутствию в данной точке генома CpG-динуклеотида, следовательно, уровень метилирования будет равен 0 % (50 % в случае гетерозиготности, что также наблюдается для отдельных индивидов). Тем не менее медиана уровня метилирования по данному CpG-сайту во всех анализируемых группах превышала 95 %.

При сравнении уровня метилирования ДНК между кровеносными сосудами выявлено повышение уровня метилирования как отдельных CpG-сайтов, так и медианного уровня метилирования ДНК анализируемого региона в целом в венах (95,6 [95,2; 96,5] %) по сравнению с сонными артериями, как пораженными (93,5 [93,1; 94,5] %, $p=0,005$), так и не пораженными атеросклерозом (94,0 [93,2; 94,7] %, $p=0,03$; см. рис. 1). Различия по уровню

метилирования ДНК между лейкоцитами крови и артериями, как и между лейкоцитами крови и венами не достигли статистической значимости ($p > 0,05$).

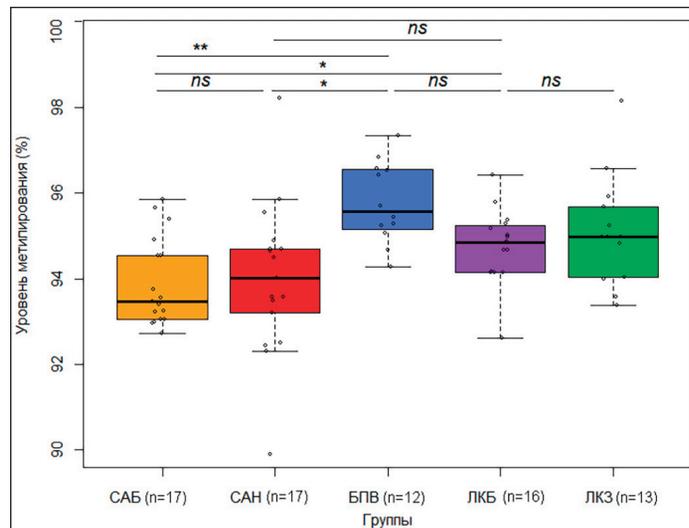


Рис. 1. Уровень метилирования CpG-сайтов в целом по исследованному региону, включающему ген *MIR127*, в сосудах и лейкоцитах крови. Примечание: САБ – образцы атеросклеротических бляшек, САН – образцы макроскопически неизмененные подлежащие участки сонных артерий, БПВ – образцы больших подкожных вен, ЛКБ – образцы периферической крови пациентов с атеросклерозом, ЛКЗ – образцы периферической крови индивидов контрольной группы. ns – различия статистически не значимы, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Медианный уровень метилирования ДНК анализируемого региона в целом в сонных артериях, пораженных атеросклерозом, не показал значимых отличий по сравнению с интактными артериями ($p > 0,6$). Также уровень метилирования ДНК лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом (94,9 [94,2; 95,2]%) не отличался от такового в лейкоцитах крови контрольной группы (95,0 [94,0; 95,7]%; $p > 0,7$, рис. 1). Таким образом, метилирование гена *MIR127* не ассоциировано с атеросклеротическим поражением артерий и не может выступать диагностическим биомаркером атеросклероза.

Результаты данного исследования дополняют известные литературные данные о вариабельности метилирования *MIR127* между разными сосудами. В исследовании, показавшем гипометилирование региона, включающего ген *MIR127* [4], равно как и в исследовании, показавшем ассоциацию его метилирования в тканях сосудов с их патологическими изменениями [5], не проводился анализ метилирования в сонных артериях (поражённых либо не поражённых атеросклерозом). Интересным результатом является значительная вариабельность метилирования CpG-динуклеотида, совпадающего с однонуклеотидным полиморфизмом rs34163305.

Выводы

Регион chr14:101,349,259-101,349,884 гена *MIR127*, за исключением CpG-сайта chr14:100,883,427, совпадающего с однонуклеотидным полиморфизмом rs34163305, демонстрирует высокий уровень метилирования как в тканях сосудов, так и в лейкоцитах периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий, а также в лейкоцитах относительно здоровых индивидов. Метилирование данного региона в тканях сосудов и лейкоцитах крови не ассоциировано с атеросклеротическим поражением сонных артерий.

Работа поддержана грантом РФФ (№ 16-15-10150).

ЛИТЕРАТУРА

- Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Uchino S, Spigonardo F, Mandolini C, Malatesta S, Bucci M, Mammarella C, Santovito D, de Lutii F, Marchetti A, Mezzetti A, Butti F. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans // *Stroke*. 2011. Vol. 42, № 9. P. 2556–2563.
- Maitrias P, Metzinger-Le Meuth V, Massy Z.A., M'Baya-Moutoula E., Reix T., Caus T., Metzinger L. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque // *Journal of vascular surgery*. 2015. Vol. 62, № 5. P. 1245–1250.e1.
- Huan T., Mendelson M., Joehanes R., Yao C., Liu C., Song C., Bhattacharya A., Rong J., Tanriverdi K., Keefe J., Murabito J.M., Courchesne P., Larson M.G., Freedman J.E., Levy D. Epigenome-wide association study of DNA methylation and microRNA expression highlights novel pathways for human complex traits // *Epigenetics*. 2019. Vol. 17. P. 1–16.
- Aavik E., Lumivuori H., Leppänen O., Wirth T., Häkkinen S.K., Bräsen J.H., Beschoner U., Zeller T., Braspenning M., van Criekinge W., Mäkinen K., Ylä-Herttuala S. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive

genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster // European heart journal. 2015. Vol. 36, № 16. P. 993–1000.

5. Goossens E.A.C., de Vries M.R., Simons K.H., Putter H., Quax P.H.A., Nossent A.Y. miRMap: Profiling of 14q32 microRNA Expression and DNA Methylation Throughout the Human Vasculature // Frontiers in cardiovascular medicine. 2019. Vol. 6. P. 113.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ Г. КРАСНОЯРСКА

М.А. Малинчик, М.В. Смольникова

НИИ медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН,
г. Красноярск, Россия

Аннотация

Бронхиальная астма (БА) – хроническое воспалительное заболевание легких, связанное с различной обструкцией дыхательных путей и гиперреактивностью бронхов. Кроме того, астма многофакторное заболевание, и помимо факторов окружающей среды на ее развитие влияет генетическая предрасположенность. **Целью исследования** было изучить уровень цитокинов, характеризующих баланс Th1/Th2/Th17-лимфоцитов, в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) и распределение генотипов rs2243250 *IL4*, rs2069812 *IL5*, rs1800925 *IL13*, rs2275913 *IL17A*, rs2069705 *IFN γ* у детей с бронхиальной астмой г. Красноярск. Исследованы 104 ребенка с БА, разделенные на группы в зависимости от степени тяжести и уровня контроля заболевания, и 65 детей, составивших группу контроля. Уровень цитокинов в нативных образцах КВВ измеряли с помощью панели Milliplex Map Human High Sensitivity T Cell Panel (USA, Merck Millipore). Были рассчитаны медиана (Me) и процентиля (25–75 %). Генотипирование полиморфизмов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Частота генотипа CC rs1800925 *IL13* достоверно ниже в группе больных БА по сравнению с контролем (OR 0,40 (0,18-0,88), $p=0,022$). Аллель T* является фактором риска развития тяжелой формы заболевания, поскольку чаще встречается в общей группе детей с астмой и при БА тяжелой степени ($p<0,05$). Аллель A* rs2275913 *IL17A* чаще встречается в группе с тяжелой формой БА относительно контроля ($p=0,05$) и предрасполагает к развитию тяжелой астмы. Не было выявлено статистически значимых отличий уровня концентрации исследуемых цитокинов в КВВ в зависимости от генотипа в кодирующем гене. Несмотря на это, уровень IL-13 достоверно выше у больных астмой, чем в контрольной группе ($p=0,003$), что говорит о ключевой роли белка в патогенезе БА. Таким образом, нами были определены генетические маркеры развития БА тяжелой степени у детей г. Красноярск: аллель T**IL13* rs1800925 и аллель A**IL17A* rs2275913.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфизм, ген, цитокины, дети, конденсат выдыхаемого воздуха, маркеры.

GENETIC MARKERS OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN OF KRASNOYARSK

M.A. Malinchik, M.V. Smolnikova

SRI Medical Problems of the North – a separate division of the FRC «KSC SB RAC», Krasnoyarsk, Russia

Abstract

Bronchial asthma (BA) is a chronic inflammatory disease of the lungs associated with various airway obstruction and bronchial hyperreactivity. In addition, asthma is a multifactorial disease, environmental factors and genetic predisposition influence its development. The purpose of the study is to analyze the level of cytokines characterizing the balance of Th1/Th2/Th17 lymphocytes in the exhaled breath condensate (EBC) and the distribution rs2243250 *IL4*, rs2069812 *IL5*, rs1800925 *IL13*, rs2275913 *IL17A*, rs2069705 *IFN γ* genotypes in children of Krasnoyarsk with bronchial asthma. There were studied 104 children with BA with varying degrees of severity and level of disease control, and 65 children without allergic pathology. Cytokine levels in native EBC samples were measured using the Milliplex Map Human High Sensitivity T Cell Panel (USA, Merck). Median (Me) and percentiles (25–75 %) were calculated. Genotyping of polymorphisms by was carried out by RT-PCR. The distribution of genotypes by polymorphic loci was checked for compliance with the Hardy–

Weinberg equilibrium using the χ^2 test. The frequency of the genotype CC rs1800925 *IL13* was significantly lower in the group of BA patients compared to the control (OR 0,40 (0,18–0,88), $p=0,022$). The T* allele is a risk factor for the development of a severe form of the disease, since it is more common in the general group of children with asthma and in severe BA ($p<0.05$). The frequency of the allele A rs2275913 *IL17A* higher in the patients with severe BA compared to the control ($p=0.05$) and causes the development of severe asthma. There were no statistically significant differences in the concentration levels of the studied cytokines in EBC depending on the genotype in the coding gene. However, the IL-13 level is significantly higher in patients with asthma than in the control group ($p=0.003$), which indicates the key role of the protein in asthma pathogenesis. Thus, we have identified the genetic markers that are a risk factor for developing severe BA in children - the T rs1800925 *IL13* and A rs2275913 *IL17A* alleles.

Keywords: bronchial asthma, polymorphism, gene, cytokines, children, exhaled breath condensate, markers.

Актуальность. Бронхиальная астма (БА) является распространенным заболеванием легких, особенно среди детей, и характеризуется воспалением и гиперактивностью дыхательных путей [1]. Заболевание поражает более 300 млн человек во всем мире, по данным недавно проведенных эпидемиологических исследований в России, распространенность БА среди взрослых составляет около 7 %, а среди детей и подростков – около 10 % [2–4].

Более того, астма является многофакторным заболеванием, и помимо воздействия окружающей среды на ее развитие оказывает влияние генетически опосредованный уровень концентрации цитокинов, связанный с полиморфизмом кодирующих генов [5, 6].

В последние годы в клиническую практику широко внедряются неинвазивные методы диагностики и контроля лечения БА. Особое внимание уделяется исследованию конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) [7, 8]. Анализ КВВ – неинвазивный метод диагностики бронхолегочных заболеваний, поскольку является источником множества летучих и нелетучих макромолекул, в том числе различных маркеров воспаления дыхательных путей, включая цитокины [9].

Воспаление, представляющее собой взаимодействие различных типов клеток и их медиаторов, в том числе цитокинов, с дыхательными путями и способствующее развитию специфических особенностей заболевания, играет важную роль в патофизиологии бронхиальной астмы [10]. Неинвазивная оценка заболеваний легких у детей является ключевой, поскольку способна отражать функциональное состояние и активность воспаления легких, состояние местного воспаления в дыхательных путях, а также позволяет оценить роль цитокинов в КВВ.

Несмотря на то, что в отношении данного заболевания проведено уже немало количество исследований, все еще существует много противоречий в отношении патогенетической роли цитокиновой системы при БА. Кроме того, ранее не было проведено комплексного анализа концентрации цитокинов, продуцируемых Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитами, на европеоидах Центральной Сибири, а также на этой популяции недостаточно изучена роль полиморфных генов цитокинов в патогенезе и характере течения БА.

Цель исследования – определить особенности распределения аллельных вариантов генов цитокинов, характеризующих баланс Th1/Th2/Th17-лимфоцитов, у детей Центральной Сибири с бронхиальной астмой различной степени тяжести, и установить их связь с уровнем локального иммунного процесса, оцененного с помощью анализа цитокинового спектра в конденсате выдыхаемого воздуха.

Материал и методы

Для исследования была набрана группа пациентов с бронхиальной астмой в количестве 104 человек в возрасте от 8 до 18 лет. Группа условно-здоровых доноров составила 65 человек в возрасте от 6 до 18 лет.

Пациентов в последующем разделили на группы в зависимости от степени тяжести и уровня контроля заболевания. Диагностика, степень тяжести и уровень контроля заболевания были установлены в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma, updated, 2021). Кроме того, использован тест по контролю над астмой (АСТ™).

Материалом исследования являлись КВВ и ДНК, экстрагированная из периферической крови с использованием набора DIAtom DNAPrep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия).

Концентрацию цитокинов измеряли в нативных образцах КВВ, используя систему мультиплексного иммуноанализа MagPix (Merck Millipore, USA), позволяющую определять

несколько анализов в одной лунке, и набор реагентов Human High Sensitivity T Cell MAG09 (USA, Merck Millipore), содержащий следующую панель анализов – IFN- γ , IL-12B (p70), IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α .

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов генов *IL4* rs2243250, *IL5* rs2069812, *IL13* rs1800925, *IL17A* rs2275913, *IFN γ* rs2069705 осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), используя специфические однонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды (TagMan) (ООО «ДНК-синтез», Россия) по протоколу производителя.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программного пакета Statistica для Windows 10.0 (StatSoft Inc., США, 2010) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Были рассчитаны медиана (Me) и процентиля (25–75 %). При множественных сравнениях количественных показателей определялись межгрупповые различия согласно критерию Краскела–Уоллиса, затем проводились попарные сравнения с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считались различия на уровне значимости $p < 0,05$.

Частота встречаемости качественных признаков выражена в абсолютных и относительных значениях. Сравнение частоты аллелей и генотипов между группами проводили с помощью online-калькулятора, критерия χ^2 (<https://medstatistic.ru/>). Пороговый уровень значимости был принят равным 0,05. Отношение шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (ДИ) оценивали для ассоциации генетических маркеров с фенотипами патологии.

Результаты

При исследовании концентрации цитокинов в образцах КВВ были получены низкие количества анализов. Были обнаружены концентрации IL-13, IL-17A и IL-4 у 26, 16 и 22 %, соответственно, среди пациентов с астмой и у 25, 3 и 15 %, соответственно, среди детей контрольной группы. В результате были получены статистически значимые отличия между двумя исследуемыми группами только для IL-13 ($p=0,003$). При анализе содержания цитокинов в подгруппах пациентов были обнаружены статистически значимые отличия по сравнению с контролем также только для IL-13: легкая степень – $p=0,009$, тяжелая степень – $p=0,016$, контролируемая БА – $p=0,017$, неконтролируемая БА – $p=0,007$.

Полученные в ходе исследования частоты аллелей полиморфизмов *IL4* rs2243250, *IL5* rs2069812, *IL13* rs1800925, *IL17A* rs2275913 и *IFN γ* rs2069705 в группе контроля соответствуют распределению в европеоидных популяциях согласно мировым данным (ресурс <http://www.ensembl.org>).

При сравнении частоты генотипов и аллелей были показаны статистически значимые результаты между исследуемыми группами для *IL13* rs1800925 и *IL17A* rs2275913.

Частота генотипа CC rs1800925 *IL13* достоверно ниже в группе больных БА по сравнению с контролем (OR 0,40 (0,18–0,88), $p=0,022$), что говорит о его протективной роли в отношении заболевания. Аллель T* чаще встречается в общей группе больных БА и при БА тяжелой степени ($p < 0,05$), следовательно, является фактором риска развития тяжелой формы заболевания.

Частота генотипа AA rs2275913 *IL17A* выше в группах с легкой степенью и контролируемым течением бронхиальной астмы, следовательно, данный генотип ассоциирован с развитием данных форм заболевания. Кроме того, аллель A* rs2275913 *IL17A* чаще встречается в группе с тяжелой формой БА относительно контроля ($p=0,05$) и является предрасполагающим к развитию тяжелой астмы.

Заключение

В ходе проведенного исследования показаны значимо высокие концентрации IL-13 в КВВ у больных астмой по сравнению с контролем, а также определены генетические маркеры предрасположенности к развитию бронхиальной астмы у детей г. Красноярска – аллель T* *IL13* rs1800925 и аллель A* *IL17A* rs2275913.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mims J.W. Asthma: definitions and pathophysiology // International Forum of Allergy & Rhinology. 2015. Vol. 5, № 1. P. 2–6.
2. Bousquet J., Chané P., Lacoste J.Y., Barnéon G., Ghavanian N., Enander I., Venge P., Ahlstedt S., Simony-Lafontaine J., Godard P., François-Bernard M. Eosinophilic inflammation in asthma // N Engl. J. Med. 1990. Vol. 323, № 15. P. 1033–1039.
3. Chuchalin A., Khaltayev N., Antonov N., Galkin D., Manakov L., Antonini P., Murphy M., Solodovnikov A., Bousquet J., Pereira M., Demko I. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation // Int J. Chron Obstruct Pulmon Dis. 2014. Vol. 9, № 1. P. 963–974.
4. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика», 4-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-макет, 2012. 182 с.
5. Garn H., Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis // Immunobiology. 2007. Vol. 212, № 6. P. 441–452.

6. Murphy K.M., Travers P., Walport M., Janeway C.A., Seidler I., Ehrenstein M. Janeway Immunologie. Berlin: Heidelberg Springer Berlin Heidelberg, 2009.
7. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath // Biomarkers. 2002. Vol. 7, № 1. P. 1–32.
8. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J., Alving K., Antczak A., Baraldi E., Becher G., van Beurden W.J.C., Corradi M., Dekhuijzen R., Dweik R.A., Dwyer T., Effros R., Erzurum S., Gaston B., Gessner C., Greening A., Ho L.P., Hohlfeld J., Jöbsis Q., Laskowski D., Loukides S., Marlin D., Montuschi P., Olin A.C., Redington A.E., Reinhold P., van Rensen E.L.J., Rubinstein I., Silkoff P., Toren K., Vass G., Vogelberg C., Wirtz H. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions // Eur Respir J. 2005. Vol. 26, № 3. P. 523–548.
9. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease // J. Allergy Clin Immunol. 2002. Vol. 110, № 1. P. 28–34.
10. Kips J.C. Cytokines in asthma // European Respiratory Journal. 2001. Vol. 34. P. 24–33.

РОЛЬ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА В СЕЛЕКТИВНОМ СКРИНИНГЕ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Д.С. Орлов, Л.П. Назаренко

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

Аннотация

Болезнь Вильсона–Коновалова является аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся накоплением меди внутри клеток. Клинические признаки включают поражение печени, неврологические и психические расстройства. Симптомы различаются как между разными семьями, так и внутри одной семьи. Болезнь Вильсона–Коновалова вызывается мутациями в гене *ATP7B*, кодирующем медь-транспортирующую АТФазу. Диагноз устанавливается на основании комбинации клинических (кольцо Кайзера–Флейшера, тремор, дистония) и биохимических данных (низкие концентрации меди и церулоплазмينا в сыворотке и повышенная экскреция меди с мочой) или молекулярно-генетического исследования.

Ключевые слова: болезнь Вильсона–Коновалова, ПЦР-ПДРФ-анализ.

ROLE OF PCR-RFLP ANALYSIS IN SELECTIVE SCREENING OF WILSON DISEASES

D.S. Orlov, L.P. Nazarenko

¹ Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

Abstract

Wilson disease is an autosomal recessive disorder characterised by accumulation of intracellular copper. Clinical features include liver disease, neurological problems and psychiatric disturbances. Symptoms vary among and within families. Wilson disease is caused by mutations in the *ATP7B* gene. The diagnosis is established by a combination of clinical findings (Kayser Fleischer corneal ring, tremor, rigid dystonia) and biochemical findings (low serum copper and ceruloplasmin concentrations, and increased urinary copper excretion) or molecular genetic testing.

Key words: Wilson disease, PCR-RFLP-analysis.

Актуальность. Причиной возникновения болезни Вильсона–Коновалова (гепатолентикулярной дегенерации, OMIM 277900) являются мутации гена *ATP7B*, который локализован на хромосоме 13 в локусе 13q14.3 и кодирует медь-транспортирующую АТФ-азу – АТФ7В [1]. Наиболее распространенным вариантом, приводящим к возникновению болезни Вильсона–Коновалова в европейских популяциях, является мутация с.3207С>А в экзоне 14, приводящая к замене аминокислоты гистидина в положении 1069 на глутамин (p.His1069Gln).

Диагностический алгоритм современных клинических рекомендаций Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) основан на диагностическом индексе (шкале «Лейпциг»), предложенном группой экспертов [2]. Данная шкала учитывает клинические, биохимические и молекулярно-генетические признаки. Для лечения применяется патогенетически обоснованная терапия хелатирующими агентами меди.

Цель исследования – оптимизация селективного молекулярно-генетического скрининга болезни Вильсона–Коновалова.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 64 пациента Медико-генетического центра НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, направленные на обследование для подтверждения диагноза «гепатолентикулярная дегенерация».

Материалом для молекулярно-генетического исследования служила венозная кровь. ДНК выделяли с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу фирмы производителя. Для поиска частой мутации применяли методику P. Steindl et al., модифицированную нами для повышения робастности [3]. Данная технология сводится к проведению двухраундной полугнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием mismatch-праймера во втором раунде и дальнейшим добавлением эндонуклеазы рестрикции. Разделение фрагментов осуществляли в неденатурирующем полиакриламидном геле в камере Mini-PROTEAN Tetra (BioRad, США).

Результаты

Селективный биохимический скрининг болезни Вильсона–Коновалова у пациентов до появления развернутой клинической картины имеет существенные ограничения [3]. Поэтому еще большее значение приобретает молекулярно-генетическое тестирование. Поскольку на долю самого частого патогенного варианта с.3207C>A приходится 50 % аллелей с мутацией у российских больных [4], разработка и внедрение простого метода поиска частой мутации представляются экономически обоснованными и клинически целесообразными.

Для оптимизации анализа в нашей лаборатории вместо двухраундной полугнездовой полимеразной цепной реакции, представленной в работе P. Steindl et al., использовали ПЦР в один раунд. При этом геномную ДНК вносили сразу в смесь, содержащую пару праймеров для второго раунда. Рестрикцию продукта амплификации проводили с помощью эндонуклеазы рестрикции Bbv 12I (СибЭнзим, Россия), являющейся изошизомером BsiHKA1 (NEB, США). Далее образцы анализировали с применением электрофореза в вертикальном полиакриламидном геле и окрашивания красителем GelRed (Biotium, США).

Амплификат у пациентов гомозиготных по мутации p.His1069Gln не режется рестриктазой. У гетерозигот амплификат режется рестриктазой частично и наблюдается два фрагмента. У здоровых людей и пациентов с другими мутациями фрагмент короче на 21 пару оснований.

На рис. 1 представлена типичная электрофореграмма. Стрелками показаны неразрезанные фрагменты.

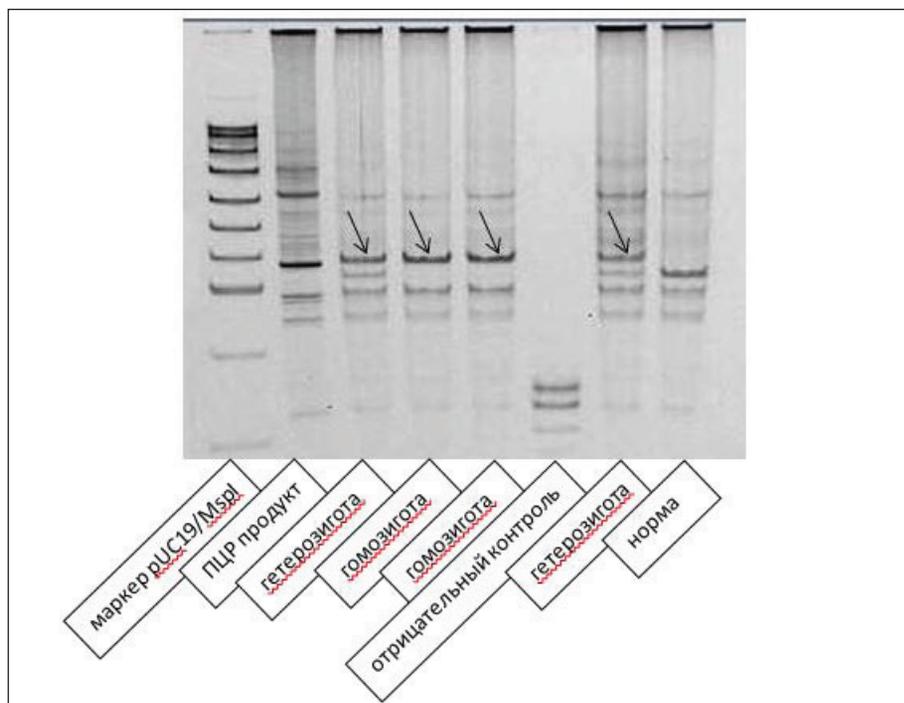


Рис. 1. Электрофореграмма, полученная в результате проведения анализа

В результате проведенного исследования мутация p.His1069Gln в гетерозиготном состоянии выявлена у 12 человек, и еще 4 пациента оказались гомозиготами по данной замене. Показательно отметить один из последних случаев обследования семьи: пробанд (возраст 10 лет) и сибс (возраст 8 лет). При отсутствии клинических признаков и биохимических маркеров заболевания (в частности, концентрация меди и церулоплазмينا в сыворотке крови была в пределах референсных значений) на фоне высокой активности трансаминаз у пробанда принято решение о молекулярно-генетическом тестировании и установлено наличие мутации p.His1069Gln в гомозиготном состоянии, подтверждающее диагноз болезни Вильсона–Коновалова у обоих братьев.

Таким образом, молекулярно-генетическое тестирование играет важную роль в раннем выявлении пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова.

Заключение

Внедрение описанного выше подхода для селективного молекулярно-генетического скрининга болезни Вильсона–Коновалова хорошо зарекомендовало себя в клинической практике. Модификация метода поиска частой мутации p.His1069Gln применяется в работе Медико-генетического центра НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» и биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гернер Е.А., Назаров В.Д., Федорова Т.Ф. и др. Клинико-лабораторная и молекулярно-генетическая диагностика болезни Вильсона–Коновалова // Российский неврологический журнал. 2019. № 3. С. 10–18. <https://doi.org/10.30629/2658-7947-2019-24-3-10-18>
2. Ferenci P., Caca K., Loudianos G. et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease // Liver Int. 2003. Vol. 23, № 3. P. 139–142. doi:10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x
3. Steindl P., Ferenci P., Dienes H.P. et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge // Gastroenterology. 1997. Vol. 113, № 1. P. 212–218. doi: 10.1016/s0016-5085(97)70097-0
4. Баязитдинова Г.М., Щагина О.А., Карунас А.С. и др. Спектр мутаций в гене *ATP7B* у российских больных с болезнью Вильсона–Коновалова // Генетика. 2019. Т. 55, № 12. С. 1433–1441.

ПОЛИМОРФИЗМ RS17713054 В ПОПУЛЯЦИИ ЯКУТОВ, АССОЦИИРОВАННОГО С COVID-19

Н.И. Павлова¹, А.А. Бочуров¹, В.А. Алексеев¹, А.Т. Дьяконова¹,
В.В. Додохов², Х.А. Куртанов³

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», г. Якутск, Россия¹

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Арктический государственный агротехнологический университет», г. Якутск, Россия²

Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Якутск, Россия³

Аннотация

Пандемия коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (COVID-19) привела к гибели миллионов людей во всем мире. Преобладающей причиной смертности *sp/fkb* пневмония и тяжелый острый респираторный дистресс-синдром. Гаплотип риска 3p21.31 обеспечивает двукратное увеличение риска дыхательной недостаточности от COVID-19 и более чем двукратное увеличение риска смертности для лиц моложе 60 лет. В нашем исследовании был проанализирован один SNP (rs17713054) гена *LZTFL1* в якутской популяции в сравнении с популяциями Восточной и Южной Азии, Африки, Америки и Европы. Выборка состояла из 382 человек (184 мужчины и 198 женщин), средний возраст составил 41,8±0,05 года. Генотипирование образцов ДНК осуществляли путем ПЦР и ПДРФ анализа. Частота рискованного аллеля А у якутов была равна 2 %, частота генотипов, несущих мутантный аллель А: АА, 0,5 % и АG, 3,7 %. Вероятно, в популяции якутов аллель А присутствует благодаря древней и/или недавней метисации с европейцами. При сравнении с открытой базой данных популяций из проекта «1 000 геномов якуты» похожи с народом кинь из Северного Вьетнама (субпопуляция KHV: А = 2 %; АА, 0 % и АG, 4 %) и африканской субпопуляцией в Барбадосе (ACB: А = 1,6 %; АА, 0 % и АG, 3,1 %).

Наше исследование может помочь в сортировке пациентов с вероятно высоким риском эпителиальной дисфункции с признаками эпителиально-мезенхимального перехода при COVID-19. Необходимы дальнейшие исследования потенциальной роли *LZTFL1* и эпителиально-мезенхимального перехода в легочном патогенезе.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, rs17713054, *LZTFL1*, якуты.

POLYMORPHISM RS17713054 IN THE YAKUT POPULATION ASSOCIATED WITH COVID-19

**N.I. Pavlova¹, A.T. Dyakonova¹, V.A. Alekseev¹, A.A. Bochurov¹,
V.V. Dodokhov², Kh.A. Kurtanov³**

Federal State Budgetary Scientific Institution «Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems», Yakutsk, Russia¹

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Arctic State Agrotechnological University», Yakutsk, Russia²

Institute for Biological Problems of the Permafrost of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences - a separate subdivision of the Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center «Yakutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Yakutsk, Russia³

Abstract

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (COVID-19) pandemic has caused millions of deaths worldwide. The predominant cause of death is pneumonia and severe acute respiratory distress syndrome. The risk haplotype 3p21.31 provides a twofold increase in the risk of respiratory failure from COVID-19 and more than a twofold increase in the risk of mortality for people under 60 years. In our study, one SNP (rs17713054) of the *LZTFL1* gene was analyzed in the Yakut population compared Asian, African, American and European populations. The sample consisted of 382 people (184 men and 198 women), the average age was 41,8±0,05 years. Genotyping of DNA samples was carried out by PCR and RFLP analysis. The frequency of the risk allele A in Yakuts was 2 %, the frequency of genotypes carrying the mutant allele A: AA, 0,5 % and AG, 3,7 %. Probably, allele A is present in the Yakut population due to ancient and/or recent miscegenation with Europeans. When compared with an open database of populations from the «1 000 Genomes» Project, the Yakuts are similar to the Kinh people of northern Vietnam (KHV subpopulation: A = 2%; AA, 0 % and AG, 4 %) and the African subpopulation in Barbados (ACB: A = 1,6 %; AA, 0 % and AG, 3,1 %). Our study may help triage patients at likely high risk for epithelial dysfunction with evidence of epithelial-mesenchymal transition in COVID-19. Further research is needed on the potential role of *LZTFL1* and the epithelial-mesenchymal transition in pulmonary pathogenesis.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, rs17713054, *LZTFL1*, yakut.

Актуальность. Пандемия коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (COVID-19) привела к гибели миллионов людей во всем мире. Преобладающей причиной смертности стали пневмония и тяжелый острый респираторный дистресс-синдром [1]. Однако COVID-19 может вызывать полиорганную недостаточность из-за высвобождения цитокинов, тромбоза микро- и макрососудов, повреждения эндотелия, острого повреждения почек и миокардита [2–4]. Было проведено два крупных GWAS, чтобы определить, вызывают ли распространенные варианты восприимчивость к тяжелому COVID-19 [5, 6]. Оба исследования идентифицировали область хромосомы 3p21.31 как имеющую самую сильную ассоциацию, в то время как третье исследование также идентифицировало этот локус как придающий восприимчивость к инфекции [7]. Гаплотип риска 3p21.31, который унаследован от неандертальцев [8], обеспечивает двукратное увеличение риска дыхательной недостаточности от COVID-19 [5, 6] и более чем двукратное увеличение риска смертности для лиц моложе 60 лет [9]. Исследование посмертных биоптатов легких COVID-19 продемонстрировало распространенную эпителиальную дисфункцию с признаками эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [10, 11]. ЭМП – процесс изменения эпителиальными клетками эпителиального фенотипа на мезенхимальный, происходящий в ходе эмбрионального развития, заживления ран, а также при патологических процессах – например при фиброзе и опухолевой прогрессии.

Цель исследования – изучить частоту однонуклеотидного полиморфизма rs17713054 в локусе риска COVID-19 (3p21.31) у якутов, являющегося наиболее вероятным регулятором гена *LZTFL1*.

Материал и методы

Материалом исследования служили образцы ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП с использованием уникальной научной установки (УНУ) «Геном Якутии» (рег. № USU_507512). Выборка состояла из 382 человек (184 мужчины и 198 женщин), средний возраст составил $41,8 \pm 0,05$ года. Выделение ДНК из периферической крови проводилось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование образцов ДНК осуществляли путем ПЦР-ПДРФ-анализа. Статистический анализ был проведен с помощью программы Office Microsoft Excel 2010, Statistica 8.0. Частоты аллелей и генотипов rs17713054 определяли путем прямого подсчета по общепринятым формулам. Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (РХВ). Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При анализе частоты аллелей и генотипов SNP rs17713054 в популяции якутов (УКТ) установили, что частота рискованного аллеля А равна 2 %, частота генотипов, несущих мутантный аллель А: АА, 0,5 % и АG, 3,7 %. При сравнении с открытой базой данных популяций из проекта «1 000 геномов» якуты похожи с народом кинь из Северного Вьетнама (субпопуляция KHV: А = 2 %; АА, 0 % и АG, 4 %) и африканской субпопуляцией в Барбадосе (АСВ: А = 1,6 %; АА, 0 % и АG, 3,1 %) (таблица).

Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs17713054 в популяции якутов, в популяциях и субпопуляциях проекта «1000 геномов»

Выборка	ID	Этнос	Количество	Частота аллеля		Частота генотипа			Chi-sq.	p
				A	G	AA	AG	GG		
Все якуты			382	0,020	0,980	0,005	0,037	0,958	15,813	0,000
Мужчины	УКТ	Якуты	184	0,010	0,990	0	0,027	0,973	0,035	0,852
Женщины			198	0,033	0,967	0,011	0,045	0,944	15,992	0,000
Во всем мире по данным проекта «1 000 геномов»			2 504	0,082	0,918	0,019	0,126	0,855	64,538	0,000
Восточные азиаты (EAS)			504	0,005	0,995	0	0,010	0,990	0,013	0,911
	CDX	Дайцы	93	0,005	0,995	0	0,011	0,989	0,003	0,958
Субпопуляции	CHB	Северные хань	103	0	1	0	0	1	–	–
	CHS	Южные хань	105	0	1	0	0	1	–	–
Восточной Азии	JPT	Японцы	104	0	1	0	0	1	–	–
	KHV	Вьетнамцы кинь	99	0,020	0,980	0	0,040	0,960	0,042	0,837
Южные азиаты (SAS)			489	0,296	0,704	0,094	0,403	0,503	0,514	0,473
	BEB	Бенгальцы	86	0,378	0,622	0,128	0,500	0,372	0,346	0,557
	GIN	Гуджарати	103	0,267	0,733	0,078	0,379	0,544	0,110	0,741
Субпопуляции Южной Азии	ITU	Индийцы Телугу	102	0,289	0,711	0,098	0,382	0,520	0,500	0,479
	PJL	Пенджаби	96	0,297	0,703	0,094	0,406	0,500	0,069	0,792
	STU	Тамилы Шри Ланки	102	0,260	0,740	0,078	0,363	0,559	0,330	0,566
Европейцы (EUR)			503	0,081	0,919	0	0,161	0,839	3,857	0,050
Субпопуляции Европы	CEU	Европейцы Америки	99	0,081	0,919	0	0,162	0,838	0,765	0,382
	FIN	Финны	99	0,101	0,899	0	0,202	0,798	1,250	0,264
	GBR	Британцы	91	0,071	0,929	0	0,143	0,857	0,538	0,463
	IBS	Иберийцы	107	0,047	0,953	0	0,093	0,907	0,257	0,612
	TSI	Тосканы	107	0,103	0,897	0	0,206	0,794	1,405	0,236
Американцы (AMR)			347	0,043	0,957	0,003	0,081	0,916	0,208	0,648

окончание таблицы

Субпопуляции Америки	CLM	Колумбийцы	94	0,064	0,936	0,011	0,106	0,883	1,134	0,287
	MXL	Мексиканцы	64	0,039	0,961	0	0,078	0,922	0,106	0,745
	PEL	Перуанцы	85	0,029	0,971	0	0,059	0,941	0,078	0,780
	PUR	Пуэрториканцы	104	0,038	0,962	0	0,077	0,923	0,166	0,683
Африканцы (AFR)			661	0,004	0,996	0	0,008	0,992	0,010	0,922
Субпопуляции Африки	ACB	Карибы	96	0,016	0,984	0	0,031	0,969	0,024	0,876
	ASW	Афроамериканцы	61	0,008	0,992	0	0,016	0,984	0,004	0,949
	ESN	Эсан	99	0	1	0	0	1	–	–
	GWD	Гамбийцы	113	0,004	0,996	0	0,009	0,991	0,002	0,962
	LWK	Лухья	99	0	1	0	0	1	–	–
	MSL	Менде	85	0	1	0	0	1	–	–
YRI	Йоруба	108	0	1	0	0	1	–	–	

В африканской популяции (AFR) рисковый аллель А отсутствует, кроме вышеупомянутой африканской субпопуляции из государства Барбадос в Карибском море (ACB) и афроамериканцев из юго-восточных штатов Америки (ASW: А = 0,8 %; АА, 0 % и АG, 1,6 %). Вероятно, в популяции ACB и ASW аллель А присутствует благодаря метисации с европейцами. У американских популяций (AMR) мутантный аллель встречается с частотой 4 % (АА, 0,3 % и АG, 8,1 %). Европейцы занимают второе место в мире по распространенности рискового аллеля (EUR: А = 8 %; АА, 0 % и АG, 16,1 %). Среди европейцев высокая частота наблюдается у итальянцев (TSI: А = 10,3 %; АА, 0 % и АG, 20,6 %) и финнов (FIN: А = 10,1 %; АА, 0 % и АG, 20,2 %).

Очень высокая частота рискового аллеля А и несущих аллель А генотипов в мире наблюдается в южноазиатской популяции (SAS: А = 30 %; АА, 9,4 % и АG, 40,4 %) по сравнению со всеми другими рассмотренными популяциями. Во всех представленных южноазиатских субпопуляциях высокая частота минорного аллеля (26–37,8 %), но нужно отметить, что у бенгальцев наблюдается самая высокая частота аллеля А из всех проанализированных популяций (37,8 %). Гетерозиготный генотип АG встречается в 50 % индивидов в популяции бенгальцев и 40,6 % в популяции пенджабцев, живущих в Пакистане и в штате Пенджаб на севере Индии (PJI). По результатам общенационального когортного исследования 29 млн взрослых в Англии, проведенного Vol. Nafilyan et al. (2021), получены данные по этническим различиям в смертности от COVID-19 во время первых двух волн пандемии коронавируса. Риск смерти от COVID-19 повышен для людей из Пакистана (339,9 [95 % ДИ: 303,7–376,2] и 166,8 [141,7–191,9] смертей на 100 000 населения среди мужчин и женщин) и Бангладеш (318,7 [247,4–390,1]) и 127,1 [91,1–171,3] у мужчин и женщин), но не у представителей африканских (негроидных) этнических групп. Несмотря на снижение повышенного риска смертности от COVID-19 после поправки на социально-демографические характеристики и состояние здоровья, риск был значительно выше у людей бангладешского и пакистанского происхождения как в первой, так и во второй волне [12]. Поскольку эффект 3p21.31 обеспечивается усилением функции, *LZTFL1* может представлять собой терапевтическую мишень. *LZTFL1* является наиболее вероятной непосредственной регуляторной мишенью rs17713054-содержащего эпителиально-эндотелиально-фибробластного энхансера.

Заключение

Наши результаты показывают, что частота рискового аллеля А полиморфизма rs17713054 в популяции якутов встречается с частотой 2 % и в общем соответствует частоте популяций Восточной Азии (от 0 до 2 %), географически близких к якутам и относящихся к одной монголоидной расе. Вероятно, в популяции якутов аллель А присутствует благодаря древней и/или недавней метисации с европейцами. Наше исследование может помочь в сортировке пациентов с вероятно высоким риском эпителиальной дисфункции с признаками эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) при COVID-19. Необходимы дальнейшие исследования потенциальной роли *LZTFL1* и ЭМП в легочном патогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marini J.J., Hotchkiss J.R., Broccard A.F. Bench-to-bedside review: microvascular and airspace linkage in ventilator-induced lung injury // Crit. Care. 2003. № 7. P. 435–444.
2. Levi M., Tachil J., Iba T., Levy J.H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19 // Lancet Haematol. 2020. № 7. P. e438–e440.

3. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 // *Lancet*. 2020. Vol. 395, № 10234. P. 1417–1418.
4. Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M., Haverich A., Welte T., Laenger F., Vanstapel A., Werlein C., Stark H., Tzankov A., Li W.W., Li V.W., Mentzer S.J., Jonigk D. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19 // *N. Engl. J. Med.* 2020. № 383. P. 120–128.
5. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L., Buti M., Albillos A., Invernizzi P., Fernández J., Prati D., Baselli G., Asselta R., Grimsrud M.M., Milani C., Aziz F., Kässens J., May S., Wendorff M., Wienbrandt L., Uellendahl-Werth F., Zheng T., Yi X., de Pablo R., Cheroles A.G., Palom A., Garcia-Fernandez A.E., Rodriguez-Frias F., Zanella A., Bandera A., Protti A., Aghemo A., Lleo A., Biondi A., Caballero-Garralda A., Gori A., Tanck A., Carreras Nolla A., Latiano A., Fracanzani A.L., Peschuck A., Julià A., Pesenti A., Voza A., Jiménez D., Mateos B., Nafria Jimenez B., Quereda C., Paccapelo C., Gassner C., Angelini C., Cea C., Solier A., Pestaña D., Muñoz-Diaz E., Sandoval E., Paraboschi E.M., Navas E., García Sánchez F., Ceriotti F., Martinelli-Boneschi F., Peyvandi F., Blasi F., Téllez L., Blanco-Grau A., Hemmrich-Stanisak G., Grasselli G., Costantino G., Cardamone G., Foti G., Aneli S., Kurihara H., Elabd H., My I., Galván-Femenia I., Martín J., Erdmann J., Ferrusquía-Acosta J., García-Etxebarria K., Izquierdo-Sánchez L., Bettini L.R., Sumoy L., Terranova L., Moreira L., Santoro L., Scudeller L., Mesonero F., Roade L., Rühlemann M.C., Schaefer M., Carrabba M., Riveiro-Barciela M., Figuera Basso M.E., Valsecchi M.G., Hernandez-Tejero M., Acosta-Herrera M., D'Angiò M., Baldini M., Cazzaniga M., Schulzky M., Ceconi M., Wittig M., Ciccarelli M., Rodríguez-Gandía M., Boccione M., Miozzo M., Montano N., Braun N., Sacchi N., Martínez N., Özer O., Palmieri O., Favero P., Preatoni P., Bonfanti P., Omodei P., Tentorio P., Castro P., Rodrigues P.M., Blandino Ortiz A., de Cid R., Ferrer R., Gualtierotti R., Nieto R., Goerg S., Badalamenti S., Marsal S., Matullo G., Pelusi S., Juzenas S., Aliberti S., Monzani V., Moreno V., Wesse T., Lenz T.L., Pumarola T., Rimoldi V., Bosari S., Albrecht W., Peter W., Romero-Gómez M., D'Amato M., Duga S., Banales J.M., Hov J.R., Folseraas T., Valenti L., Franke A., Karlsen T.H. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure // *N Engl J. Med.* 2020. Vol. 383, № 16. P. 1522–1534.
6. Pairo-Castineira E., Clohisey S., Klaric L., Bretherick A.D., Rawlik K., Pasko D., Walker S., Parkinson N., Fourman M.H., Russell C.D., Furniss J., Richmond A., Gountouna E., Wrobel N., Harrison D., Wang B., Wu Y., Meynert A., Griffiths F., Oosthuizen W., Kousathanas A., Moutsianas L., Yang Z., Zhai R., Zheng C., Grimes G., Beale R., Millar J., Shih B., Keating S., Zechner M., Haley C., Porteous D.J., Hayward C., Yang J., Knight J., Summers C., Shankar-Hari M., Klenerman P., Turtle L., Ho A., Moore S.C., Hinds C., Horby P., Nichol A., Maslove D., Ling L., McAuley D., Montgomery H., Walsh T., Pereira A.C., Renieri A., GenOMICC Investigators, ISARIC4C Investigators, COVID-19 Human Genetics Initiative, 23andMe Investigators, BRACOVIC Investigators, Gen-COVID Investigators, Shen X., Ponting C.P., Fawkes A., Tenesa A., Caulfield M., Scott R., Rowan K., Murphy L., Openshaw P.J.M., Semple M.G., Law A., Vitart V., Wilson J.F., Baillie J.K. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19 // *Nature*. 2021. Vol. 591, № 7848. P. 92–98.
7. COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19 // *Nature*. 2021. Vol. 600, № 7889. P. 472–477
8. Zeberg H., Pääbo S. Te major genetic risk factor for severe COVID-19 is inherited from Neanderthals // *Nature*. 2020. Vol. 587. P. 610–612
9. Nakanishi T., Pigazzini S., Degenhardt F., Cordioli M., Butler-Laporte G., Maya-Miles D., Bujanda L., Bouysran Y., Niemi M.E., Palom A., Ellinghaus D., Khan A., Martínez-Bueno M., Rolker S., Amtrano S., Roade Tato L., Fava F., FinnGen, COVID-19 Host Genetics Initiative (HGI), Spinner C.D., Prati D., Bernardo D., Garcia F., Darcis G., Fernández-Cadenas I., Holter J.C., Banales J.M., Frithiof R., Kiryluk K., Duga S., Asselta R., Pereira A.C., Romero-Gómez M., Nafria-Jiménez B., Hov J.R., Migeotte I., Renieri A., Planas A.M., Ludwig K.U., Buti M., Rahmouni S., Alarcón-Riquelme M.E., Schulte E.C., Franke A., Karlsen T.H., Valenti L., Zeberg H., Richards J.B., Ganna A. Age-dependent impact of the major common genetic risk factor for COVID-19 on severity and mortality // *J. Clin. Invest.* 2021. Vol. 131, № 23. P. e152386.
10. He J., Cai S., Feng H., Cai B., Lin L., Mai Y., Fan Y., Zhu A., Huang H., Shi J., Li D., Wei Y., Li Y., Zhao Y., Pan Y., Liu H., Mo X., He X., Cao S., Hu F., Zhao J., Zhong N., Chen X., Deng X., Chen J. Single-cell analysis reveals bronchoalveolar epithelial dysfunction in COVID-19 patients // *Protein Cell*. 2020 Sep. Vol. 11(9). P. 680–687. doi: 10.1007/s13238-020-00752-4.
11. Borczuk A.C., Salvatore S.P., Seshan S.V., Patel S.S., Bussel J.B., Mostyka M., Elsoukkary S., He B., Del Vecchio C., Fortarezza F., Pezzuto F., Navalesi P., Crisanti A., Fowkes M.E., Bryce C.H., Calabrese F., Beasley M.B. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City // *Mod Pathol*. 2020 Nov. Vol. 33(11). P. 2156–2168. doi: 10.1038/s41379-020-00661-1. Epub 2020 Sep 2.
12. Nafilyan V., Islam N., Mathur R., Ayoubkhani D., Banerjee A., Glickman M., Humberstone B., Diamond I., Khunti K. Ethnic differences in COVID-19 mortality during the first two waves of the Coronavirus Pandemic: a nationwide cohort study of 29 million adults in England // *Eur J. Epidemiol.* 2021. Vol. 36, № 6. P. 605–617.

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙНЫХ СЛУЧАЕВ СИНДРОМА УДЛИНЕННОГО ИНТЕРВАЛА QT В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

А.Е. Постригань¹, И.Ж. Жалсанова¹, Л.И. Свинцова², А.А. Сивцев¹,
А.А. Зарубин¹, Н.А. Скрябин¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹
НИИ кардиологии Томский НИМЦ, г. Томск, Россия²

Аннотация

Был осуществлен поиск патогенных мутаций в генах, ассоциированных с синдромом удлинённого интервала QT (СУИQT) с помощью массового параллельного секвенирования у 12 пациентов НИИ кардиологии Томского НИМЦ с диагнозом СУИQT и членов их семей. Поиск патогенных вариантов проводился в генах *KCNQ1*, *KCNH2* и *SCN5A*, ассоциированных с синдромом удлинённого интервала QT 1, 2 и 3-го типов соответственно. Анализ целевых последовательностей выбранных генов осуществлялся с помощью технологии обогащения кодирующих регионов с использованием набора SureSelectXT по протоколу производителя. Все выявленные варианты нуклеотидной последовательности были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру. В результате настоящей работы было

выявлено 5 патогенных вариантов: 3 из них локализованы в гене *KCNQ1*, 1 вариант – в гене *KCNH2* и 1 мутация – в гене *SCN5A*. Были описаны семейные случаи носительства мутаций (5 семей) и их клинико-генетические особенности.

Ключевые слова: наследственные аритмии, синдром удлиненного интервала QT, *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, NGS.

CLINICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF FAMILY CASES OF LONG QT SYNDROME IN THE SIBERIAN REGION

A.E. Postrigan¹, I.Zh. Zhalsanova¹, L.I. Svintsova², A.A. Sivtsev¹,
A.A. Zarubin¹, N.A. Skryabin¹

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Abstract

A search for pathogenic mutations in the genes associated with long QT syndrome (LQTS) was carried out using mass parallel sequencing in 12 patients with a diagnosis «LQTS» and their families. The search for pathogenic variants was carried out in the *KCNQ1*, *KCNH2*, and *SCN5A* genes associated with long QT syndrome types 1, 2, and 3. Analysis of the target sequences of the selected genes was carried out using the coding region enrichment technology using the SureSelectXT kit according to the manufacturer's protocol. All identified variants of the nucleotide sequence were confirmed by direct Sanger sequencing. As a result of this work, 5 pathogenic variants were identified: 3 of them in *KCNQ1* gene, 1 variant in *KCNH2* gene, and 1 mutation in *SCN5A*. We described family cases with mutations (5 families) and their clinical and genetic features. Clinical manifestations of LQTS in carriers of two or more pathogenic variants are also described.

Key words: hereditary arrhythmias, LQTS, *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, NGS.

Актуальность. Врожденный синдром удлиненного интервала QT (СУИQT) – редкое наследственное заболевание, вызванное нарушениями работы ионных каналов сердца и внутрисердечной электрической проводимости. Основные клинические проявления синдрома – удлинение интервала QT на ЭКГ, приступы потери сознания и желудочковые аритмии, которые могут стать причиной внезапной сердечной смерти. Причиной СУИQT являются мутации в генах, кодирующих белковые субъединицы ионных каналов и белки-регуляторы внутриклеточного метаболизма кардиомиоцитов. Выявление этих мутаций представляет собой важную диагностическую задачу, так как дальнейшая тактика лечения подбирается исходя из типа мутации и гена, в котором она локализована. В настоящий момент идентифицировано 16 различных типов врожденного синдрома удлиненного интервала QT. К наиболее распространенным формам СУИQT относятся СУИQT 1, 2 и 3-го типа [1]. СУИQT1 обусловлен мутациями в гене *KCNQ1*, кодирующем α -субъединицу калиевого канала, генерирующего ток I_{Ks} (основной ток реполяризации при высокой частоте сердечного ритма). В гене *KCNQ1* выявлено около 170 мутаций (преимущественно миссенс). Их эффект – уменьшение наружного калиевого тока, в результате чего каналы остаются открытыми дольше, чем обычно, что приводит к задержке реполяризации желудочков и удлинению интервала QT [2].

Мутации в гене *KCNH2* являются причиной СУИQT 2-го типа. Этот ген кодирует α -субъединицу калиевого канала $Kv11.1$, генерирующего ток I_{Kr} . Мутации в этом гене вызывают быстрое закрытие калиевых каналов и уменьшают нормальный рост I_{Kr} , что также приводит к задержке реполяризации в желудочках и удлинению интервала QT [3]. Причиной СУИQT 3-го типа являются мутации в гене *SCN5A*. Данный ген кодирует α -субъединицу натриевого канала, что приводит к нарушению инактивации натриевых каналов, продолжающемуся вхождению ионов Na^+ в клетку и увеличению продолжительности реполяризации кардиомиоцитов. Проведение генетического анализа мутаций в генах *KCNQ1*, *KCNH2* и *SCN5A* рекомендовано всем больным, имеющим клинические проявления СУИQT. Важно также проводить анализ на наличие мутаций родственникам больных с целью выявления бес-

симптомного носительства и более тщательного обследования. Актуальность молекулярно-генетической диагностики обусловлена специфической терапией у носителей мутаций в разных генах.

Цель исследования – изучение клинико-генетических особенностей пациентов с синдромом удлиненного интервала QT в Сибирском регионе.

Материал и методы

Исследование было выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Молекулярно-генетический анализ проводился 12 людям – пациентам НИИ кардиологии Томского НИМЦ с диагнозом СУИQT и членам их семей. Обогащение кодирующих регионов генов *KCNQ1*, *KCNH2* и *SCN5A* было проведено с использованием набора SureSelectXT (Agilent Technologies, США) по протоколу, рекомендованному производителем (Version C3, September 2019). Массовое параллельное секвенирование осуществлялось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, США) по рекомендованному производителем протоколу. Обработка данных секвенирования проведена с использованием набора программ GATK4. Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы Qualimap. Выравнивание прочтений на целевые последовательности генов *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* (GRCh38/hg38) осуществлялось с помощью BWA. Для аннотирования использовалась программа Annovar. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы базы данных OMIM, exac, mutationtaste и литературные данные [4]. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1 000 геномов», ESP6500, gnomAD и Exome Aggregation Consortium. Верификация полученных данных проводилась методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Секвенирование проводилось по протоколу, рекомендованному производителем, на приборе ABI 3730x1 96-capillary DNA analyzer (Applied Biosystems, США).

Результаты

Молекулярно-генетический анализ проводился 12 людям – пациентам с диагнозом СУИQT и членам их семей (5 семей). В результате проведенной работы было выявлено 5 мутаций: три из них расположены в гене *KCNQ1*, по одной мутации в генах *KCNH2* и *SCN5A*. Большинство описанных патогенных вариантов – миссенс-мутации, также описана одна дупликация со сдвигом рамки считывания.

В одной семье у троих человек в гене *KCNQ1* была обнаружена миссенс-мутация с.С691Т. Данный вариант нуклеотидной последовательности локализован в экзоне 5-го гена *KCNQ1* (chr11:2593250C>T) и приводит к замене аргинина на цистеин в высококонсервативном домене белка. Замена приводит к изменению структуры функционально значимой трансмембранной белковой субъединицы калиевого канала, что влечет за собой изменение кинетики канала и приводит к его дисфункции (Arg231Cys, NM_000218). В базе данных ClinVar мутация описана как патогенная (ID: 53086). У всех троих членов семьи с выявленной мутацией было обнаружено удлинение интервала QT на ЭКГ: у пробанда до 534 мс, у брата до 452 мс, у матери – до 464 мс (норма длины интервала QT у женщин – 320–450 мс). Также удлинение интервала QT наблюдалось у сестры матери пробанда (QTc 483–517 мс, данные молекулярной диагностики отсутствуют), что говорит о передаче мутации по материнской линии. Других клинических признаков СУИQT не наблюдалось.

В другой семье выявлена мутация с.G5347A в гене *SCN5A*. Мутация в этом гене вызывает нарушение работы натриевых каналов и удлинение интервала QT. Данный вариант представляет собой миссенс-мутацию в экзоне 27-го гена *SCN5A* (Chr3:38592513C>T), приводящую к замене глутамина на лизин в высококонсервативном домене белка (Glu1766Lys, NM_001099405). Вариант описан в базе данных ClinVar (ID:9377) как мутация, в гетерозиготной форме приводящая к развитию как синдрома удлиненного интервала QT 3-го типа (OMIM: 600163.0008), так и синдрома Бругада (OMIM:601144). Данный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Aggregation Consortium (ExAC) и «1 000 геномов». Мутация выявлена в гетерозиготной форме у пробанда, его отца и брата. У пробанда наблюдалось значительное удлинение интервала – QT до 619 мс, нарушение сердечного ритма. У брата пробанда также диагностирован синдром удлиненного интервала QT 3-го типа, у отца наблюдалось удлинение интервала QT до 547 мс. Также известно, что диагноз СУИQT поставлен

троюродному брату отца пробанда (данные молекулярной диагностики отсутствуют), кроме того, у деда пробанда по отцовской линии отмечено удлинение интервала QT до 480 мс.

Ещё в одной семье у пробанда и его матери был обнаружен вариант нуклеотидной последовательности с.C1513T в 11-м экзоне гена *KCNQ1* (chr11:2662080C>T) в гетерозиготном состоянии. Мутация приводит к замене глутамина на стоп-кодон и остановке синтеза белка. Вариант описан как мутация, которая в гетерозиготной форме приводит к развитию синдрома удлинённого интервала QT 1-го типа. У пробанда удлинение интервала QT впервые отмечено в возрасте 1,5 месяцев, максимальное удлинение – до 503 мс. Отмечены эпизоды повышения артериального давления и приступов головных болей на фоне стресса. У матери удлинение интервала QT не наблюдалось.

В другой семье, у двух человек (пробанда и его матери) выявлена дупликация с.453dupC в экзоне 3 гена *KCNH2* (Chr7:150656678G>GG) в гетерозиготном состоянии, приводящая к сдвигу рамки считывания. Вариант описан как мутация, которая в гетерозиготной форме приводит к развитию синдрома удлинённого интервала QT 2-го типа. У пробанда отмечено удлинение интервала QT до 642 мс. Интервал QT также удлинён у матери пробанда (до 493 мс). В семейном анамнезе – случай смерти деда по материнской линии в молодом возрасте (утонул, причина не установлена).

Другой семейный случай – мутация с.C1256T в гене *KCNQ1*. Данный вариант нуклеотидной последовательности выявлен у пробанда и матери, вариант локализован в 13-м экзоне гена *KCNQ1* (chr11:2776006C>T) в гетерозиготном состоянии, приводит к замене серина на лейцин. Вариант описан как мутация, которая в гетерозиготной форме приводит к дисфункции белка и развитию синдрома удлинённого интервала QT, тип 1 (OMIM:192500). Данный вариант нуклеотидной последовательности зарегистрирован в ClinVar (Variation ID:53000), в контрольных выборках Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Aggregation Consortium (ExAC) и «1 000 геномов» отсутствует. Клинически у пробанда наблюдалось удлинение интервала QT до 469 мс, эпизоды учащенного сердцебиения как при физической/эмоциональной нагрузке, так и в покое (в том числе во сне). Кроме того, у пробанда врожденный порок сердца, дефект межпредсердной перегородки, мигрень с аурой. Удлинение интервала QT также наблюдалось у матери пациентки, у деда по материнской линии – ВСС во сне, с предшествующим приступом потери сознания с судорогами и синкопальными состояниями.

Заключение

В результате настоящей работы были описаны семейные случаи носительства патогенных мутаций (5 семей). Основным клиническим проявлением в семьях было удлинение интервала QT на ЭКГ. В результате анализа спектра мутаций в генах *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* было обнаружено 3 мутации в гене *KCNQ1*, 1 мутация в гене *KCNH2* и 1 в гене *SCN5A*. Большая часть обнаруженных патогенных вариантов – миссенс-мутации, в одном случае была выявлена мутация со сдвигом рамки считывания.

Работа выполнена в рамках темы прикладных научных исследований «Преимплантационная, пренатальная и постнатальная диагностика наследственных заболеваний».

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallace E., Howard L., Liu M. et al. Long QT syndrome: genetics and future perspective // *Pediatr.Cardiol.* 2019. Vol. 40. № 7. P. 1419–1430.
2. Modell S.M., Lehmann M.H. The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review. *Genet. Med.* 2006. Vol. 8 (3). P. 143–55.
3. Moss A.J., Robinson J. Clinical features of the idiopathic long QT syndrome. *Circulation.* 1992. Vol. 85 (1 Suppl). P. I140–4.
4. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Медицинская генетика.* 2017. Т. 16, № 7. С. 4–17.

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА ФОНЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ *ADAMTS1* В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HELA

Р.Р. Савченко¹, А.А. Мурашкина², В.С. Фишман³, Е.С. Сухих^{4,5},
А.В. Вертинский^{4,5}, Л.Г. Сухих⁵, С.А. Васильев¹, И.Н. Лебедев¹

НИИ медицинской генетики Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия³

ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер», Россия, г. Томск⁴

НИ Томский политехнический университет, г. Томск, Россия⁵

Аннотация

Несмотря на большой объем накопившихся в ходе лучевой терапии данных, демонстрирующих индивидуальную радиочувствительность онкологических пациентов, молекулярные механизмы данного феномена остаются недостаточно изученными. Долгое время фокус внимания исследователей был направлен на полиморфизмы в некоторых кандидатных генах, вовлеченных главным образом в репарацию ДНК или метаболизм ксенобиотиков, однако в последнее время все большее внимание уделяется компонентам межклеточного матрикса. В настоящем исследовании проведен анализ влияния нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1* на профиль экспрессии генов в клеточной линии HeLa. Клеточная линия HeLa с нокаутом *ADAMTS1* получена с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Сверхэкспрессия *ADAMTS1* в HeLa обеспечивалась с помощью транзientной трансфекции плазмиды, несущей кодирующую последовательность данного гена. Оценка уровня экспрессии на фоне нокаута *ADAMTS1* проведена с помощью экспрессионных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K. Верификация данных полнотранскриптомного исследования, а также оценка уровня экспрессии генов в клеточной линии со сверхэкспрессией *ADAMTS1* была проведена с помощью ПЦР в реальном времени. Показано, что на фоне нокаута *ADAMTS1* дифференциально экспрессировались 57 генов до облучения и 103 гена после облучения. Некоторые из них были вовлечены в процессы репарации ДНК, контроль клеточного цикла, апоптоз или радиационно-индуцированный клеточный ответ. Показаны изменения экспрессии гена *LXN*, активность которого связывают с радиочувствительностью клеток, в зависимости от уровня экспрессии *ADAMTS1*. По-видимому, *ADAMTS1* вовлечен в формирование радиационно-индуцированного ответа на повреждение ДНК в клетках HeLa *in vitro*.

Ключевые слова: индивидуальная радиочувствительность, *ADAMTS1*, профиль экспрессии генов.

RADIATION-INDUCED GENE EXPRESSION PROFILE AGAINST THE BACKGROUND OF DIFFERENTIAL *ADAMTS1* EXPRESSION IN THE HELA CELL LINE

R.R. Savchenko¹, A.A. Murashkina², V.S. Fishman³, E.S. Sukhikh^{4,5},
A.V. Vertinskiy^{4,5}, L.G. Sukhikh⁵, S.A. Vasilyev¹, I.N. Lebedev¹

Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹

National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk, Russia²

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia³

SRABHCl «Tomsk Regional Oncology Center», Russia, Tomsk⁴

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia⁵

Abstract

Despite the large amount of data accumulated during radiotherapy demonstrating the individual radiosensitivity of cancer patients, the molecular mechanisms of this phenomenon remain insufficiently studied. For a long time, the focus of the researcher's attention was directed to polymorphisms in some candidate genes involved in DNA repair or xenobiotic metabolism, however, in recent years, more attention has been paid to the extracellular matrix components. In the present study, we analyzed the effect of *ADAMTS1* gene knockout or overexpression on the gene expression profile in HeLa cell line. The HeLa cell line with *ADAMTS1* knockout was obtained

using the CRISPR/Cas9 genome editing technology. Overexpression of *ADAMTS1* in HeLa was provided by transient transfection of a plasmid carrying the *ADAMTS1* coding sequence. Gene expression level in the HeLa cells with *ADAMTS1* knockout was assessed using SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K expression microarrays. Verification of the whole transcriptome analysis data, as well as gene expression level in the *ADAMTS1* overexpressed cells, was carried out using real-time PCR. It was shown that 57 genes before irradiation and 103 genes after irradiation were differentially expressed in the *ADAMTS1* knockout cell line. Some of these genes have been involved in DNA repair processes, cell cycle control, apoptosis, or radiation-induced cellular response. Changes in the *LXN* gene expression, which activity is associated with the cell's radiosensitivity, depending on the level of *ADAMTS1* expression are shown. Apparently, *ADAMTS1* is involved in the formation of a radiation-induced DNA damage response in HeLa cells *in vitro*.

Key words: Individual radiosensitivity, *ADAMTS1*, gene expression profile.

Актуальность. На сегодняшний день известно, что чувствительность человека к ионизирующему излучению индивидуальна и изменчива. Однако молекулярные основы индивидуальной радиочувствительности остаются недостаточно изученными. Известно, что она зависит от многих факторов, важная роль среди которых отводится генетическим особенностям индивида. Долгое время с формированием индивидуальной радиочувствительности связывали полиморфизмы некоторых кандидатных генов, главным образом вовлеченных в процессы репарации повреждений молекулы ДНК и метаболизм ксенобиотиков. Однако в последние годы все большая роль в формировании данного феномена отводится межклеточному матриксу. Так, некоторые исследования показывают, что взаимодействия клеток с компонентами матрикса могут способствовать повышению радиорезистентности некоторых типов опухолей [1].

В проведенных нами ранее экспериментах было показано, что здоровые индивиды с различным уровнем фокусов белков репарации ДНК и частотой радиационно-индуцированных микроядер отличаются экспрессией ряда генов, среди которых привлекает внимание *ADAMTS1*. В нашем исследовании, экспрессия *ADAMTS1* возрастала в лимфоцитах индивидов с повышенным уровнем эндогенных фокусов белков репарации ДНК и низкой частотой микроядер после облучения *in vitro*. Данный ген кодирует металлопротеиназу межклеточного матрикса *ADAMTS1*, а его экспрессию связывают с воспалением [2], ремоделированием тканей во время онкогенеза [3], стимуляцией ангиогенеза [4] и некоторыми другими процессами. О связи *ADAMTS1* с радиочувствительностью известно немного, так, например, X.H. Long et al. отмечали возрастание экспрессии данного гена в лимфобластоидных клетках *in vitro* после облучения в дозе 0,2 Гр [5]. Таким образом, согласно результатам, полученным нами ранее, а также данным зарубежных коллег, вероятно, что *ADAMTS1* вовлечен в формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа, однако его роль в данном процессе остается неясной. В попытке приблизиться к пониманию возможных путей участия *ADAMTS1* в клеточном ответе на облучение, в данном исследовании проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в модельной системе *in vitro*.

Цель исследования – оценить радиационно-индуцированный профиль экспрессии генов на фоне дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* в модельной системе *in vitro*.

Материал и методы

В качестве исходной клеточной линии для создания модельной системы для изучения влияния дифференциальной экспрессии *ADAMTS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа была использована клеточная линия карциномы шейки матки HeLa. Культивирование клеточных линий осуществлялось при 37° С в условиях 5 %-CO₂ в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США) и эритромицина (Биосинтез, Россия). Клеточная линия HeLa с нокаутом гена *ADAMTS1* была создана с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9, путем внесения мутации сдвига рамки считывания в кодирующую последовательность гена, как описано в [6]. Сверхэкспрессия изучаемого гена обеспечивалась методом транзientной трансфекции плазмиды, несущей кодирующую последовательность *ADAMTS1* (Addgene #53807) [7], с использованием реагента для трансфекции Липофектамин 3000 (Thermo, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Полученные модельные клеточные линии были подвержены воздействию ионизирующего γ -излучения ⁶⁰Co в дозе 2 Гр на гамма-терапевтическом аппарате Theratron Equinox 100 (Best Theratronics, Канада). Через 30 мин после облучения была начата процедура выделения РНК с помощью реагента Лира (Биолабмикс, Россия) для дальнейшего анализа профиля экспрессии генов. Полученные образцы РНК были использованы для анализа экспрессии генов на фоне нокаута *ADAMTS1* с

помощью микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8×60K (Agilent Technologies, США) по протоколу, рекомендованному производителем, и для верификации полученных данных во всех клеточных линиях с помощью ПЦР в реальном времени.

Статистический анализ данных микрочипового исследования был проведен с помощью модифицированного t-критерия Стьюдента с оценкой значений доли ложноположительного предсказания и поправкой на множественность сравнения по методу Бенджамини–Хохберга. Анализ данных ПЦР в реальном времени осуществлялся с помощью алгоритма $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Результаты

Полнотранскриптомный анализ экспрессионного профиля генов в клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* позволил выявить 57 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) до облучения и 103 гена после воздействия ионизирующим излучением ($p < 0,05$). При этом большая часть ДЭГ была специфична только для облученных или необлученных клеток, в то время как только 23 гена дифференциально экспрессировались и до, и после воздействия γ -излучением. Анализ обогащения с помощью инструмента WebGeshtalt не выявил статистически значимо обогащенных групп генов. Однако с помощью инструмента STRING удалось установить, что 29 из 160 ДЭГ в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* после облучения имеют функциональные связи на уровне белков с генами, вовлеченными в процессы репарации ДНК (*RFC3*, *MSH2*, *MSH6*, *SETD2*, *PRICKLE1*), контроль клеточного цикла на стадии перехода из G_2 в М-фазу (*CDK14*, *RAP2C*, *COG5*, *MSH6*, *RFC3*, *PRICKLE1*, *ARID3A*, *NMU*, *IER3*) и сигнальный путь апоптоза (*RFC3*, *MSH2*, *MSH6*, *FGF13*, *IER3*, *NMU*, *TRPV2*, *SPON2*, *PRICKLE1*).

После применения поправки на множественность сравнений список ДЭГ в необлученных клетках с нокаутом *ADAMTS1* был сокращен до 12 генов (7 генов повышали и 5 генов снижали уровень экспрессии), а в клетках после облучения – до 15 генов (9 генов повышали и 6 генов снижали уровень экспрессии) ($FDR < 0,05$). Примечательно, что ДЭГ со сниженной экспрессией после облучения (*RUNX3*, *ALPK2*, *GAGE7*, *DLG5*, *POU3F2*, *LXN*) связаны с радиационно-индуцированным ответом, репарацией ДНК или апоптозом. Так, *RUNX3* связывается с белковым комплексом Ku70-Ku80, играющим ключевую роль в репарации ДНК [8], сверхэкспрессия *LXN* повышает радиочувствительность клеток к γ -излучению [9], сверхэкспрессия *GAGE7* повышает устойчивость клеток к апоптозу и γ -излучению [10], *ALPK2* и *POU3F2* вовлечены в процессы апоптоза и репарации ДНК [11, 12].

Уровень экспрессии некоторых из этих генов был выборочно верифицирован с помощью ПЦР в реальном времени, а также оценен в клеточной линии HeLa со сверхэкспрессией *ADAMTS1*. Данные анализа с использованием экспрессионных микрочипов подтвердились для генов *ALPK2* и *LXN*. Примечательно, что в то время как клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась сниженной экспрессией *LXN* сверхэкспрессия *ADAMTS1*, напротив, приводила к возрастанию экспрессии *LXN* ($p < 0,05$) (рисунок 1). Более того, восстановление активности *ADAMTS1* в клеточной линии с нокаутом данного гена, приводило к возрастанию экспрессии *LXN* как в необлученных клетках, так и после воздействия γ -излучением (см. рис. 1).

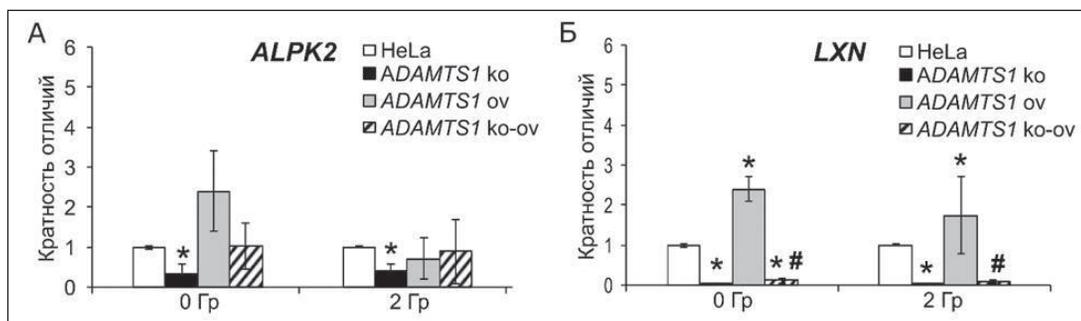


Рис. 1. Гены, изменяющие экспрессию на фоне нокаута и сверхэкспрессии *ADAMTS1*: А – уровень экспрессии гена *ALPK2*; Б – уровень экспрессии гена *LXN*. ko – нокаут гена, ov – сверхэкспрессия гена, ko-ov – восстановление экспрессии гена в клеточной линии с нокаутом; * – статистически значимые различия по сравнению с исходной клеточной линией HeLa, $p < 0,05$, # – статистически значимые различия по сравнению с клеточной линией HeLa с нокаутом гена, $p < 0,05$

Заключение. Таким образом, изменение экспрессии гена *ADAMTS1* влечет за собой изменения экспрессии ряда других генов. Примечательно, что продукты ДЭГ в клеточной

линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* участвуют в процессах репарации ДНК, контроле клеточного цикла и апоптозе. По-видимому, продукт гена *ADAMTS1* вовлечен в формирование радиационно-индуцированного ответа на повреждение ДНК в клетках HeLa *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90143.

ЛИТЕРАТУРА

1. Henke E., Nandigama R., Ergün S. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy // *Frontiers in molecular biosciences*. 2020. P. 160.
2. Rodriguez-Baena F.J., Peris-Torres C., Martino-Echarri E. et al. *ADAMTS1* protease is required for a balanced immune cell repertoire and tumour inflammatory response // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
3. Cal S., López-Otín C. ADAMTS proteases and cancer // *Matrix biology*. 2015. Vol. 44. P. 77–85.
4. Kelwick R., Desanlis L., Wheeler G.N. et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // *Genome Biology*. 2015. Vol. 16, № 1. P. 113.
5. Long X. H., Zhao Z. Q., He X. P. et al. Dose-dependent expression changes of early response genes to ionizing radiation in human lymphoblastoid cells // *International journal of molecular medicine*. 2007. Vol. 19, № 4. P. 607–615.
6. Ran F. A., Pyle P. D., Wright J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
7. Edie S., Zaghloul N.A., Leitch C.C. et al. Survey of human chromosome 21 gene expression effects on early development in Danio rerio // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2018. Vol. 8, № 7. P. 2215–2223.
8. Tanaka Y., Imamura J., Kanai F. et al. Runx3 interacts with DNA repair protein Ku70 // *Experimental cell research*. 2007. Vol. 313, № 15. P. 3251–3260.
9. You Y., Wen R., Pathak R. et al. Latexin sensitizes leukemogenic cells to gamma-irradiation-induced cell-cycle arrest and cell death through Rps3 pathway // *Cell Death Dis*. 2014. Vol. 5, № 10. P. e1493.
10. Cilensek Z. M. et al. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon-g, taxol and g-irradiation // *Cancer biology & therapy*. 2002. Vol. 1, № 4. C. 379–386.
11. Yoshida Y., Tsunoda T., Doi K. et al. *ALPK2* is crucial for luminal apoptosis and DNA repair-related gene expression in a three-dimensional colonic-crypt model // *Anticancer research*. 2012. Vol. 32, № 6. P. 2301–2308.
12. Herbert K., Binet R., Lambert J.P. et al. *BRN2* suppresses apoptosis, reprograms DNA damage repair, and is associated with a high somatic mutation burden in melanoma // *Genes & development*. 2019. Vol. 33, № 5–6. P. 310–332.

СВЯЗАННАЯ С КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

А.А. Сивцев, Н.А. Скрыбин

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Аннотация

В настоящей работе был проведен анализ концентрации и длины фрагментов плазменной и связанной с клеточной поверхностью слабыми ионными взаимодействиями фракций внеклеточной ДНК (вкДНК), а также оценена стабильность вкДНК при хранении в пробирках GBM scf-DNA. В результате количественного анализа гена *SRY* во вкДНК показана возможность использования слабосвязанной с клеточной поверхностью вкДНК как материала для проведения неинвазивного пренатального тестирования.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК (вкДНК), НИПТ, *SRY*.

CELL-SURFACE-BOUND CELL-FREE DNA AS A POTENTIAL MATERIAL FOR NON-INVASIVE PRENATAL TESTING

A.A. Sivtsev, N.A. Skryabin

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

Abstract

In this work, we analyzed the concentration and length of fragments of plasma and cell-surface-bound fractions of cell-free DNA (cfDNA), and also evaluated the stability of cfDNA when stored in GBM scf-DNA

tubes. Quantitative analysis of the SRY gene in cfDNA showed the possibility of using cfDNA weakly bound to the cell surface as a material for non-invasive prenatal testing.

Key words: cell-free DNA, NIPT, SRY.

Актуальность. Врожденные заболевания являются большой проблемой для здравоохранения по всему миру. Среди врожденной и наследственной патологии человека особое место занимают хромосомные аномалии. Среди новорожденных около 1 % всей патологии приходится на долю хромосомных аномалий. Они являются причиной 5-7 % мертворождений, 40 % множественных пороков развития у новорожденных, 50-60 % случаев ранней остановки развития и внутриутробной гибели плода. Установление наличия хромосомных аномалий в пренатальном периоде онтогенеза позволяет не только дать прогноз и определить тактику ведения беременности, но и принять превентивные меры.

Неинвазивные методы позволяют проводить пренатальную диагностику без рисков и осложнений, но эффективность комбинированного неинвазивного скрининга на современном этапе составляет 90 % [1]. В свою очередь технология неинвазивного пренатального тестирования анеуплоидий (НИПТ) получила широкое распространение в последнее десятилетие и показала эффективность около 99 % [2].

Для определения хромосомных аномалий в технологии НИПТ используется свободно циркулирующая в крови матери внеклеточная ДНК (вкДНК), в частности, объектом интереса выступает фетальная фракция. Впервые практика использования вкДНК была в сфере онкологии, где было открыто, что вкДНК делится на фракции: свободно циркулирующую («плазменная» фракция), связанную с клеточной мембраной ионными взаимодействиями («слабосвязанная» фракция вкДНК) и связанную с белковыми структурами. Было показано, что у здоровых доноров крови около 90 % циркулирующих нуклеиновых кислот (вкДНК и вкРНК) связаны с клеточной поверхностью [3].

Основываясь на работах о характеристике распределения вкДНК при онкологических заболеваниях, ранее в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики было показано, что на протяжении всей нормально протекающей беременности фракция, связанная с клеточной поверхностью слабыми ионными взаимодействиями, имеет долю плодной ДНК 34, 74 и 16 % для первого, второго и третьего триместра соответственно, тогда как в «плазменной» фракции доля плодной вкДНК составляет 17, 16 и 12 %, соответственно [4]. Доля фетальной фракции вкДНК, являясь ключевым фактором, была интересна с момента начала первых работ по изучению диагностических возможностей ее использования. Таким образом, при использовании одинакового количества уникальных прочтений увеличится доля прочтений ДНК плода.

Целью – анализ концентрации и длины фрагментов плазменной и «слабосвязанной» фракций вкДНК, оценка доли плодной ДНК в разных фракциях вкДНК из венозной крови беременной и определение стабильности вкДНК в пробирках GBM scf-DNA.

Материал и методы

Анализ вкДНК плода плазменной и «слабосвязанной» фракций проводился беременной пациентке с нормальным картипом плода. Для анализа стабильности плазменной вкДНК при хранении в пробирке была использована венозная кровь здорового индивида. Исследование было выполнено с использованием оборудования НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и ЦКП «Медицинская геномика». Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все пациенты, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Для получения внеклеточной ДНК было использовано 6 мл венозной крови с ЭДТА в специальных пробирках для стабилизации внеклеточной ДНК GBM scf-DNA (Грабиомед, Россия). У здорового индивида была взята венозная кровь в 6 пробирок. Для разделения на плазму и клетки крови пробирки центрифугировались 20 мин при 1600 об, затем плазму переносили в чистые пробирки. Для получения «слабосвязанной» фракции к 1 мл клеточной массы добавили 9 мл раствора фосфатного буфера (ФБ) с 5 mM ЭДТА. Пробы с плазмой и ФБ центрифугировали 20 мин при 1600 об. Плазму переносили в чистые эппендорфы по 1 мл. Из пробирок с ФБ элюатом отобрали надсадок в подготовленные пробирки и центрифугировали при 11 000 об/мин в течении 10 мин. Далее надсадок переносили в чистые пробирки. Фракционирование проводилось на 1, 2, 3, 7, 10 и 15-й день взятия крови, пробирки до фракционирования хранились при комнатной температуре в темноте. Полученные образцы плазмы и ФБ элюата хранились при -70°C . Для выделения вкДНК использовался набор QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit

(Qiagen, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем. Выделение вкДНК было проведено из 7 образцов плазмы и 1 образца ФБ элюата. Определение длин фрагментов проводили с помощью электрофоретической системы Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, США) и электрофоретического биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США). Концентрация вкДНК была измерена с помощью флуориметра Qubit V3 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора High Sensitivity dsDNA по протоколу, рекомендованному производителем. Для подтверждения наличия хромосомы Y во вкДНК матери был проведен количественный анализ гена *SRY* с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Результаты

В ходе проведенной работы было определено, что вкДНК остается стабильной в составе венозной крови в пробирках GBM scf-DNA. Были определены концентрации и длины фрагментов вкДНК с разными условиями хранения. Хранение в венозной крови при комнатной температуре не повлияло на количество извлеченной вкДНК. Так, было выделено 6,18; 7; 8,54; 7,1; 7,77; 8,27 нг/мл плазмы соответственно на первый, второй, третий, седьмой, десятый и пятнадцатый день хранения. Продолжительность хранения также не повлияла на размер фрагментов вкДНК (таблица).

Концентрации и длины фрагментов

№	m, нг	Использованный объем плазмы/элюата, мл	Расчетная концентрация в плазме/элюате, нг/мл	Средняя длина фрагмента, п.о.
L1	18,53	3	6,18	147
L2	15,4	2,2	7	149
L3	17,08	2,2	8,54	166
L7	21,29	3	7,1	167
L10	23,32	3	7,77	171
L15	24,8	3	8,27	160
P1_Plasma	17,1	2,2	7,77	164
P1_PBS	13,65	26	0,525	147

В результате количественного анализа гена *SRY* в образцах плазменной и «слабосвязанной» вкДНК различия между фракциями не было показано (Ct=36). При этом концентрация пробы с плазменной фракцией была 2,28 нг/мкл, тогда как «слабосвязанная» вкДНК имела концентрацию 1,82 нг/мкл. Это может указывать на большую долю фетальной вкДНК в образце со «слабосвязанной» фракцией.

Выводы

Результаты проведенной работы указывают на высокую эффективность использования пробирок GBM scf-DNA для сбора образцов с целью последующего проведения НИПТ. Также результаты пилотного исследования указывают на возможность повышения эффективности выделения вкДНК и качества НИПТ при использовании «слабосвязанной» фракции вкДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках гранта РНФ № 21-65-00017 «Патогенетика наследственных форм умственной отсталости: клеточные, молекулярные и онтогенетические аспекты».

ЛИТЕРАТУРА

1. Allred S.K., Takwoingi Y., Guo B. et al. First trimester ultrasound tests alone or in combination with first trimester serum tests for Down’s syndrome screening // Cochrane Database Syst Rev. 2017. Vol. 3, № 3. CD012600.
2. Oepkes D., Page-Christiaens G.C., Bax C.J. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing // Part I-clinical impact. Prenat Diagn. 2016. Vol. 36, № 12. P. 1083–1090.
3. Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.Y. et al. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors // H Clin. Chem. 2005. Vol. 51. P. 1317–1319.
4. Токарева, А. Г., Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Концентрация циркулирующей и связанной с клеточной поверхностью внеклеточной ДНК матери и плода в крови беременных женщин // Медицинская генетика. 2007. Т. 6, № 8. С. 24–28.

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

М.Ю. Синицкий, А.В. Синицкая, Шишкова, А.В. Понасенко

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия

Аннотация

Показано, что генотоксический стресс может являться одним из триггеров эндотелиальной дисфункции и атеросклероза, однако молекулярно-генетические механизмы этого процесса изучены недостаточно. В то же время, воспаление также играет важную роль в атерогенезе. **Целью данной работы** явилась оценка экспрессии маркеров воспаления в эндотелиальных клетках, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия митомцином С (ММС). В исследовании были включены первичные эндотелиальные клетки коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерий человека (HITAEC), экспонированные 500 нг/мл ММС (экспериментальная группа) или 0,9 % NaCl (контрольная группа). Уровень экспрессии генов интереса определялся с помощью количественной ПЦР после 6 часов экспозиции клеток ММС с последующими сутками культивирования в чистой культуральной среде. Протеомный профиль оценивали методом дот-блоттинга с использованием наборов Human Inflammation Antibody Array (ab134003). Установлено, что в обеих клеточных линиях, экспонированных ММС, отмечено увеличение секреции белков IL-8, MCP-1, IP-10 и PDGFB, а также отсутствие различий в продукции MIP-1b относительно контроля. Белок TIMP-2 синтезировался активнее в экспонированных клетках HCAEC, но не в клетках HITAEС. Белок sTNF RI был отмечен только в клетках HCAEC. Результаты оценки генной экспрессии показали, что клетки HCAEC, экспонированные ММС, характеризуются повышенной экспрессией генов *IL-8*, *MCP-1* и *IP-10*, сниженной экспрессией гена *TIMP-2* и отсутствием изменений уровня мРНК генов *MIP-1b* и *PDGFB* в сравнении с контролем. В экспериментальных клетках HITAEС отмечен повышенный уровень мРНК генов *IL-8* и *IP-10*, пониженная экспрессия гена *TIMP-2*, также отсутствие изменений в экспрессии генов *MCP-1*, *MIP-1b* и *PDGFB*. Экспрессия гена *TNF-RI* не была обнаружена. Таким образом, генотоксический стресс в эндотелиальных клетках, индуцированный ММС, приводит к дифференциальному воспалительному ответу, который, в свою очередь, является триггером эндотелиальной дисфункции.

Ключевые слова: мутагенез, генотоксический стресс, атерогенез, генная экспрессия, протеомное профилирование, воспаление.

GENOTOXIC STRESS LEADS TO PROINFLAMMATORY RESPONSE OF ENDOTHELIAL CELLS: *IN VITRO* STUDY

M.Y. Sinitsky, A.V. Sinitskaya, D.K. Shishkova, A.V. Ponasenko

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract

It was shown, that genotoxic stress can trigger endothelial dysfunction and atherosclerosis, but the molecular genetic mechanisms of this process are poorly investigated. At the same time, inflammation also plays the important role in atherogenesis. **This study aimed** to access the expression of inflammatory markers in the endothelial cells exposed to alkylating mutagen mitomycin C (MMC). Primary human coronary- (HCAEC) and internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) exposed to 500 ng/ml MMC (experimental group) and 0,9% NaCl (control) was used in this research. Gene expression profile was evaluated by quantitative reverse transcription PCR after 6 hours exposure of endothelial cells to MMC (or 0,9% NaCl) followed by 24 hours incubation in the mutagen-free cell growth media. The proteome profile of endotheliocytes was studied by dot blotting using Human Inflammation Antibody Array (ab134003). We discovered that MIF, IL-8, MCP-1, IP-10 and PDGFB were upregulated both in HCAEC and HITAEС, and there are no differences in MIP-1b release. TIMP-2 was upregulated in HCAEC but not in HITAEС. sTNF RI was expressed only in HCAEC. According to gene expression analysis, HCAEC exposed to MMC are characterized by the increased mRNA level of *IL-8*, *MCP-1* and *IP-10*; decreased expression of *TIMP-2* and no differences in the expression of *MIF*, *MIP-1b* and *PDGFB* compared to the control. In HITAEС, increased mRNA level of *IL-8* and *IP-10*; decreased expression of *MIF* and *TIMP-2*, no differences in the expression of *MCP-1*, *MIP-1b* and *PDGFB* was shown.

TNF-RI was not expressed in both cell lines. So, genotoxic stress in endothelial cells induced by MMC leads to differential inflammatory response that can trigger endothelial dysfunction.

Key words: mutagenesis, genotoxic stress, atherogenesis, gene expression, proteome profiling, inflammation.

Актуальность. Атеросклероз – мультифакторное заболевание, в основе которого лежит комплексный воспалительный процесс. В патогенезе атеросклероза задействованы различные клетки (эндотелиальные, гладкомышечные, лимфоциты и макрофаги), а также компоненты внеклеточного матрикса (внеклеточные липиды, коллаген и др.). Начальным этапом атерогенеза является эндотелиальная дисфункция, ассоциированная с синтезом различных факторов роста и провоспалительных цитокинов, являющихся триггером аккумуляции иммунных клеток и компонентов внеклеточного матрикса в стенке кровеносного сосуда [1], что приводит к образованию атеросклеротической бляшки, состоящей из липидного некротизированного ядра, покрытого фиброзной покрышкой с большим количеством гладкомышечных клеток [2]. На настоящий момент известно, что фактором риска развития эндотелиальной дисфункции, помимо классических факторов риска, является и генотоксический стресс [3]. Учитывая высокий уровень заболеваемости и смертности, вызванной атеросклерозом [4], а также высокую генотоксическую нагрузку на население (связанную как с естественными, так и антропогенными мутагенными факторами), понимание молекулярно-генетических механизмов атерогенеза, а также роли генотоксического стресса в данном процессе представляется чрезвычайно важным для современной медицины и сосудистой биологии.

Цель исследования – оценить экспрессию маркеров воспаления в эндотелиальных клетках, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия митомицином С (ММС).

Материал и методы

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC, Cell Applications, США) и внутренней грудной артерий (HITAEC, Cell Applications, США) человека. Клетки культивировали в асептических условиях при повышенной влажности, 5 %м содержании CO₂ и температуре 37 °С в среде для роста клеток Human MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США) до достижения 80 % конfluence, после чего пересеивали в 6-луночные культуральные планшеты, содержащие по 2 мл среды для роста клеток в каждой лунке, и культивировали еще сутки. После окончания культивирования старую среду для роста клеток удаляли и приливали в каждую лунку по 2 мл свежей среды, содержащей 500 нг/мл алкилирующего мутагена ММС (AppliChem, Испания) (экспериментальная группа) или 0,9 % раствор NaCl (контрольная группа). Экспериментальные и контрольные планшеты культивировали в стандартных условиях в течение 6 ч, после чего проводили замену культуральной среды на чистую без добавления каких-либо компонентов и культивировали еще сутки, после чего выводили из эксперимента. Выбор концентрации ММС, использованной в эксперименте, а также времени культивирования был основан на имеющихся рекомендациях и данных экспериментов по моделированию мутагенеза *in vitro* [5].

Для оценки протеомного профиля проводили выделение белка из клеток контрольной и экспериментальной групп с помощью RIPA-буфера (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя. Протеомный профиль оценивали с помощью дот-блоттинга с использованием коммерческого набора Human Inflammation Antibody Array (Abcam, Великобритания) на блот-сканере C-DiGit (LI-COR, США).

Выделение РНК из клеток и ее очистка от геномной ДНК были проведены с помощью коммерческих наборов RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия). На основе выделенной РНК с помощью коммерческих наборов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезировали молекулу комплиментарной ДНК (кДНК). Экспрессия генов *IL8*, *MCP-1*, *IP-10*, *MIP-1b*, *TIMP-2*, *TNF-RI* и *PDGFB* оценивалась в клетках из экспериментальной и контрольной групп с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием праймеров с флуоресцентным красителем SYBR Green, синтезированных ЗАО «Евроген» (г. Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Эксперимент по оценке генной экспрессии был выполнен в строгом соответствии с существующими стандартами [6]. ПЦР проводили в 96-луночном планшете, содержащем, помимо анализируемых образцов, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль.

Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировались в трех технических повторах. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 10 мкл реакционной смеси, включающей в себя 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного праймеров (ЗАО «Евроген», Москва) и 5 мкл кДНК в концентрации 10 нг/мкл. ПЦР проводилась по следующей программе: 2 мин. при 50 °С (1 цикл), 10 мин. при 95 °С (1 цикл), 15 с при 95 °С с последующими 60 с при 60 °С (40 циклов). В качестве референсных были использованы гены *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (ЗАО «Евроген», Москва). Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и выражали как кратность изменения относительно контрольных образцов.

Статистический анализ результатов исследования был проведен в программе GraphPad Prism 9 и ImageJ.

Результаты

Результаты анализа протеомного профиля изученных клеточных культур представлены на рисунке 1.

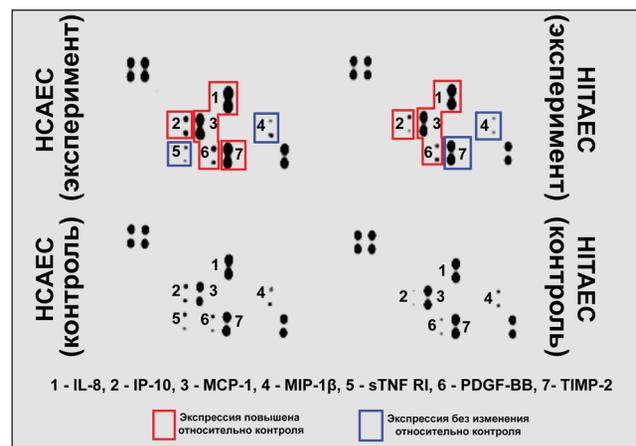


Рис. 1. Результаты протеомного профилирования эндотелиальных клеток: HCAEC – эндотелиальные клетки коронарной артерии; HITAEC – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии

В обеих изученных клеточных линиях, экспонированных ММС, отмечено увеличение секреции белков *IL-8*, *MCP-1*, *IP-10* и *PDGFB*, а также отсутствие различий в продукции *MIP-1b* относительно контроля. Белок *TIMP-2* синтезировался активнее в экспонированных ММС клетках HCAEC, но не в клетках HITAEC. Белок *sTNF RI* был отмечен только в клетках HCAEC, в которых он экспрессировался на одинаковом уровне и в контроле, и в эксперименте. Для валидации полученных результатов протеомного профилирования был проведен анализ генной экспрессии соответствующих генов. Установлено, что клетки HCAEC, экспонированные ММС, характеризуются повышенной экспрессией генов *IL-8*, *MCP-1* и *IP-10*, сниженной экспрессией гена *TIMP-2* и отсутствием изменений уровня мРНК генов *MIP-1b* и *PDGFB* в сравнении с контролем. В экспериментальных клетках HITAEC отмечены повышенный уровень мРНК генов *IL-8* и *IP-10*, пониженная экспрессия гена *TIMP-2*, также отсутствие изменений в экспрессии генов *MCP-1*, *MIP-1b* и *PDGFB*. Ген *TNF-RI* не экспрессировался ни в одной из изученных групп (таблица).

Кратность изменения генной экспрессии в экспонированных митомидином С эндотелиальных клетках относительно контроля

	HCAEC	HITAEC
<i>IL-8</i>	10,9*	2,7*
<i>MCP-1</i>	2,2*	1,1
<i>IP-10</i>	5,7*	3,6*
<i>MIP-1b</i>	0,9	0,8
<i>PDGFB</i>	1,2	1,1
<i>TIMP-2</i>	0,6*	0,6*
<i>TNF-RI</i>	–	–

Примечание. * – значимые отличия от контрольной группы.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что первичные эндотелиальные клетки различных артерий человека характеризуются дифференциальной чувствительностью к ММС-индуцированному генотоксическому стрессу, что проявляется в различном характере экспрессии маркеров воспалительного ответа. Более того, обнаруженные изменения фенотипа эндотелиальных клеток на протеомном уровне не всегда подтверждаются на уровне генной экспрессии что свидетельствует о наличии эпигенетических и посттрансляционных механизмов регуляции синтеза молекул, участвующих в воспалительном ответе эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1228.2021.1.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis // Nature. 2011. Vol. 473, № 7347. P. 317–325.
2. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture // Circ Res. 2014. Vol. 114, № 12. P. 1852–1866.
3. Синицкий М.Ю., Цепочкина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В. Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомидина С // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67, № 2. С. 130–136.
4. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Lancet. 2018. Vol. 392, № 10159. P. 1736–1788.
5. Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay // Mutagenesis. 2004. Vol. 19, № 4. P. 277–284.
6. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clin Chem. 2009. Vol. 55, № 4. P. 611–622.

ЭФФЕКТЫ МОДУЛЯТОРОВ SIRT1 НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ C57BL/6 И DISC1-Q31L^{-/-} ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НЕПРЕДСКАЗУЕМОМ МЯГКОМ СТРЕССЕ

К.В. Смирнова^{1,2}, Д.А. Бердюгина²

Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия¹
НИИ нейронаук и медицины, г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

Депрессия является актуальной проблемой для всемирного здравоохранения. Для изучения патогенеза этого заболевания используются различные экспериментальные подходы. В данной работе в качестве модели депрессии использовали мышей Disc1-Q31L^{-/-} и C57BL/6, которые были подвержены четырехнедельному хроническому непредсказуемому мягкому стрессу (ХНМС). Для изучения механизмов, лежащих в основе развития патологических состояний в условиях стресса, оценивали влияние модуляторов активности SIRT1 на выраженность депрессивно-подобного поведения. В качестве активатора и ингибитора SIRT1 использовали ресвератрол и никотинамид соответственно. Показано, что ХНМС вызывает выраженное депрессивно-подобное поведение мышей C57BL/6, но не влияет на депрессивный статус мышей Disc1-Q31L^{-/-}, что открывает новые возможности в исследовании роли DISC1 в реакциях на стресс. Как активация, так и ингибирование SIRT1 не влияли на поведение животных обоих генотипов в тесте принудительного плавания в условиях ХНМС. Выявлено, что никотинамид – ингибитор SIRT1 – снижает социальное взаимодействие у C57BL/6, но не меняет его у мышей Disc1-Q31L^{-/-}. Таким образом, мутация в гене Disc1 приводит к отсутствию поведенческого ответа на фармакологическую модуляцию SIRT1 в условиях ХНМС, что свидетельствует о вовлечении в этот путь общих для SIRT1 и DISC1 регуляторных механизмов.

Ключевые слова: стресс, психопатологии, SIRT1, Disc1, ресвератрол, никотинамид, поведение.

EFFECTS OF SIRT1 MODULATORS ON C57BL/6 AND DISC1-Q31L^{-/-} MICE BEHAVIOR UNDER CHRONIC UNPREDICTABLE MILD STRESS

K.V. Smirnova¹, D.A. Berdyugina²

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia¹

Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia²

Abstract

Depression is a current global health problem. Various experimental approaches are used to study the pathogenesis of this disease. In our study, Disc1-Q31L^{-/-} and C57BL/6 mice subjected to chronic unpredictable mild stress (CUMS) for four weeks were used as models of depression. To study the mechanisms underlying the development of pathological behavior under stress conditions, the effect of SIRT1 activity modulation on the severity of depressive-like behavior was evaluated. Resveratrol and nicotinamide were used as activator and inhibitor of SIRT1, respectively. It has been shown that CUMS causes pronounced depressive-like behavior in C57BL/6 mice, but depressive state of Disc1-Q31L^{-/-} mice was not affected. This data open new possibilities to study DISC1 role in stress responses. Both activation and inhibition of SIRT1 did not affect the behavior of animals of both genotypes in the forced swimming test under CUMS conditions. Revealed that nicotinamide, an inhibitor of SIRT1, reduces social interaction in C57BL/6 but does not affect this behaviour in Disc1-Q31L^{-/-} mice. Thus, a mutation in the *Disc1* gene leads to the absence of behavioral response to the pharmacological modulation of SIRT1 under CUMS conditions, which indicates the involvement of regulatory mechanisms common to SIRT1 and DISC1 in this pathway.

Key words: stress, psychopathology, SIRT1, Disc1, resveratrol, nicotinamide, behavior.

Актуальность. Психические заболевания в современном мире – крайне распространенное явление. Так, по данным на 2017 г., около 970 млн человек по всему миру страдают ими [1]. Неблагоприятные жизненные обстоятельства и стресс являются главными предпосылками их развития, в особенности у индивидов, генетически предрасположенных к этим заболеваниям [2]. Так, среди генов-кандидатов психических расстройств интерес представляет *Disc1*, ассоциированный с большим количеством психопатологий. Мыши Disc1-Q31L^{-/-}, несущие точечную мутацию в гене *Disc1*, характеризуются признаками депрессивно-подобного состояния и используются в изучении путей регуляции патологических процессов, приводящих к нарушению поведения [3]. Отдельный интерес представляет оценка депрессивного статуса этих мышей под действием хронического непредсказуемого мягкого стресса (ХНМС), который является общепризнанным протоколом для моделирования депрессивно-подобного поведения, в том числе на мышах C57BL/6, на основе которых была выведена линия Disc1-Q31L^{-/-} [3, 4].

В последнее время в качестве потенциальных терапевтических мишеней для лечения психопатологий рассматривается NAD⁺-зависимая деацетилаза гистонов SIRT1, вовлеченная во множество биологических процессов. Существуют противоречивые сведения о влиянии активации SIRT1 на депрессивно-подобное состояние. В литературе есть свидетельства, как о снижении, так и об усилении депрессивно-подобного поведения при активации SIRT1 [5, 6]. Актуальным вопросом также является вовлечение SIRT1 в регуляцию поведения мышей с мутацией в гене *Disc1* в условиях хронического стресса. Влияние ингибирования SIRT1 не изучено на моделях депрессии.

Цель исследования – анализ эффектов стимуляции и ингибирования SIRT1 на депрессивно-подобный фенотип и социальное взаимодействие мышей C57BL/6 и Disc1-Q31L^{-/-} в условиях ХНМС.

Были поставлены следующие задачи: 1) оценить эффект ХНМС на поведенческий фенотип мышей Disc1-Q31L^{-/-}; 2) выявить эффект влияния активации SIRT1 ресвератролом и ингибирования никотинамидом на поведение мышей C57BL/6 и Disc1-Q31L^{-/-} в тестах «принудительное плавание» и «социальное предпочтение» в условиях ХНМС.

Материал и методы

В работе использовали самцов мышей двух линий C57BL/6 и Disc1-Q31L^{-/-} в возрасте 2–3 мес. Животных содержали в условиях четырехнедельного ХНМС в соответствии с ранее опубликованными протоколами [4]. С третьей недели ХНМС животным внутривентриально

вводили препараты: ресвератрол (RSV – 40 мг/кг) и никотинамид (NAA – 500 мг/кг). Дозы взяты из литературных источников [5, 7]. В качестве контроля использовали животные обоих генотипов с введением растворителя (0,9 % NaCl) и без него. Мышей контрольных групп также подвергали ХМНС. Для оценки эффекта влияния стресса в качестве групп сравнения использовали интактных животных обоих генотипов. Поведение оценивали в тестах, «принудительное плавание» и «социальное предпочтение» [3]. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica. Для выборок с нормальным распределением использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим post-hoc-анализом методом Фишера.

Результаты

Результат двухфакторного анализа ANOVA показал значимое влияние фактора ХМНС [F(1,30) = 55,105; p<0,0001], который вызывал выраженное депрессивно-подобное поведение у мышей C57BL/6 (LSD, p<0,0001), кроме того показано взаимодействие факторов генотипа и стресса [F(1,30) = 43,518; p<0,0001]. ХМНС не влиял на мышей Disc1-Q31L^{-/-} (рис. 1, А, В). В тесте социальных предпочтений показано значимое влияние фактора ХМНС [F(1,30) = 19,766; p<0,01], который приводил к увеличению времени социального взаимодействия у мышей C57BL/6 (LSD, p<0,05). Также показано взаимодействие факторов генотипа и стресса [F(1,30) = 15,776; p<0,01]. Disc1-Q31L^{-/-} не показали изменения социального предпочтения в ответ на стресс. Таким образом, мутация в гене *Disc1* препятствует усугублению признаков депрессивно-подобного состояния и возникновению аномального социального поведения в ответ на ХМНС.

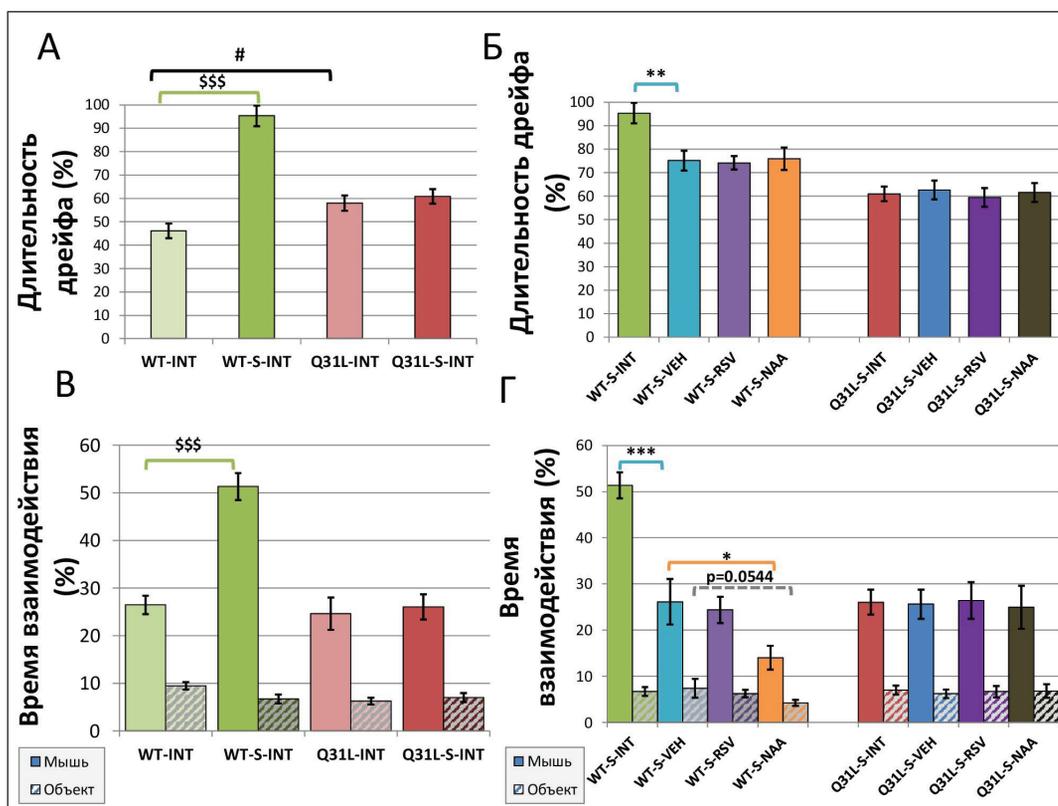


Рис. 1. Результаты поведенческого тестирования: А, Б – результаты теста «принудительное плавание»; В, Г – результаты теста «социальное предпочтение», где «мышь» – социальный интродер, самец линии C57BL/6, а «объект» сопоставимая по размерам с мышью-интродером игрушка, выступающая в качестве несоциального объекта. WT – мыши C57BL/6; Q31L – мыши Disc1-Q31L^{-/-}; S – животные, содержавшиеся в условиях ХМНС; INT – группа без введения препаратов; VEH – группа с введением растворителя; RSV – группа с введением ресвератрола; NAA – группа с введением никотинамида. *# – p<0,05; **###\$\$\$ – p <0,01; ****###\$\$\$ – p <0,0001

В условиях стресса активация SIRT1 с помощью RSV не оказывала влияния на депрессивный статус и социальное поведение мышей C57BL/6 и Disc1-Q31L^{-/-}. Ингибирование SIRT1 в условиях ХМНС не оказало эффекта на поведение мышей обоих генотипов в тесте «принудительное плавание» (рис. 1, Б). В тесте «социальное предпочтение» результат двухфакторного анализа ANOVA показал значимое влияние фактора введения препаратов

[$F(3,71) = 6,936$; $p < 0,01$], а также взаимодействие факторов генотипа и препаратов [$F(3,71) = 6,352$; $p < 0,01$]. Так, NAA снижает время взаимодействия с интродером в условиях ХНМС у мышей C57BL/6 (LSD, $p < 0,05$). В группе *Disc1-Q31L^{-/-}* подверженной ХНМС, введение NAA не оказал влияния на социальное взаимодействие (рис. 1, Г). Таким образом, мутация в гене *Disc1* приводит к отсутствию ответа на фармакологическую модуляцию SIRT1 на поведенческом уровне. Кроме того SIRT1 принимает участие в регуляции социального поведения мышей C57BL/6 в условиях ХНМС.

Заключение

В результате исследования было выявлено, что DISC1 играет важную роль в реакции на хронический стресс и взаимодействует с SIRT1 в условиях ХНМС, регулируя социальное поведение у мышей C57BL/6. Таким образом, эти новые данные позволяют расширить знания о функциональной роли DISC1 и SIRT1 в реакциях на стресс и механизмах работы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.

ЛИТЕРАТУРА

1. James S. L., Abate D., Abate K. H., Abay S. M., Abbafati C., Abbasi N., Abdollahpour I. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *The Lancet*. 2018. Vol. 392, № 10159. P. 1789–1858.
2. Uher R. Gene–environment interactions in severe mental illness // *Frontiers in psychiatry*. 2014. Vol. 5. P. 48.
3. Lipina T.V. et al. Synergistic interactions between PDE4B and GSK-3: DISC1 mutant mice // *Neuropharmacology*. 2012. Vol. 62, № 3. P. 1252–1262.
4. Antoniuk Svitlana et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019, № 99. P. 101–116.
5. de Oliveira M.R. et al. Molecular mechanisms underlying the anti-depressant effects of resveratrol: a review // *Molecular neurobiology*. 2018. Vol. 55, № 6. P. 4543–4559.
6. Kim H.D. et al. SIRT1 mediates depression-like behaviors in the nucleus accumbens // *Journal of Neuroscience*. 2016. Vol. 36, № 32. P. 8441–8452.
7. Smith A.C. et al. Effects of nicotinamide on spatial memory and inflammation after juvenile traumatic brain injury // *Behavioural brain research*. 2019. Vol. 364. P. 123–132.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ НИ-С ДЛЯ ПОИСКА СБАЛАНСИРОВАННЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ В ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Я.К. Степанчук^{1,2}, М.М. Гридина^{1,6}, Э.С. Валеев^{1,2}, А.Ф. Сайфитдинова^{3,4},
Н.В. Шилова⁵, И.Н. Лебедев⁶, В.С. Фишман^{1,2,6,7}

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия¹

Новосибирский Государственный Университет, г. Новосибирск, Россия²

Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург, Россия³

Международный центр репродуктивной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия⁴

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва, Россия⁵

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия⁶

Институт Искусственного Интеллекта ПАО Сбербанк, г. Москва, Россия⁷

Аннотация

Частота сбалансированных хромосомных перестроек в популяции человека достигает 0,2–0,4 %. В большинстве случаев сбалансированные перестройки не проявляются фенотипически и их носители часто не знают о своем состоянии до тех пор, пока не будет проведено кариотипирование [1]. Однако у таких людей наблюдается патологическая сегрегация хромосом в мейозе, что может приводить к мейотическому аресту или продукции несбалансированных гамет [2]. Для увеличения шанса на рождение здорового ребенка пары, в которых один или оба родителя являются носителями сбалансированных транслокаций, обращаются к методу экстракорпорального оплодотворения. Существующие методы преимплантационного генетического тестирования детектируют случаи несбалансированного кариотипа, но не позволяют эффективно выявлять сбалансированные транслокации у эмбриона. Хромосомы в интерфазном ядре занимают определенные территории [3]. Следовательно, в норме частота кон-

тактов внутри одной хромосомы выше, чем между разными. При транслокации участки, изначально расположенные на разных хромосомах, становятся линейно сближены, соответственно, вероятность их контактов увеличивается. Метод Hi-C позволяет определять частоту контактов между различными участками генома [4], поэтому хромосомные перестройки приводят к значительным изменениям паттерна Hi-C-контактов [5]. Мы предлагаем новый метод преимплантационной диагностики структурных хромосомных перестроек на основе Hi-C, позволяющий детектировать как несбалансированные, так и сбалансированные реципрокные транслокации в единичных бластомерах и клетках трофобластического эмбриона человека.

Ключевые слова: Hi-C, Hi-C единичных клеток, структурные вариации генома, хромосомные перестройки, преимплантационное генетическое тестирование.

APPLICATION OF HI-C FOR BALANCED TRANSLOCATION DETECTION IN HUMAN SINGLE CELLS

Y.K. Stepanchuk^{1,2}, M.M. Gridina^{1,6}, E.S. Valeev^{1,2}, A.F. Saifitdinova^{3,4},
N.V. Shilova⁵, I.N. Lebedev⁶, V.S. Fishman^{1,2,6,7}

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia¹

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia²

Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg, Russia³

International Centre for Reproductive Medicine, Saint Petersburg, Russia⁴

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia²⁵

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,

Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia⁶

Artificial Intelligence Research Institute, Moscow, Russia⁷

Abstract

In the human population the frequency of balanced rearrangements is 0,2–0,4 %. In most cases, balanced rearrangements do not appear phenotypically. Translocation carriers are often unaware of their condition until karyotyping has been performed [1]. However, a malsegregation segregation of chromosomes during meiosis I is observed among such patients, which can lead to the meiotic arrest or the production of unbalanced gametes [2]. To improve the chance of having a healthy child, couples with one or both parents having balanced translocations are advised to in vitro fertilization. Current methods of preimplantation testing detect cases of unbalanced karyotype, but do not effectively reveal balanced translocations in the embryo. The Hi-C method determines spatial interplay between genome regions [3]. The chromosomes occupy certain territories in the interphase nucleus [4]. Therefore, the frequency of contacts within one chromosome is higher than between different chromosomes. In case of translocation, the regions located on different chromosomes become linearly close, therefore, the probability of their interaction increases, which manifests itself at the level of Hi-C analysis. We propose a new Hi-C-based preimplantation testing method to detect both unbalanced and balanced reciprocal translocations in single blastomeres and human embryonic trophectoderm cells.

Key words: Hi-C, single cell Hi-C, chromosomal structural variations, chromosomal aberrations, preimplantation genetic testing.

Актуальность. По данным на 2018 г. с помощью процедуры экстракорпорального оплодотворения рождены уже более 10 млн человек [6]. С каждым годом эта цифра увеличивается, что связано с ухудшением показателей репродуктивного здоровья населения и эффективностью технологий вспомогательной репродуктивной медицины в преодолении нарушений фертильности у некоторых категорий пациентов. Носители сбалансированных транслокаций часто страдают от бесплодия, повторяющихся выкидышей и рождения детей с тяжелыми нарушениями развития. Кроме того, часть потомков, имеющих сбалансированный кариотип, будут являться носителями транслокаций, что приведет в дальнейшем к таким же репродуктивным проблемам [7]. В связи с чем очевидна необходимость эффективного метода анализа эмбриона до его переноса матери, позволяющего установить наличие или отсутствие хромосомных перестроек, в том числе и сбалансированных.

Цель исследования – адаптация Hi-C единичных клеток для применения в целях преимплантационной генетической диагностики структурных хромосомных перестроек для детекции сбалансированных и несбалансированных транслокаций у эмбрионов человека.

Материал и методы

Образцы крови были получены в Генетической клинике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) были получены из лимфоцитов, предоставленных коллегами из Медико-генетического научного центра РАМН, согласно протоколу [8]. Для проведения Hi-C необходимо число клеток отбирали под микроскопом и фиксировали 2 % формальдегидом 10 мин. Мы ввели ряд модификаций в ранее опубликованный протокол Hi-C единичных ядер (snHi-C) [9], а именно: фиксированные клетки заключали в агарозу с низкой температурой плавления, использовали биотинилирование концов хроматина и последующее обогащение целевыми продуктами лигирования, отказались от использования полногеномной амплификации. После фрагментации ДНК эндонуклеазой рестрикции *AluI* приготовление библиотек для секвенирования проводили с помощью набора KAPA HyperPrep.

Результаты

В протоколе Hi-C обычно рекомендуют использовать 2,5–5 млн клеток. Мы оценили возможность применения Hi-C для обнаружения транслокаций в условиях ограниченного количества исходного материала. Используя разработанный нами метод, мы приготовили Hi-C библиотеки из нескольких десятков клеток линии ИПСК iP10-2 с известной транслокацией (46,XX,t(5;10)). Полученные тепловые карты пространственных контактов (рис. 1) отражают реципрокную транслокацию между хромосомами 5 и 10, которая была ранее подтверждена цитогенетически $-t(5;10)(q11.2;q11.2)dn$ и проведением эксперимента Hi-C на большом числе клеток. Таким образом, Hi-C-анализ единичных клеток способен выявлять сбалансированные хромосомные транслокации.

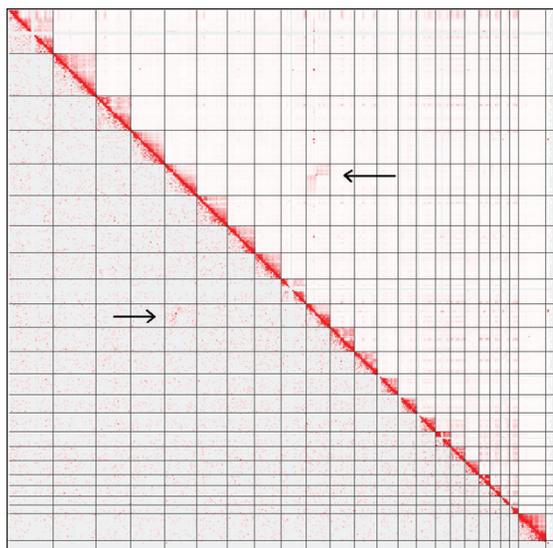


Рис. 1. Карты контактов, построенные на основании анализа 2,5 млн клеток iP10-2 – выше диагонали, ниже – несколько десятков клеток

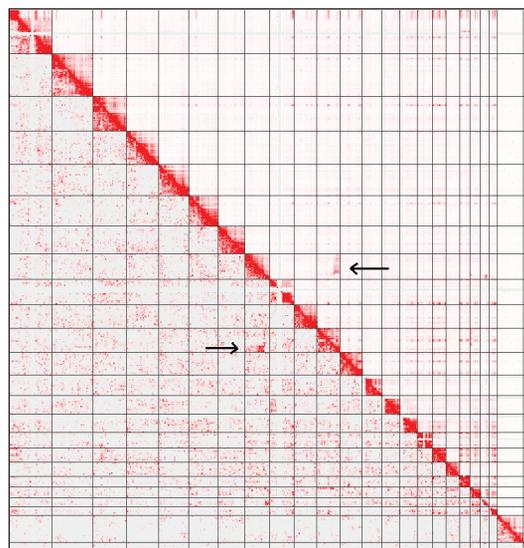


Рис. 2. Карты контактов для лимфоцитов пациента P47. Выше диагонали – карта, построенная на основании анализа 2,5 млн клеток, ниже – 8 клеток

Для того чтобы определить, насколько разработанная методика чувствительна к используемому типу клеток, мы провели анализ лимфоцитов периферической крови от пациента P47, у которого на основании ранее проведенного Hi-C и стандартного кариотипирования были обнаружены сбалансированные транслокации между 8, 11, 20 и 21-й хромосомами (46,XY,t(8;11;20;21)). Четыре библиотеки было приготовлено из лимфоцитов пациента, для каждой из которых брали по 8 клеток, что сопоставимо с числом клеток при биопсии трофобласта эмбриона. Несмотря на неглубокое секвенирование (менее 500 тыс. прочтений) приготовленных библиотек, во всех случаях нам удалось детектировать транслокации t(8,11), а при объединении 4 реплик мы смогли обнаружить оставшиеся перестройки (рис. 2).

Заключение

Разработанный нами протокол Hi-C на малом количестве исходного материала позволяет детектировать сбалансированные реципрокные транслокации. Кроме того, полученные карты пространственных контактов дают основание предположить, что этот метод, после должной верификации, может быть предложен для преимплантационной генетической диа-

гностики структурных хромосомных перестроек для выявления как несбалансированных, так и сбалансированных транслокаций у эмбрионов человека на основе исследования нескольких клеток трофэктодермы.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-29-13021 (получение первичного материала и ИПСК) и РНФ 21-65-00017 (анализ данных единичных клеток).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tšuiiko O., Dmitrijeva T., Kask K., Tammur P., Tõnisson N., Salumets A., Jatsenko T. Detection of a balanced translocation carrier through trophoctoderm biopsy analysis: a case report // *Mol. Cytogenet.* 2019. Vol. 12, № 1. P. 28.
2. Wilch E.S., Morton C.C. Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. Vol. 1044. P. 1–14.
3. Cremer T., Cremer M. Chromosome Territories // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. Vol. 2. № 3. P. a003889–a003889.
4. Belton J. M., McCord R. P., Gibcus J. H., Naumova N., Zhan Y., Dekker J. Hi-C: A comprehensive technique to capture the conformation of genomes // *Methods.* 2012. Vol. 58, № 3. P. 268–276.
5. Dudchenko O., Batra S.S., Omer A.D., Nyquist S.K., Hoeger M., Durand N.C., Shamim M.S., Machol I., Lander E.S., Aiden A.P., Aiden E.L. De novo assembly of the Aedes aegypti genome using Hi-C yields chromosome-length scaffolds // *Science.* 2017. Vol. 356, № 6333. P. 92–95.
6. Fishel S. First in vitro fertilization baby-this is how it happened // *Fertil. Steril.* 2018. Vol. 110, № 1. P. 5–11.
7. Verdoni A., Hu J., Surti U., Babcock M., Sheehan E., Clemens M., Drewes S., Walsh L., Clark R., Katari S., Sanfilippo J., Saller D.N., Rajkovic A., Yatsenko S.A. Reproductive outcomes in individuals with chromosomal reciprocal translocations // *Genet. Med.* 2021. Vol. 23. № 9. P. 1753–1760.
8. Gridina M.M., Orlova P.A., Minina J.M., Shitik E.M., Lemskaya N.A., Grishchenko I.V., Dol'skiy A.A., Shorina A.R., Maksimova Y.V., Yudkin D.V., Serov O.L. Establishment of an induced pluripotent stem cell line (ICGi026-A) from peripheral blood mononuclear cells of a patient with fragile X syndrome // *Stem Cell Res.* 2020. Vol. 49. P. 102070.
9. Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandão H.B., Ulianov S.V., Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A., Tachibana-Konwalski K. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition // *Nature.* 2017. Vol. 544. № 7648. P. 110–114.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА

К.В. Субботина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Аннотация

Саркома Юинга является одной из самых агрессивных опухолей костной ткани, которая возникает преимущественно в молодом возрасте и характеризуется высокой степенью злокачественности [1]. Ранняя диагностика с помощью введения в практику современных методов играет важную роль в улучшении показателей излечения и выживаемости при саркомах. Поэтому нами была поставлена задача разработать и исследовать широкодоступный молекулярно-генетический метод диагностики саркомы Юинга, основанный на обнаружении патогномичных химерных транскриптов с помощью Real-time PCR.

Ключевые слова: саркома Юинга, Real-time PCR, опухоль, химерные транскрипты.

THE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF MOLECULAR GENETIC METHODS FOR DIAGNOSIS OF EWING'S SARCOMA

K.V. Subbotina

Institute of chemical biology and fundamental medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract

Ewing's sarcoma is one of the most aggressive bone tumors, which occurs mainly at a young age and is

characterized by a high degree of malignancy [1]. Early diagnosis by introducing modern methods into practice plays an important role in improving cure rates and survival in sarcomas. Therefore, we decided to develop and investigate a widely available molecular genetic method for the diagnosis of Ewing's sarcoma, based on the detection of pathognomonic chimeric transcripts using Real-time PCR.

Key words: ewing's sarcoma, Real-time PCR, tumor, chimeric transcripts.

Актуальность. Саркома Юинга (СЮ) была описана доктором Джеймсом Юингом – первым профессором патологии Корнельского университета в 1921 г. [2]. Она представляет собой остеолитическое злокачественное новообразование, которое состоит из разных вариантов соединительной ткани. По данным ВОЗ, СЮ является наиболее распространенной детской опухолью костей, которая имеет агрессивное клиническое течение, отличается крайне быстрым распространением метастазов, локализующихся в костном мозге, легких, плевре, внутренних органах и забрюшинном пространстве [3]. Более 85 % СЮ возникают вследствие транслокации t(11;22)(q24;q12), в результате которой ген *EWSR1* 22-й хромосомы соединяется с геном *FLI1*, расположенным на 11-й хромосоме. Оставшиеся 10–15 % случаев занимают альтернативные транслокации, приводящие к слиянию гена *EWSR1* с другими факторами транскрипции ETS, включая *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FEV* и др. Всего существует около 20 транслокаций, характерных для СЮ. Однако среди них есть наиболее часто встречающиеся транскрипты – между генами *EWSR1* и *FLI1*, *EWSR1* и *ATF1*, *EWSR1* и *ERG*. Их частота составляет около 70 % от числа всех транслокаций [4, 6].

Транслокация t(22;11)(q24;q12) в дальнейшем приводит к экспрессии химерного онкопротеина *EWSR1/FLI1*, который уникально экспрессируется во всех опухолевых клетках и поддерживает их выживание [6]. Считается, что онкопротеин *EWSR1/FLI1* участвует не только в патогенезе, но и в прогрессировании саркомы Юинга [7], управляет онкогенной транскрипционной программой, активируя и подавляя множество генов, стимулируя клеточный цикл, ангиогенез и метастазирование. Белок *EWSR1/FLI1* включает и выключает транскрипцию различных генов бесконтрольно. Это нарушение регуляции транскрипции приводит к неконтролируемому росту, пролиферации и аномальному созреванию и выживанию клеток, которые в дальнейшем приводят к развитию опухоли [8, 9].

В основном данное изменение генома детектируется с помощью метода FISH-гибридизации [10]. Использование данного метода требует наличия дорогостоящего оборудования и специфичных зондов, необходимых для выполнения анализа. В основном метод FISH имеет моноплексный формат проведения тестирования. Однако существует метод mFISH, который подразумевает одновременное использование нескольких ДНК-зондов, что существенно увеличивает число перестроек, которые могут быть обнаружены во время выполнения анализа. Тем не менее одновременное применение различных флуорофоров во время проведения тестирования может привести к возникновению перекрестных помех возбуждения и стать причиной формирования неспецифических сигналов флуоресценции, что приведет к снижению чувствительности анализа и затруднению интерпретации результатов [5].

Альтернативным и более точным вариантом обнаружения транслокаций служит метод Real-time PCR, который обладает мультиплексным форматом проведения реакции, что позволяет выявлять сразу несколько специфических для опухолей транслокаций. Метод Real-time PCR широко применяется в клинической практике, доступен во всех лабораториях, проводит исследования минимальной метастатической патологии и оценивает прогностическую значимость подтипов химерных транскриптов даже при отсутствии свежей опухолевой ткани.

Цель исследования – разработка метода диагностики СЮ на основе выявления химерных транскриптов с помощью Real-time PCR.

Материал и методы

Нами была проанализирована информация о спектре химерных транскриптов, а также о частоте их встречаемости при различных формах сарком человека в базе данных COSMIC [11]. С помощью программы Vector NTI был проведен дизайн олигонуклеотидов и флуоресцентно меченных проб для выявления частых транскриптов, имеющих минимальный размер амплифицируемого фрагмента кДНК. Проведено клонирование участков, выбранных олигонуклеотидных последовательностей в плазмидные векторы pBlueScript II SK(+) с дальнейшей возможностью синтеза РНК транскриптов для использования в качестве контрольных систем. Далее проводилась оптимизация метода выделения мРНК для каче-

ственного и количественного увеличения выхода кДНК, при помощи которой был выбран наиболее эффективный метод выделения нуклеиновых кислот, основанный на гидролизе белков с помощью протеиназы К, экстракции белков фенол-хлороформом с последующим спиртовым осаждением.

В ходе дальнейшего исследования анализировались 30 образцов РНК, выделенных из фиксированной ткани в парафиновых блоках СЮ. Клинический материал был предоставлен коллегами из ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург), МНИОИ им. П.А. Герцена (г. Москва). Уровень экспрессии исследуемых слияний генов определялся в ходе проведения Real-time PCR на амплификаторе Cfx 96 (Bio-Rad). В качестве контрольных образцов были использованы плазмиды, сконструированные в нашей лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН.

Результаты. В процессе анализа информации обнаружена высокая частота образования химерных транскриптов СЮ вследствие слияний гена *EWSR1* с генами *FLI1* (60,46 %), *ATF1* (8,32 %), *ERG* (6,5 %), *NRA3* (3,37 %), *CREB1* (1,15 %). Проведён дизайн специфичных праймеров, зондов для выявления наиболее частых перестроек *EWSR1-FLI1*, *EWSR1-ATF1*, *EWSR1-ERG*, *EWSR1-NRA3*, *EWSR1-CREB1*, контрольных фрагментов для Real-time PCR.

В анализируемых 30 FFPE образцах СЮ были обнаружены 14 перестроек *EWSR1-FLI1*, 8 перестроек *EWSR1-ATF1*, 3 перестройки *EWSR1-ERG1*. Перестройки *EWSR1-NRA3* и *EWSR1-CREB1* встречались значительно реже.

Выводы

1) Выполнен дизайн систем олигонуклеотидных праймеров и зондов для выявления наиболее часто встречаемых химерных транскриптов гена *EWSR1* с помощью Real-time PCR, осуществлен дизайн структуры контрольных ДНК с целью дальнейшего клонирования и использования в качестве стандартных систем в процессе Real-time PCR. 2) Выбран наиболее эффективный метод выделения РНК из FFPE блоков, позволяющий получать пригодную для диагностических целей РНК из большинства проанализированных нами блоков (90 %). 3) Осуществлен поиск молекулярных перестроек СЮ с использованием Real-time PCR в предоставленных 30 FFPE образцах. Самыми распространенными перестройками являлись *EWSR1-FLI1* и *EWSR1-ATF1*. 4) Полученные нами данные о частоте встречаемости различных типов химерных транскриптов в целом сопоставимы с таковыми, полученными в Европе и Америке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д. Распространенность злокачественных новообразований в России в 2007–2018 гг. // Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, 2019. 18 с.
2. Феденко А.А., Бохан А.Ю., Горбунова В.А., Махсон А.Н., Тепляков В.В. Практические рекомендации по лечению первичных злокачественных опухолей костей (остеосаркомы, саркомы Юинга). Злокачественные опухоли : Практические рекомендации RUSSCO, 2019 (Т. 9). С. 267–270.
3. Клинические рекомендации. Саркома Юинга у детей. (утв. Минздравом России). 2019. С. 15–18.
4. Gaspar N. Ewing sarcoma: current management and future approaches through collaboration // Journal of Clinical Oncology. 2018. Vol. 33, № 27. P. 3036–3046.
5. Lukumbuzya M. A Multicolor Fluorescence in situ Hybridization Approach Using an Extended Set of Fluorophores to Visualize Microorganisms // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. P. 7–9.
6. Miettinen M. Neural cell adhesion molecule distribution in soft tissue tumors // Human Pathology. 2017. Vol. 24, № 4. P. 62–66.
7. Gamberi G. Molecular Diagnosis in Ewing Family Tumors // Molecular Diagnostics. 2015. Vol. 13, № 3. P. 313–324.
8. Gierisch M.E. USP19 deubiquitinates EWS-FLI1 to regulate Ewing sarcoma growth // Scientific Reports. 2019. Vol. 9, № 7. P. 425–430.
9. Tracey B. L. Differentiating Ewing' sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues // Modern Pathology. 2016. Vol. 20, № 5. P. 397–404.
10. Gargallo P. Precision medicine in Ewing sarcoma: a translational point of view // Clinical and Translational Oncology. 2020. Vol. 2, № 5. P. 28–37.
11. Catalog Of Somatic Mutations in Cancer. 2020.

РОЛЬ ОБМЕНА ХОЛЕСТЕРИНА В ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

Т.С. Усенко^{1,2}, А.И. Безрукова¹, К.С. Башарова¹, М.А. Николаев^{1,2},
А.Д. Изюмченко¹, Д.А. Богданова¹, Е.Г. Гаврилова², И.В. Шлык²,
М.И. Шадрина³, Ю.С. Полушин², П.А. Сломинский³, С.Н. Пчелина^{1,2}

НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ, г. Гатчина, Россия¹

ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия²

Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия³

Аннотация

Цель работы заключалась в оценке изменения параметров холестерина обмена (липидный спектр, экспрессия генов липидного обмена, отобранных в ходе проведения анализа транскриптома мононуклеаров крови) с течением времени у пациентов с тяжелым течением COVID-19 с оценкой исхода заболевания. В исследование было включено 39 пациентов с тяжелым течением COVID-19, которые в ходе наблюдения в течение 30 дней со дня поступления в отделение интенсивной терапии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова были разделены на две подгруппы – 21 умерших (группа 1) и 18 выживших пациентов (группа 2). Также в исследование было включено 20 индивидуумов контрольной группы, которые никогда не были инфицированы COVID-19. В сыворотке крови были оценены показатели липидограммы (общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов (ТГ)). Уровень экспрессии генов, вовлеченных в обмен холестерина (*PPAR γ* , *LDLR*, *LRP6*, *CD36*, *STAB1*, *ANXA2*), определяли методом количественной ПЦР в режиме реального времени с зондами TaqMan. Все параметры оценивались дважды: на момент поступления в отделение интенсивной терапии и через неделю. Нами была выявлена сниженная концентрация ОХС, ЛПВН, ЛПНП, а также повышенная экспрессия генов *PPAR γ* , *CD36*, как в группе 2, так и в группе 1 на момент поступления в отделение интенсивной терапии по сравнению с контролем. Через неделю наблюдали снижение концентрации ЛПВП в группе 1 и, напротив, увеличение концентрации ОХС в группе 2. Экспрессия гена *STAB1* при оценке на 7-й день была выше в группе 1 по сравнению с группой 2 и контролем. Таким образом, нами показана роль нарушения обмена холестерина при тяжелом течении COVID-19. Увеличение экспрессии гена *STAB1* может рассматриваться как предиктор летального исхода COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, экспрессия генов, липидный профиль.

THE ROLE OF CHOLESTEROL METABOLISM IN THE SEVERITY OF COVID-19

T.S. Usenko^{1,2}, A.I. Bezrukova¹, K.S. Basharova¹, M.A. Nikolaev^{1,2},
A.D. Izyumchenko¹, D.A. Bogdanova¹, E.G. Gavrilova², I.V. Shlyk²,
M.I. Shadrina³, Yu.S. Polushin², P.A. Slominsky³, S.N. Pchelina^{1,2}

NRC "Kurchatov Institute" - PNPI, Gatchina, Russia¹

The Pavlov First St.Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia²

Institute of Molecular Genetics, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia³

Abstract

The aim of this work was to prospectively evaluate parameters of cholesterol metabolism (lipid spectrum, expression of lipid metabolism genes selected during transcriptome analysis) in patients with severe COVID-19. 39 patients with severe COVID-19 during observation for 30 days from the date of admission to intensive care unit (ICU) were divided into two subgroups – 21 non-survivors and 18 survivors. Control group included 20 individuals who had never been infected with COVID-19. Lipidogram parameters (concentration of total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL), low density lipoprotein cholesterol (LDL), very low-density lipoproteins (VLDL), triglycerides) in blood serum were determined. Expression level of genes involved in cholesterol metabolism (*PPAR γ* , *LDLR*, *LRP6*, *CD36*, *STAB1*, *ANXA2*) was determined by real-

time quantitative PCR with TaqMan probes. All parameters were evaluated twice: at the time of admission to the Intensive Care Unit and 7 days later. We found a reduced concentration of TC, HDL, LDL and increased expression of *PPAR γ* , *CD36*, both in survived and non-survived patients with COVID-19 at the time of admission to ICU compared to control. It was also shown a decrease of HDL concentration in non-survived patients with severe COVID-19 and increase of TC concentration with more pronounced decrease of expression of genes involved in cholesterol metabolism in survive patients with COVID-19 over time. *STAB1* gene expression was elevated in non-survivors patients with severe COVID-19 compared to survivors and controls. Thus, we have shown the role of cholesterol metabolism in severe COVID-19. Increased *STAB1* expression level may be considered as a predictor of poor outcome of COVID-19.

Key words: COVID-19, gene expression, lipid profile.

Актуальность. COVID-19 – это контагиозное инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2. Несмотря на многочисленность исследований, посвященных изучению патогенеза COVID-19, остается еще множество вопросов, в частности, от чего зависит летальный исход при инфицировании вирусом SARS-CoV-2. В течение последнего года несколько исследований связали метаболизм холестерина с восприимчивостью к COVID-19 и тяжестью инфекции. Ряд исследований показал, что болезнь COVID-19 ассоциирована с дислипидемией [1]. Так, было показано, что уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке является предиктором плохого прогноза заболевания [2]. Ранее мы впервые провели секвенирование РНК мононуклеаров крови у пациентов с тяжелым течением COVID-19 при поступлении в отделение интенсивной терапии с различными исходами заболевания (выжившие/умершие) [3]. В результате нами была показана активация пути рецепторов липопротеиновых частиц низкой плотности у пациентов с COVID-19 с летальным исходом по сравнению с выжившими пациентами с COVID-19.

Цель исследования – оценка изменения параметров холестеринового обмена (липидный спектр, экспрессия генов липидного обмена, отобранных в ходе проведения анализа транскриптома мононуклеаров крови) с течением времени у пациентов с тяжелым течением COVID-19 с оценкой исхода заболевания.

Материал и методы

В исследование вошло 39 пациентов с тяжелым течением COVID-19, поступивших в отделение интенсивной терапии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. В зависимости от исхода заболевания при наблюдении в течение 30 дней пациенты были поделены на две группы: 21 умерших пациентов (группа 1) и 18 выживших пациентов (группа 2). Также была собрана контрольная группа из 20 индивидуумов, которые никогда не были инфицированы COVID-19. Характеристика групп, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Таблица 1.

Характеристика исследуемых групп

Группа	Средний возраст±Ст. Откл., годы	Пол (Мужчины/Женщины)
Группа 1 (N=21)	60,1±9,3	10/11
Группа 2 (N=18)	55,3±12,9	11/7
Контроль (N=20)	59,3±8,0	11/9

В ходе данного исследования проводилось определение общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности, (ЛПОНП) и триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови. Также проводилась оценка экспрессионного профиля генов, вовлеченных в обмен холестерина (*PPAR γ* , *LDLR*, *LRP6*, *CD36*, *STAB1*, *ANXA2*), методом количественной ПЦР в режиме реального времени в лимфоцитах периферической крови, выделенных методом градиентного центрифугирования в градиенте плотности раствора Фиколл (Ficoll-Raque PLUS, GE Healthcare). Тотальная РНК была выделена из лимфоцитов периферической крови с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104, США), кДНК была получена методом обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit (K1622, Thermo scientific, Литва).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием встроенных пакетов R (версия 4.1.2). Для оценки различий между группами использовался тест Манна–Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Нами было показано снижение уровня ЛПНП, ЛПВП в группе 1 и группе 2 по сравнению с контролем на момент поступления в отделение интенсивной терапии (ЛПНП: $p=0,0098$, $p=0,037$ соответственно; ЛПВП: $p=0,00036$, $p=0,024$ соответственно). Также было выявлено снижение уровня ОХС в группе 1 по сравнению с контролем ($p=0,0021$). При этом показатели липидного спектра между группами пациентов не отличались ($p>0,05$) (табл. 2).

При оценке параметров липидного спектра через 7 дней с момента поступления в отделение интенсивной терапии выявлено в динамике снижение уровня ЛПВП в группе 1 ($p=0,049$) и увеличение уровня ОХС ($p=0,037$) в группе 2. Также через 7 дней нами было показано снижение уровня ОХС, ЛПВП и ЛПНП в группе 1 по сравнению с группой 2 ($p=0,002$, $p=0,0058$, $p=0,0025$ соответственно) (табл. 2).

Таблица 2.

Липидный спектр сыворотки крови в исследуемых группах

Параметры	Липидный спектр сыворотки крови, медиана (мин-макс), моль/мл				
	Группа 1 (поступление)	Группа 2 (поступление)	Группа 1 (через неделю)	Группа 2 (через неделю)	Контроль
ОХС	3,50 (2,10-5,79) $p=0,0021^*$	4,19 (2,50-6,70)	2,80 (1,5-5,10)	5,00 (3,9-7,6) $p=0,002^{**}$ $p=0,037^{****}$	5,31 (2,50-7,91)
ЛПВП	1,81 (0,14-3,52) $p=0,00036^*$	2,22 (0,92-4,32) $p=0,024^*$	0,63 (0,21-1,18) $p=0,049^{***}$	1,06 (0,61-1,30) $p=0,0058^{**}$	3,41 (0,71-5,54)
ЛПОНП	0,96 (0,40-1,94)	0,76(0,41-2,01)	1,21 (0,65-1,56)	1,35 (0,47-4,43)	0,72 (0,42-1,26)
ЛПНП	0,83 (0,27-1,39) $p=0,0098^*$	0,89 (0,56-1,46) $p=0,037^*$	1,08 (0,14-3,14)	2,68 (1,80-4,681) $p=0,0025^{**}$	1,09 (0,68-1,95)
ТГ	2,09 (0,88-4,28)	1,66 (0,89-4,50)	2,62 (1,41-3,40)	2,94 (1,02-9,66)	1,59 (0,93-2,78)
КА	3,20 (2,2-6,0)	3,40 (1,6-6,8)	4,00 (2,70-6,00)	4,20 (2,50-7,50)	3,0(2,0-6,0)

Примечание. * – по сравнению с контролем; ** - по сравнению с группой 1 (через неделю); *** – по сравнению с группой 1 (поступление); **** – по сравнению с Группой 2 (поступление).

На момент поступления выявлена повышенная экспрессия генов *PPAR γ* и *CD36* в лимфоцитах периферической крови в группе 1 и группе 2 по сравнению с контролем (*PPAR γ* : $p=0,00024$, $p=0,00048$ соответственно; *CD36*: $p=0,0027$, $p<0,0001$ соответственно), а также гена *ANXA2* в Группе 2 по сравнению с контролем ($p=0,011$) (табл. 3). Статистически значимых различий при оценке уровня экспрессии исследуемых генов в момент поступления в отделение интенсивной терапии между группой 1 и группой 2 выявлено не было ($p>0,05$). При оценке уровня экспрессии через 7 дней с момента поступления в отделение интенсивной терапии была выявлена повышенная экспрессия генов *STAB1* и *CD36* как в группе 1, так и в группе 2 по сравнению с контролем ($p<0,05$). Кроме того, повышенная экспрессия гена *STAB1* наблюдалась в группе 2 по сравнению с группой 1 ($p=0,017$), что подтверждает наши результаты, полученные в ходе анализа транскриптома мононуклеаров крови пациентов с тяжелым течением COVID-19 о связи активации пути рецепторов липопротеинов низкой плотности с летальным исходом. Интересно отметить, что повышение экспрессии гена *STAB1* происходило в обеих группах, однако в Группе 1 было более выраженным. Известно, что экспрессия *STAB1* активируется воспалительными факторами и участвует в метаболизме окисленных липидов [4]. Также в обеих группах наблюдали снижение экспрессии гена

PPAR γ как в группе 1, так и в группе 2 через 7 дней наблюдения по сравнению с моментом поступления в отделение интенсивной терапии ($p < 0,01$).

Таблица 3.

Относительный уровень экспрессии генов лимфоцитов периферической крови исследуемых групп

Гены	Относительный уровень экспрессии исследуемых генов				Контроль
	Группа 1 (поступление)	Группа 2 (поступление)	Группа 1 (через неделю)	Группа 2 (через неделю)	
PPARG	2,55 (0,07-15,82) $p=0,00024^*$	1,62 (0,15-20,63) $p=0,00048^*$	0,07 (0,01-0,55)	0,171 (0,05-1,66)	0,28 (0,02-0,97)
LDLR	1,30 (0,04-3,37)	1,00 (0,027-4,55) $p=0,0047^*$	1,87 (0,83-8,52)	1,476 (0,29-6,654)	0,20 (0,01-0,44)
LRP6	0,91 (0,19-201,04)	1,51 (0,26-13,88)	0,41 (0,07-124,93)	0,61 (0,06-9,33)	0,70 (0,09-7,91)
ANXA2	0,28 (0,04-2,36)	0,48 (0,01-5,58) $p=0,011^*$	0,05 (0,03-0,11)	0,021 (0,03-0,06)	0,18 (0,04-2,57)
STAB1	0,42 (0,06-2,39)	0,55(0,13-21,32)	21,03 (1,12-45,85) $p < 0,05^*$ $p=0,017^{**}$	13,63 (5,92-25,25) $p < 0,05^*$	0,78 (0,05-7,27)
CD36	2,359 (0,15-19,15) $p=0,0027^*$	5,58 (0,32-16,49) $p < 0,0001^*$	2,565 (0,27-13,04) $p < 0,05^*$	1,84 (0,07-25,25) $p < 0,05^*$	0,34 (0,04-3,68)

Примечание. * – по сравнению с контролем; ** – по сравнению с группой 2 (через неделю).

Заключение

Полученные данные подтверждают роль нарушения обмена холестерина в тяжелом течении COVID-19, а именно отрицательную динамику уровня ЛПВП в группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 с летальным исходом. Также подтверждена ассоциация активации экспрессии гена STAB1 с летальным прогнозом.

Работа выполнена при поддержке программы развития Центра исследований генома «Курчатовский геномный центр» (договор № 075-15-2019-1663)

ЛИТЕРАТУРА

1. Sorokin A.V., Karathanasis S.K., Yang Z.H., Freeman L., Kotani K., Remaley A.T. COVID-19-Associated dyslipidemia: Implications for mechanism of impaired resolution and novel therapeutic approaches // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2020. Vol. 34, № 8. P. 9843–9853.
2. Fan J., Wang H., Ye G., Cao X., Xu X., Tan W., Zhang, Y. Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019 // Metabolism: clinical and experimental. 2020. Vol. 107. P. 154243.
3. Vlasov I., Panteleeva A., Usenko T., Nikolaev M., Izumchenko A., Gavrilova E., Shlyk I., Miroshnikova V., Shadrina M., Polushin Y., Pchelina S., Slonimsky P. Transcriptomic Profiles Reveal Downregulation of Low-Density Lipoprotein Particle Receptor Pathway Activity in Patients Surviving Severe COVID-19 // Cells. 2021. Vol. 10. № 12. P. 3495.
4. Olsavszky V., Sticht C., Schmid C., Winkler M., Wohlfeil S., Olsavszky A., Schledzewski K., Goerdts C., Leibing T., Koch P. Exploring the transcriptomic network of multi-ligand scavenger receptor Stabilin-1- and Stabilin-2-deficient liver sinusoidal endothelial cells // Gene. 2020. Vol. 768. P. 145284.

ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ CNV ПРИ НАРУШЕНИЯХ ПСИХОМОТОРНОГО РАЗВИТИЯ И НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Д.А. Федотов, А.А. Кашеварова, М.Е. Лопаткина, О.Ю. Васильева, Е.О. Беляева, Л.П. Назаренко, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия

Аннотация

Известно, что у женщины с невынашиванием беременности (НБ) в анамнезе повышен риск рождения ребенка с нарушением психомоторного развития. Показано, что в большинстве случаев обе эти патологии обусловлены генетическими факторами. Вероятно, общим этиологическим фактором для данных нарушений могут быть вариации числа копий участков ДНК (CNV). В ходе данного исследова-

ния обследованы семьи ($n=405$), имеющие детей с нарушениями психомоторного развития и матерей с известным акушерским анамнезом. Впервые показано, что патогенные/потенциально патогенные CNV статистически значимо чаще встречались в группе семей с НБ у женщины и нарушением психомоторного развития у ее ребенка ($p = 0,006$). Анализ обогащения генов, вовлеченных в CNV, выявил следующие общие категории: «материнский импринтинг» (MP:0003122), «аномальный паттерн эфферентной иннервации улитки» (MP:0004632), «аномальные токи ГАМК-опосредованных рецепторов» (MP:0004008), «увеличение размера скелетных мышечных волокон» (MP:0009399). В то же время группа с НБ включала одну непересекающуюся категорию, связанную с аномалиями морфологии головы. В данную категорию вошли гены *HSD17B2* и *KCNQ2*, мутации в которых у мышей ассоциированы не только с нарушением развития мозга, но и с гибелью эмбриона.

Ключевые слова: Вариации числа копий ДНК (CNV), невынашивание беременности, нарушения психомоторного развития.

PLEIOTROPIC EFFECT OF CNV IN NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS AND MISCARRIAGE

D.A. Fedotov, A.A. Kashevarova, M.E. Lopatkina, O.Y. Vasilyeva,
E.O. Belyaeva, L.P. Nazarenko, I.N. Lebedev

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

Annotation

It is known that women with a history of spontaneous abortion (SA) have an increased risk of having a child with neurodevelopmental disorder (NDD). It was shown that in most cases both of these pathologies are caused by genetic factors. It is likely that a common etiological factor for these disorders may be DNA copy number variation (CNV). In the course of this study, families ($n = 405$) with children with NDD and mothers with known obstetric history were examined. It was shown for the first time that pathogenic/potentially pathogenic CNVs were statistically significantly more common in the group of families with SA in a woman and NDD in her child ($p = 0.006$). The enrichment analysis of genes involved in CNVs revealed the following shared categories: "maternal imprinting" (MP:0003122), "abnormal cochlear OHC efferent innervation pattern" (MP:0004632), "abnormal GABA-mediated receptor currents" (MP:0004008), "increased skeletal muscle fiber size" (MP:0009399). At the same time, the SA group included one unique category associated with anomalies in head morphology. This category includes the *HSD17B2* and *KCNQ2* genes, mutations in which are associated not only with impaired brain development, but also with embryonic death in mice.

Key words: DNA copy number variation, neurodevelopmental disorder, miscarriage.

Актуальность. Ранее ряд независимых исследований был нацелен на определение связи между невынашиванием беременности (НБ) в анамнезе женщины и психическим здоровьем ее детей [1–3]. D. Paz-Levy et al. провели анализ, включающий 242 187 детей в возрасте до 18 лет с нарушениями психомоторного развития, интеллекта и эпилепсией. Частота рождения детей с данной патологией у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) составила 5 % [1], а отношение рисков рождения больного ребенка у таких матерей по сравнению с женщинами без спонтанных аборт в анамнезе (hazard ratio, HR) – 2,41 (доверительный интервал (confidence interval, CI) 95 % 1,60–3,64). По данным H. Ji et al. у женщин со спорадическими спонтанными абортами в анамнезе риск рождения ребенка с нарушением интеллекта повышен на 13 %, а при ПНБ – на 30 % [3]. В данную работу были включены 1 778 786 детей. Отношение рисков рождения детей с интеллектуальными нарушениями в семьях со спонтанными абортами в анамнезе по сравнению с семьями без них составило 1,17 (95 % CI 1,12–1,22), а риск ПНБ (HR 1,30; 95 % CI 1,20–1,40) был выше по сравнению со спорадическими спонтанными абортами (HR 1,13; 95 % CI 1,07–1,18). Риски были одинаковыми независимо от того, спонтанный аборт случился до или после рождения больного ребенка [3]. В исследовании Y. Wang et al. была показана повышенная частота развития у детей синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), матери которых имели замершую беременность в акушерском анамнезе (HR 1,11; 95 % CI 1,07–1,15). Дети матерей с ПНБ имели более высокую частоту СДВГ (HR 1,22; 95 % CI 1,12–1,33) в сравнении с детьми от матерей со спорадическими спонтанными абортами (HR 1,09; 95 %

СИ 1,05–1,13) [2]. Очевидно, важную роль в реализации данного феномена могут играть генетические или средовые факторы [3]. CNV могут являться этиологическим фактором как при нарушениях психомоторного развития [4], так и, вероятно, обуславливать внутриутробную гибель плода [5]. Учитывая приведенные литературные данные, можно предположить существование CNV, обладающих плейотропным эффектом и в результате приводящих к двум вышеописанным исходам.

Цель исследования – оценить частоты и охарактеризовать CNV в группах с наличием и отсутствием невынашивания беременности у матери, имеющей ребенка с нарушениями психомоторного развития.

Материал и методы

Сформирована выборка семей ($n=405$) с детьми до 18 лет с нарушениями психомоторного развития (интеллектуальные нарушения, задержка речи, расстройства аутистического спектра, нарушение обучаемости, моторного развития и СДВГ) и известным акушерским анамнезом матерей. Исходная выборка была разделена на подгруппы, одна из которых включала пациентов с наличием ($n=190$), а вторая с отсутствием ($n=215$) патогенной/потенциально патогенной CNV. В конечном итоге каждая из подгрупп была разделена в отношении наличия ($n=37$ и $n=21$ соответственно) и отсутствия ($n=153$ и $n=194$ соответственно) НБ в анамнезе матерей. ДНК пациентов и их родителей была выделена из лимфоцитов периферической крови путем фенол-хлороформной экстракции. Пробанды с нарушениями психомоторного развития исследованы с использованием матричной сравнительной гибридизации (aCGH) на микрочипах SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, $8 \times 60K$ (Agilent Technologies, США). Верификация CNV и определение их происхождения осуществлялись при помощи ПЦР в реальном времени (qPCR). Спектр перестроек был проанализирован относительно размера, генного состава, происхождения. Анализ обогащения выполнен при помощи ресурса Enrichr и онтологии «Фенотип млекопитающих» (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). Результаты анализа обогащения считались значимыми при $p \leq 0,05$. Для статистического анализа использовался критерий χ^2 Пирсона.

Результаты

В ходе данного исследования нами впервые показано, что патогенные/потенциально патогенные CNV статистически значимо чаще встречались в группе семей с НБ у женщины и нарушением психомоторного развития у ее ребенка ($p = 0,006$). Частота делеций в группах с НБ и без составила 16 и 66, а дупликаций 21 и 87 соответственно ($p = 0,991$). Происхождение установлено для 49 CNV из 190 (26 %). Группа с НБ включает восемь унаследованных от матери и две *de novo* CNV, а группа без НБ – 33 унаследованных (18 материнских и 15 отцовских) и шесть *de novo* aberrаций ($p = 0,899$). Количество полигенных и моногенных CNV в группе с НБ составило 29 и 8, соответственно, при этом в выборке без НБ обнаружено 127 полигенных и 26 моногенных CNV ($p = 0,510$). Таким образом, несмотря на статистически достоверное преобладание патогенных aberrаций в группе, включающей семьи с больным ребенком-носителем CNV и невынашиванием беременности в анамнезе у женщины, по выбранным параметрам (тип вариации, происхождение, количество вовлеченных генов) группы не отличались. Отсутствие различий может быть обусловлено небольшими объемами исследованных выборок. При анализе обогащения генов, вовлеченных в CNV в группе с НБ, обнаружено 26 значимых категорий, при этом в группе без НБ их количество составило 36. Для обеих групп были идентифицированы категории, ассоциированные с материнским импринтингом (с НБ – 1, без НБ – 1), поведением (с НБ – 12, без НБ – 1), морфологией уха (с НБ – 1, без НБ – 2), эмбриогенезом (с НБ – 3, без НБ – 4), репродуктивной (с НБ – 2, без НБ – 1), мышечной (с НБ – 1, без НБ – 7) и нервной (с НБ – 5, без НБ – 2) системами. Общие категории между вышеупомянутыми группами – «материнский импринтинг» (MP:0003122), «аномальный паттерн эфферентной иннервации улитки» (MP:0004632), «аномальные токи ГАМК-опосредованных рецепторов» (MP:0004008), «увеличение размера скелетных мышечных волокон» (MP:0009399). Группа без НБ дополнительно включала категории, ассоциированные с сердечно-сосудистой системой (2), физиологией и пролиферацией клеток (2), гомеостазом (4), памятью (1), метаболизмом (1), дыхательной системой (1), а также с аномалиями морфологии конечностей (1), скелета (3), кожи (1) и черепно-лицевыми аномалиями (2). В группе с НБ была выявлена единственная непересекающаяся категория, связанная с аномалиями морфологии головы, – «мегацефалия» (MP:0000434). Данная категория включает два гена – *HSD17B2* и *KCNQ2*. Ген *HSD17B2* (OMIM:109685) кодирует фермент, участвующий в метаболизме андрогенов и эстрогенов. Значимо, что по данным онтологии «Фенотип млекопитающих», мутации *HSD17B2* у мышей ассоциированы как с

нарушениями развития мозга (экзэнцефалия, гидроцефалия и др.), так и с аномалиями морфологии плаценты и эмбриональной летальностью. *KCNQ2* (OMIM:602235) принадлежит к семейству генов потенциал-зависимых калиевых каналов и экспрессируется в головном мозге. В то же время мутации данного гена у мышей связаны в том числе с пренатальной гибелью (неполная пенетрантность).

В литературе описан ряд возможных механизмов, которые могут лежать в основе исследуемой ассоциации НБ и нарушений психомоторного развития. Одним из таких механизмов могут являться сосудистые нарушения. Например, эндотелиальная дисфункция могут приводить к гипоперфузии плаценты и обуславливать гипоксию плода. Другим исходом этой дисфункции может быть оксидативный стресс и воспаление плаценты, что, в свою очередь, может привести к пренатальному поражению головного мозга [6, 7]. Другой механизм может реализовываться через аутоиммунные процессы. Ранее было показано, что у матерей детей с задержкой развития, аутоиммунные расстройства встречались на 49 % чаще, в сравнении с контрольной группой. Возможным объяснением является то, что при аутоиммунных обострениях мозг плода подвергается окислительному стрессу, а также прямому воздействию цитокинов на нервное развитие [8].

Заключение

Впервые показано, что патогенные/потенциально патогенные CNV статистически значимо чаще встречались в группе семей с НБ у женщины и нарушением психомоторного развития у ее ребенка. При сравнении данных, полученных в результате анализа обогащения, между группами с/без НБ была обнаружена одна категория, связанная с аномалиями морфологии головы и встречающаяся только в группе с НБ. В данную категорию вошли два гена, мутации в которых у мышей ассоциированы не только с нарушением развития мозга, но и с гибелью эмбриона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 21-65-00017 (<https://rscf.ru/project/21-65-00017/>).

ЛИТЕРАТУРА

1. Paz Levy D., Wainstock T., Sheiner E., Sergienko R., Landau D., Walfisch A. Maternal recurrent pregnancy loss is associated with an increased risk for long-term neurological morbidity in offspring // *Dev Med Child Neurol*. 2019. Vol. 61. P. 91–97.
2. Wang H., Li F., Miao M., Yu Y., Ji H., Liu H., Huang R., Obel C., Zhang J., Li J. Maternal spontaneous abortion and the risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: a population-based cohort study // *Hum Reprod*. 2020. Vol. 35. P. 1211–1221.
3. Ji H., Yu Y., Miao M., Qian X., Yuan W., Lin Y., Liang H., Li J. Risk of intellectual disability and maternal history of spontaneous abortion: a nationwide cohort study // *Dev Med Child Neurol*. 2021. Vol. 63. P. 831–838.
4. Palmer E., Speirs H., Taylor P., Mullan G., Turner G., Einfeld S., Tonge B., Mowat D. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability // *Am J Med Genet A*. 2014. Vol. 164A. P. 377–85.
5. Wang Y., Li Y., Chen Y., Zhou R., Sang Z., Meng L., Tan J., Qiao F., Bao Q., Luo D., Peng C., Wang Y.S., Luo C., Hu P., Xu Z. Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss // *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020. Vol. 55. P. 96–104.
6. Hagberg H., Mallard C., Ferriero D.M., Vannucci S.J., Levison S.W., Vexler Z.S., Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury // *Nat Rev Neurol*. 2015. Vol. 11. P. 192–208.
7. Hu Y., Chen G., Wan H., Zhang Z., Zhi H., Liu W., Qian X., Chen M., Wen L., Gao F., Li J., Zhao L. A rat pup model of cerebral palsy induced by prenatal inflammation and hypoxia // *Neural Regen Res*. 2013. Vol. 8. P. 817–24.
8. Lyall K., Ashwood P., Van de Water J., Hertz-Picciotto I. Maternal immune-mediated conditions, autism spectrum disorders, and developmental delay // *J Autism Dev Disord*. 2014. Vol. 44. P. 1546–55.

СТАТУС ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ В СЕМЬЯХ С ДЕТЬМИ С УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ И АУТОСОМНЫМИ CNV

**Е.А. Фонова¹, Е.Н. Толмачева¹, А.А. Кашеварова¹,
М.Е. Лопаткина¹, А.А. Сивакова², И.Н. Лебедев¹**

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

Была проведена оценка инактивации X-хромосомы в 14 семьях с умственной отсталостью у носительниц аутосомных CNV. В двух из 14 семей (14 %) выявлена асимметричная инактивация X-хромосомы (80:20). Вероятно, некоторые аутосомные CNV могут влиять на статус инактивации X-хромосомы из-за

увеличения и уменьшения дозы генов, ответственных за процессы пролиферации и дифференцировки клеток в раннем эмбриогенезе, а также приводить к формированию определенных патологических фенотипов (аутоиммунные или онкологические заболевания).

Ключевые слова: инактивация X-хромосомы, умственная отсталость, вариации числа копий ДНК.

X-CHROMOSOME INACTIVATION IN FAMILIES WITH CHILDREN WITH IDENTIFIED INTELLECTUAL DISABILITY AND AUTOSOMAL CNV

**E.A. Fonova¹, E.N. Tolmacheva¹, A.A. Kashevarova¹,
M.E. Lopatkina¹, A.A. Sivakova², I.N. Lebedev¹**

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Annotation

X-chromosome inactivation was evaluated in 14 families with intellectual disability in autosomal CNV carriers. Two of 14 families (14 %) showed skewed X-inactivation (80:20). Probably, some autosomal CNVs can affect the X-inactivation due to an increase and decrease in the dose of genes responsible for the processes of cell proliferation and differentiation in early embryogenesis, as well as the formation of some pathological phenotypes (autoimmune or oncological diseases)

Key words: X chromosome inactivation, mental retardation, copy number variation.

Актуальность. Инактивация X-хромосомы (XCI – X chromosome inactivation) – процесс, посредством которого одна из двух X-хромосом женского организма подвергается транскрипционному молчанию, происходит в раннем эмбриогенезе. Поскольку инактивация одной из двух X-хромосом происходит случайным образом, то теоретически 50 % клеток будут содержать активную наследуемую от матери X-хромосому, а в 50 % клеток активной останется отцовская X-хромосома. Асимметричная инактивация X-хромосомы, когда преимущественно инактивируется одна из родительских хромосом (от 80 % и более), в общей популяции встречается редко, однако если рассматривать отдельные нозологии (умственная отсталость, аутизм, синдром Барта), то отмечается повышение частоты случаев смещения инактивации X-хромосомы [1, 2]. Если женщина-носительница патогенной мутации с асимметричной XCI фенотипически здорова, то у её потомков, унаследовавших мутацию от матери, может развиваться патологический фенотип на стадии внутриутробного или постнатального развития, что приведёт к эмбриолетальности или к различным отклонениям в дальнейшем развитии [3]. Возможно, что вариации числа копий участков ДНК или несбалансированные микроструктурные перестройки хромосом (Copy Number Variation, CNV) в геноме могут быть одним из факторов, влияющим на характер инактивации X-хромосомы, особенно в тех случаях, когда в них задействованы гены, контролирующие процессы деления и клеточной пролиферации на ранних этапах преимплантационного развития организма. При этом и X-сцепленные, и аутомные CNV могут приводить к формированию диспропорции клеток с разными активными и неактивными X-хромосомами на ранних этапах эмбриогенеза и как следствие к асимметричной инактивации X-хромосомы.

Исследование инактивации X-хромосомы в семьях с материнским происхождением аутомных CNV и с проявленным патологическим фенотипом у детей и отсутствием патологии у их матерей позволит оценить и выявить кандидатные CNV, которые могут быть одним из факторов, влияющих на степень инактивации X-хромосомы.

Цель исследования – анализ статуса инактивации X-хромосомы в семьях с детьми с умственной отсталостью с материнским происхождением аутомных микроделеций и микродупликаций

Материал и методы

Выборка составила 14 семей – 28 человек (мать–ребенок), у которых были выявлены аутомные микроделеции и микродупликации с помощью сравнительной матричной геномной гибридизации с использованием чипа SurePrint G3 Human CGH Microarray 8×60K

(Agilent Technologies, США) и подтверждено их материнское происхождение с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Для анализа статуса X-хромосомы использован метод, основанный на амплификации высокополиморфного экзона 1 гена рецептора андрогена (*AR*, Xq12) [4] с использованием метил-чувствительной количественной ПЦР. Продукты ПЦР разделяли с помощью фрагментного анализа. Степень инактивации одной из родительских X-хромосом $\geq 80\%$ принималась как асимметричная инактивация X-хромосомы.

Результаты

Для каждой семьи с подтверждёнными аутосомными CNV материнского происхождения был проведён анализ статуса инактивации X-хромосомы. Выборка аутосомных CNV с материнским происхождением составила 14 семей, в 10 семьях пробандом являлся мальчик с УО, в 4 семьях пробандом являлась девочка с УО. Из 14 подтверждённых случаев мутаций в 12 семьях была выявлена равновероятная инактивация (табл. 1).

Таблица 1.

Аутосомные CNV с материнским происхождением в семьях с УО

семья	Аутосомная CNV	XCI у пробанда с УО	XCI у матери пробанда
1	3p21.31(47257416_47977017)×3	Гемизигота	89 %
2	3q29(197608333_197840339)×3	Гемизигота	64 %
3	16p11.2(29673954_30198600)×3 15q11.2(22784523_23179948)×1	Гемизигота	61 %
4	12p13.31(7696275_7894740)×3 10q23.33(96407740_96495769)×1	Гемизигота	72 %
5	10p11.21(34601238_34835648)×1	Гемизигота	63 %
6	7q31.1(111105151_111149166)×1	Гемизигота	59 %
7	3q13.31(115890242_116022056)×1	Гемизигота	55 %
8	16q23.1(75761600_77528224)×3	Гемизигота	57 %
9	7q21.3(96114102_96202040)×1	Гемизигота	59 %
10	11q24.3-q25(129995780_130730274)×3	Гемизигота	52 %
11	1q31.3 (196780309_196883398)×1	87 %	Гомозигота
12	1p36.32(2713204_3187840)×3 6p25.3(510657_1369836)×3	52 %	55 %
13	6q27(168371416_168581212)×3	65 %	67 %
14	16p12.2(21599687_21739885)×1	78 %	67 %

В семье № 1 была выявлена асимметричная XCI у матери пробанда-мальчика (89 %), и в семье № 11 была выявлена асимметричная инактивация (87 %) у пробанда-девочки (см. табл. 1). Асимметричная инактивация X-хромосомы у матери пробанда в случае дупликации 3p21.31 интересна генным составом данного варианта (*KIF9-ASI*, *KIF9*, *KLHL18*, *PTPN23*, *SCAP*, *ELP6*, *CSPG5*, *SMARCC1*, *DHX30*, *MIR1226*, *MAP4*). Анализ обогащения генов показал, что гены в данной CNV ассоциированы с онкологическим заболеванием (табл. 2) (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich>).

Таблица 2.

Анализ обогащения генов в регионе дупликации 3p21.31

Заболевание	P-значение	Гены
Супрессор опухолевого роста <i>SMARCB1</i> <i>WP4204</i>	0,017	<i>SMARCC1</i>
Фактор сплайсинга NOVA, регулирующий синаптические белки <i>WP4148</i>	0,023	<i>MAP4</i>
Передача сигналов белков, связывающих регуляторный элемент стирола <i>WP1982</i>	0,037	<i>SCAP</i>
Термогенез <i>WP4321</i>	0,058	<i>SMARCC1</i>

В области дупликации 3p21.31 локализован ген *SMARCC1*, являющийся супрессором опухолевого роста *SMARCB1*. Помимо этого, данный ген участвует в активации транскрипции и репрессии отдельных генов путем ремоделирования хроматина. Компонент комплексов ремоделирования хроматина SWI/SNF, которые осуществляют ключевую ферментативную активность, влияет на структуру хроматина путем изменения контактов ДНК-гистонов внутри нуклеосомы АТФ-зависимым образом. Вполне вероятно, что избыток белкового

продукта гена, вызванный дупликацией, может оказать влияние на смещение инактивации как за счет ремоделирования хроматина, так и за счёт формирования диспропорций клеток с активной и неактивной X-хромосомой. Нередко в опухолевых клетках снижается уровень метилирования геномной ДНК, за счёт которого поддерживается стабильная инактивация X-хромосомы. Таким образом, спонтанная реактивация генов X-хромосомы может быть не только первопричиной малигнизации клеток, но и её следствием.

В случае делеции 1q31.5 и асимметричной инактивации X-хромосомы у девочки с умственной отсталостью в область делеции вошли гены *CFHR1* и *CFHR4*, связанные с гемолитико-уремическим синдромом, при котором отмечено проявление аутоиммунного процесса, когда вырабатываются антитела против H-связанных белков (табл. 3) (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/enrich>). К сожалению, мать девочки оказалась гомозиготной по локусу гена *HUMARA*, и неинформативной для определения статуса инактивации X-хромосомы.

Таблица 3.

Анализ обогащения генов в регионе делеции 1q31.3

Заболевание	P-значение	Гены
Атипичный гемолитико-уремический синдром	1.800e-7	<i>CFHR1;CFHR4</i>
Гемолитико-уремический синдром	1.800e-7	<i>CFHR1;CFHR4</i>
Возрастная дегенерация желтого пятна (макулы)	0,0013	<i>CFHR1</i>

Одним из механизмов связи инактивации X-хромосомы и аутоиммунных заболеваний предполагают реактивацию неактивной X-хромосомы. В результате реактивации неактивной X-хромосомы в клетках происходит общее увеличение уровня белка и РНК, что может служить причиной ошибок в механизмах распознавания собственных продуктов клетки и запуска аутоиммунных реакций.

Заключение

Выявленные случаи асимметричной инактивации X-хромосомы (ХСИ от 80 %) были связаны с наличием CNV, которые могут привести к формированию патологического фенотипа определённого характера (аутоиммунное или онкологическое заболевание), однако не было выявлено связи с формированием умственной отсталости в данных семьях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-315-90111.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leonard H., Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium // *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2002. Vol. 8, № 3. P. 117–134.
2. Fieremans N. et al. Identification of intellectual disability genes in female patients with a skewed X-inactivation pattern // *Human mutation*. 2016. Vol. 37. № 8. P. 804-811.
3. Толмачёва Е.Н. и др. Эпигенетическая модификация X-сцепленных CNV в норме и патологии // *Медицинская генетика*. 2018. Т. 17, №. 11. С. 29–33.
4. Allen R.C. et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation // *American journal of human genetics*. 1992. Vol. 51, № 6. P. 1229.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЛОКАТОРА STEP (ТС-2051) НА ПРОЯВЛЕНИЯ ШИЗОФРЕНОПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ У МЫШЕЙ ЛИНИИ DISC1-L100P

Н.Д. Чижова^{1,2}

НИИНМ, г. Новосибирск, Россия¹
²ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

Шизофрения является серьезным инвалидирующим психическим расстройством, чья гетерогенность и часто встречающаяся устойчивость к применяемым препаратам приводит к недостаточно эффективной либо сопровождающейся побочными эффектами терапии. Это формирует в научном и медицинском сообществе запрос на создание новых антипсихотических препаратов, которые действовали бы более селективно на значимые для развития данной патологии области мозга, повышая эффективность лечения и уменьшая негативные реакции. Патогенез шизофрении, главным образом, связан с нарушениями в дофаминергической системе мозга, в связи с чем фермент STEP, который является

важным медиатором в опосредованной D2-рецепторами активации передачи сигналов по ERK-пути и в регуляции развития дофаминергических нейронов, представляется перспективной мишенью для направленного воздействия. Ранее нами выявлен антипсихотический потенциал нового соединения из ряда бензопентатиепинов – блокаторов STEP (шифр ТС-2053), синтезированных в НИОХ СО РАН. **Целью настоящего исследования** являлась оценка антипсихотических эффектов его химического аналога под шифром ТС-2051 в ряде поведенческих тестов на проявления шизофреноподобного поведения у мышей линии Disc1-L100P, являющейся моделью шизофрении. Использовали дозу 10 мг/кг (однократное в/б введение за 30 мин до тестирования), которая показала наиболее выраженный эффект для соединения ТС-2053. Препарат ТС-2051 повышал у мышей Disc1-L100P сниженную реакцию вздрагивания (PPI) до контрольных значений и снижал их гиперактивность в открытом поле. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования соединений ряда бензопентатиепинов, блокирующих STEP, в качестве новых антипсихотиков.

Ключевые слова: шизофрения, антипсихотики, STEP, *Ptpn5*, бензопентатиепины, поведение, открытое поле, PPI, LI, мыши линии Disc1-L100P.

EFFECT OF A NOVEL STEP BLOCKER (TC-2051) ON SCHIZOPHRENIA-LIKE BEHAVIOR IN DISC1-L100P MICE

N.D. Chizhova^{1,2}

SRINM, Novosibirsk, Russia¹

Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia²

Annotation

Schizophrenia is a severe, disabling psychiatric disorder whose heterogeneity and frequent resistance to the drugs used lead to ineffective or side-effect therapy. This creates a demand in the scientific and medical community for the creation of new antipsychotic drugs that would act more selectively on areas of the brain that are significant for the development of this pathology, increasing the effectiveness of treatment and reducing negative reactions. The pathogenesis of schizophrenia is mainly associated with disturbances in the dopaminergic system of the brain, in connection with which the STEP enzyme seems to be a promising target for targeted action, which is an important mediator in D2R-mediated ERK signaling, especially in dopaminergic neuronal development. Previously, we have identified the antipsychotic potential of a new compound from a number of benzopentathiepienes – STEP blockers (code TS-2053), synthesized at the Research Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences. **The aim of this study** was to evaluate the antipsychotic effects of its chemical analogue under the code TC-2051 in a number of behavioral tests for manifestations of schizophrenia-like behavior in mice of the Disc1-L100P line, which is a model of schizophrenia. A dose of 10 mg/kg was used (single i.p. administration 30 minutes before testing), which showed the most pronounced effect for the TC-2053 compound. TC-2051 increased the reduced startle response (PPI) in Disc1-L100P mice to control levels and reduced their hyperactivity in the open field. The data obtained indicate the promise of using STEP-blocking compounds of a number of benzopentathiepienes as new antipsychotics.

Key words: schizophrenia, antipsychotics, STEP, *Ptpn5*, benzopentathiepienes, behavior, open field, PPI, LI, Disc1-L100P mice.

Актуальность. Шизофрения является серьезным инвалидизирующим психическим расстройством, которым, по данным ВОЗ, во всем мире страдают более 20 млн человек [1]. Используемые в настоящее время антипсихотики достаточно эффективно ослабляют позитивные симптомы шизофрении, значительно улучшая жизнь многих пациентов и позволяя добиться ремиссии, однако они не излечивают шизофрению (а следовательно, принимаются пациентами длительное время) и имеют много побочных эффектов. Гетерогенность заболевания и устойчивость многих пациентов к применяемой терапии часто приводят к тому, что препараты для лечения конкретного случая подбираются длительное время и иногда лучшим выбором может быть комбинация препаратов – при этом возрастает и количество нежелательных реакций. Таким образом, частота неэффективного либо сопровождающегося тяжелыми побочными эффектами лечения представляет вызов для поиска новых лекарственных препаратов в лечении шизофрении [2, 3]. Основное действие АП связано со снижением дофамина, однако тенденцией современной фармакологии является точечное воздействие на ключевые звенья патологического процесса. Интерес представляет фермент STEP (striatal-

enriched protein tyrosine phosphatase; стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза), кодируемый геном *Ptpn5* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 5; нерецепторная протеинтирозинфосфатаза 5 мина*). STEP имеет две изоформы – цитозольную STEP46 и мембранную STEP61, которые в высокой степени экспрессируются в стриатуме, тогда как в гиппокампе и коре присутствует только STEP61. Эта фосфатаза, экспрессируясь в дофаминергических нейронах, участвует в передаче сигналов по ERK-пути, опосредованной рецепторами дофамина 2-го типа (D2R), в регуляции развития дофаминергических нейронов и, по-видимому, играет роль в развитии когнитивных нарушений [4, 5]. Актуальным представляется исследование блокаторов STEP на моделях шизофрении в качестве предполагаемого АП. Нами проводится скрининг новых соединений (ряда бензопентатиепинов, синтезированных в НИОХ), способных блокировать STEP, на мышцах линии Disc1-L100P (генетической модели шизофрении).

Цель исследования – изучение влияния блокатора STEP TC-2051 на проявления шизофреноподобного поведения у мышей Disc1-L100P в тестах «открытое поле» (ОП), «престимульное торможение реакции вздрагивания» (PPI) и «латентное торможение» (LI).

Материалы и методы

Работа выполнена на 4-месячных мутантных самцах мышей линии Disc1-L100P и самцах дикого типа (инбредная линия C57BL/6NCrl; WT), на основе которой они были выведены. Использовали мышей из УНУ «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний» (№ 493387) НИИ нейронаук и медицины [6]. Мыши линии Disc1-L100P, созданные при сотрудничестве лаборатории профессора Дж. Родера с исследователями биоресурсного центра RIKEN, несут точечную мутацию (замена одного нуклеотида) во 2-м экзоне гена *Disc1*, приводящую к замене лейцина на пролин в 100-м положении аминокислотной последовательности белка DISC1. Мыши Disc1-L100P являются моделью шизофрении и соответствуют критериям для моделей психического расстройства [7]. Тестирование проводили между 9:00 и 16:00 ч в соответствии с протоколами тестов PPI (с использованием звуковых сигналов громкостью: престоимы – 72, 78, 82, 86 дБ; стимулы, вызывающие реакцию вздрагивания, – 110 дБ; фоновый шум – 65 дБ) [8], LI (звуковой сигнал громкостью 80 дБ, сила тока 0,4 мА) [9], наиболее часто применяемых для определения шизофреноподобного фенотипа. Влияние препарата на двигательную активность оценивали в тесте «открытое поле» [10]. Условия работы с животными соответствовали международным нормам (Council of the European Communities Directive 86/609/EES). Препарат TC-2051, синтезированный в НИОХ СО РАН, однократно вводили мышам внутривентриально в дозе 10 мг/кг (ранее показавшей более выраженный эффект для соединения TC-2053) за 30 мин до начала тестирования. В группах было по 7–10 самцов. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10 for Windows 8. Нормальность распределения данных определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Полученные данные были проанализированы при помощи двух- и трехфакторного анализа переменных (ANOVA) с повторными измерениями (RMANOVA) для PPI и LI и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом LSD критерием Фишера.

Результаты

В открытом поле MANOVA выявил влияние генотипа [$F(1,21)=7,1; p<0,001$] и препарата [$F(1,21)=8,1; p<0,001$] на основной показатель двигательной активности (пройденный путь). Введение TC-2051 снижало двигательную активность у мышей обоих генотипов в сравнении с контролем ($p<0,01$), что приближало значение у Disc1-L100P к значению у дикого типа без препарата ($p>0,05$).

RMANOVA выявил влияние генотипа [$F(1,28)=4,693; p<0,05$] и престоимов [$F(3,84)=51,842; p<0,05$] на PPI, тогда как влияние TC-2051 проявилось на уровне тенденции [$F(1,28)=3,845; p=0,0599$]. Мыши Disc1-L100P показали сниженное относительно WT престоимое торможение реакции вздрагивания ($p<0,05$; рис. 1), а введение TC-2051 незначительно повышало у них этот показатель при громкости престоимов 82 и 86 дБ ($p=0,076$). Примечательно, что на фоне введения препарата PPI у мышей Disc1-L100P при 86 дБ становилось неотличимым от значений у дикого типа ($p>0,05$).

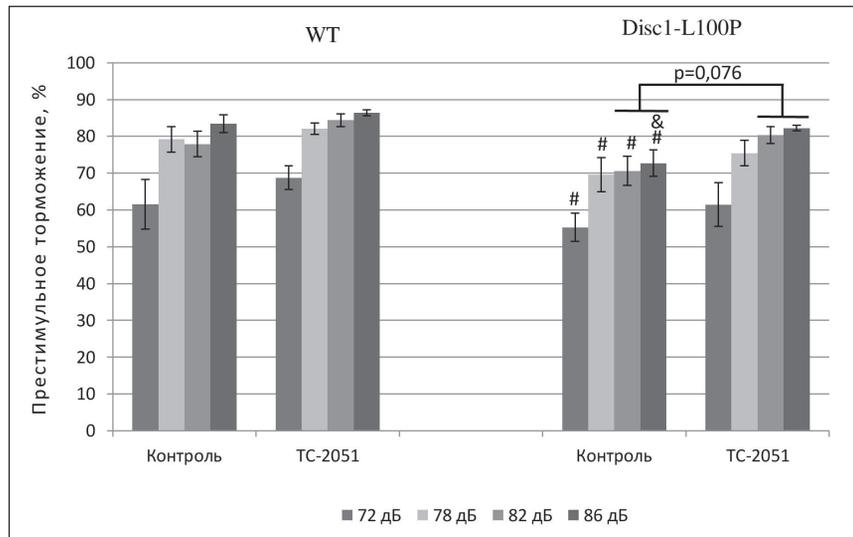


Рис. 1. Престимуляторное торможение реакции вздрагивания у мышей Disc1-L100P по сравнению с группой дикого типа при введении TC-2051 и растворителя (контроль). # – $p < 0,05$ – по сравнению с WT-TC2051; & – $p < 0,05$ по сравнению с WT-контролем

В тесте «латентное торможение» ANOVA показал влияние условий (с и без преэкспозиции) [$F(1,63)=14,433$; $p < 0,001$] на среднее время замирания мышей в ответ на звуковой стимул в течение 5 мин. Выявлены различия между группами мышей Disc1-L100P с и без преэкспозиции на фоне введения TC-2051 ($p < 0,05$), что характерно для здоровых мышей. При анализе этого же показателя для каждых 30 с в указанный период времени RMANOVA подтвердил этот эффект [$F(1,63)=14,433$; $p < 0,001$], а также обнаружил влияние времени [$F(9,567)=6,3$; $p < 0,001$] на латентное торможение, однако влияния вещества не было найдено [$F(1,63)=0,0015$; $p=0,97$].

Заключение

Тестирование блокатора STEP TC-2051 показало, что его острое введение в дозе 10 мг/кг повышало у мышей Disc1-L100P сниженную реакцию вздрагивания (PPI) до контрольных значений и снижало их гиперактивность в открытом поле. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования соединений ряда бензопентатиепинов, блокирующих STEP, в качестве новых антипсихотиков.

Выполненная работа входила в интеграционный проект «Комплексный подход для создания антипсихотиков нового поколения» в рамках НИР «Оценка антипсихотических эффектов блокаторов STEP на экспериментальной модели шизофрении».

ЛИТЕРАТУРА

1. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *The Lancet*. 2018. Vol. 392. P. 1789–1858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
2. McCutcheon R.A., Pillinger T., Mizuno Y., Montgomery A., Pandian H., Vano L., Marques T.R., Howe O.D. The efficacy and heterogeneity of antipsychotic response in schizophrenia: A meta-analysis // *Mol. Psychiatry*. 2019. Vol. 26(4). P. 1310–1320. doi: 10.1038/s41380-019-0502-5
3. Potkin S.G., Kane J.M., Correll C.U., Lindenmayer J.P., Agid O., Marder S.R., Olfson M., Howes O.D. The neurobiology of treatment-resistant schizophrenia: Paths to antipsychotic resistance and a roadmap for future research // *NPJ Schizophr*. 2020. Vol. 6(1). doi: 10.1038/s41537-019-0090-z
4. Kim S.Y., Lee H.J., Kim Y.N., Yoon S., Lee J.E., Sun W., Choi E.J., Baik J.H. Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase regulates dopaminergic neuronal development via extracellular signal-regulated kinase signaling // *Exp Neurol*. 2008. Vol. 214(1). P. 69–77. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.07.014
5. Fitzpatrick C.J., Lombroso P.J. The Role of Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase (STEP) in Cognition // *Frontiers in neuroanatomy*. 2011. Vol. 5. A. 47. doi: 10.3389/fnana.2011.00047
6. Петрова Е.С., Громова А.В., Анисименко М.С., Рубан Л.А., Егорова С.А., Петровская И.Ф., Амтиславская Т.Г., Липина Т.В. Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018. Т. 2. doi:10.29296/2618723X-2018-02-01
7. Lipina T.V., Roder J.C. Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1) interactome and mental disorders: impact of mouse models // *Neurosci Biobehav Rev*. 2014. Vol. 45. P. 271–94. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.001
8. Braff D.L., Geyer M.A., Swerdlow N.R. Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies // *Arch Gen Psychiatry*. 2001. Vol. 47. P. 181–188. doi: 10.1001/archpsyc.1990.01810140081011
9. Weiner I. The “two-headed” latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment // *Psychopharmacology*. 2003. Vol. 169(3-4). P. 257–297. doi:10.1007/s00213-002-1313-x
10. Seibenhener M.L., Wooten M.C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice // *JoVE*. 2015. Vol. 96. e52434. doi:10.3791/52434

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ УРОВНЯ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ И ВИТАМИНА Д В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИРЕЗОРБТИВНОЙ ТЕРАПИИ

Б.И. Ялаев

ФГБНУ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Аннотация

За последние 2 десятилетия проведено более 20 научных работ, посвященных исследованию наследственно обусловленной индивидуальной чувствительности пациентов с остеопорозом (ОП) к лекарственным препаратам на основе бисфосфонатов (БФ) и гормональных препаратов (такие, как эстроген паратиреоидный гормон и др.) с антирезорбтивной активностью. Однако ряд обнаруженных ассоциаций полиморфных вариантов в генах чувствительности к препаратам на основе аминобисфосфонатов, витамина Д и кальция не воспроизведены в репликативных исследованиях [1–2]. Это актуализирует продолжение фармакогенетических исследований, в частности, в целях разработки систем ДНК-тестирования для разработки персонализированной терапии остеопороза. Нами проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов rs2297480 гена фарнезил-дифосфат синтетазы (*FDPS*), rs2282679 гена витамин-Д-связывающего белка (*DBP*), rs1544410 гена рецептора витамина Д (*VDR*) и rs1801197 гена рецептора кальцитонина (*CALCR*) с динамикой уровня минеральной плотности костной ткани и сывороточной концентрации витамина Д на фоне антирезорбтивной терапии в выборке женщин постменопаузального возраста, находящихся на лечении аминобисфосфонатами и витамином Д. Выявлена тенденция к ассоциации локуса rs2297480 гена *FDPS* с динамикой уровня витамина Д.

Ключевые слова: фармакогенетика, фарнезил-дифосфат синтетаза, витамин Д, полиморфный вариант.

ANALYSIS OF THE DYNAMICS OF THE LEVEL OF BONE MINERAL DENSITY AND VITAMIN D DEPENDING ON POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES OF SENSITIVITY TO ANTIRESORPTIVE THERAPY

B.I. Yalaev

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences

Annotation

Over the past 2 decades, more than 20 scientific papers have been conducted on the study of hereditary individual sensitivity of patients with osteoporosis (OP) to drugs based on bisphosphonates (BF) and hormonal drugs (such as estrogen, parathyroid hormone, etc.) with antiresorptive activity. However, a number of detected associations of polymorphic variants in the genes of sensitivity to drugs based on aminobisphosphonates, vitamin D and calcium have not been reproduced in replicative studies [1-2]. This actualizes the continuation of pharmacogenetic research, in particular in order to develop DNA testing systems for the development of personalized therapy for osteoporosis. We searched for associations of polymorphic variants rs2297480 of the farnesyl diphosphate synthetase (*FDPS*) gene, rs2282679 of the vitamin D-binding protein (*DBP*) gene, rs1544410 of the vitamin D receptor gene (*VDR*) and rs1801197 of the calcitonin receptor gene (*CALCR*) with the dynamics of the level of bone mineral density and serum vitamin D concentration against the background of antiresorptive therapy in a sample of postmenopausal women undergoing treatment with aminobisphosphonates and vitamin D. A tendency to associate the rs2297480 locus of the *FDPS* gene with the dynamics of vitamin D levels was revealed.

Key words: pharmacogenetics, farnesyl diphosphate synthetase, vitamin D, polymorphic variant.

Актуальность. Остеопороз – многофакторное возраст-ассоциированное заболевание, при котором снижается уровень минеральной плотности костной ткани и резко возрастает риск переломов. Заболевание является социально значимой проблемой, лежащей огромным бременем на систему здравоохранения в развитых и развивающихся странах в связи с высокими расходами на лечение низкотравматичных переломов [2]. Кроме того, существует проблема поздней диагностики остеопороза, обусловленная отсутствием выраженных клинических признаков, что зачастую связано с несвоевременной диагностикой, ведущей к большой частоте переломов среди пожилых людей, что сопряжено со значительным сокращением продолжительности жизни. Молекулярной мишенью аминокислотных бисфосфонатов, являющихся золотым стандартом лечения остеопороза является фермент фарнезил-дифосфат синтетаза (FDPS) – один из ключевых ферментов мевалонатного пути, необходимый для регуляции сигнальных белков остеокластов, например, малых ГТФаз [3]. Угнетая активность фарнезил-дифосфат синтетазы, аминокислотные бисфосфонаты ингибируют каскад биосинтеза липидов изопреноидного ряда и холестерина.

Помимо этого, изменение активности данного фермента приводит к нарушению посттрансляционных модификаций, в частности, изопренилирования ряда Rho, Rac и Rab белков, которые, в свою очередь, связываются с гуанидинтрифосфатом, активно вовлеченным в функционирование остеокластов. Это приводит к угнетению синтеза волоконистых структур актомиозина, играющего центральную роль в перемещении остеокластов и образовании их гофрированного края, необходимого для прикрепления к резорбируемой поверхности кости, а также к стимуляции апоптоза остеокластов [3]. Бисфосфонаты рекомендованы Управлением по санитарному контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) в качестве препаратов первой линии терапии пациентов с остеопорозом, так как они угнетают костную резорбцию и снижают риск переломов костей бедра, предплечья и позвоночника примерно у 40–70 % женщин, что может быть связано с индивидуальным генетическим профилем, определяющим реакцию организма на пероральный прием или внутривенную инъекцию бисфосфонатов при лечении остеопороза [2].

Согласно данным литературы, терапия на основе БФ не приводит к эффективному приросту уровня МПКТ у 5–28 % [3]. Однонуклеотидные полиморфные варианты, которые ассоциированы с положительным или отрицательным приростом уровня минеральной плотности костной ткани (МПКТ) в ответ на прием данных препаратов, идентифицированы в генах *FDPS*, кодирующем фермент фарнезил-дифосфат синтетазу, *VDR*, кодирующем рецептор витамина Д, *COL1A1* кодирующем α -1-цепь коллагена 1-го типа, и *LRP5*, кодирующем белок 5, родственной рецептору липопротеинов низкой плотности [2, 4]. Однако данные ассоциации не воспроизведены в репликативных исследованиях, в частности, полиморфный вариант rs2297480 гена *FDPS* не был связан с индивидуальной чувствительностью на прием аминокислотных бисфосфонатов в исследовании F. Marini et al. (2008) [5], а в исследовании Vol. Conti (2015) ответ на антирезорбтивную терапию на основе бисфосфонатов не был статистически значимо ассоциирован с полиморфным вариантом rs1544410 гена *VDR* [6], однако в работе S. Palomba et al. (2003) у лиц с носительством аллеля b наблюдается значимый прирост уровня МПКТ позвоночника [7]. В работе А.Ю. Полуэктовой и др. (2018) показано, что наличие гаплотипа TGA в полиморфизме rs2282679 гена *DBP*, влияющего на эффективность транспортировки 25-гидроксилированной формы витамина Д, соответствовало снижению показателей сродства к данному метаболиту [8]. В работе Н.А. Резниченко (2020) изучена возможная роль полиморфизма rs1801197 гена *CALCR* в ответе костной системы женщин с ОП на прием ибандроната и показано лишь наличие тенденции к статистически значимой ассоциации ($p = 0,082$) к более низким показателям уровня МПКТ в проксимальном отделе левой бедренной кости у исследуемых с генотипом CC [9]. Необходимо продолжение исследований в данном направлении, а также репликация результатов на выборках популяций Российской Федерации для поиска маркеров индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам класса аминокислотных бисфосфонатов с учетом специфики генофонда нашего региона.

Цель исследования – анализ ассоциаций полиморфных вариантов rs2297480 гена фарнезил-дифосфат синтетазы (*FDPS*), rs2282679 гена витамин-Д-связывающего белка (*DBP*), rs1544410 гена рецептора витамина Д (*VDR*) и rs1801197 гена рецептора кальцитонина (*CALCR*) с динамикой уровня минеральной плотности костной ткани и витамина Д на фоне антирезорбтивной терапии.

Материал и методы

За период 2019–2021 гг. была сформирована независимая выборка женщин русской этнической принадлежности постменопаузального возраста с остеопорозом, находящихся

на лечении и наблюдении в Городском центре остеопороза, г. Уфа (N=295). Данная группа пациентов ежегодно проходит комплексное обследование, включающее в себя осмотр врача-травматолога, исследование МПКТ методом рентгеновской денситометрии и определение уровня витамина Д в сыворотке крови. При наличии показаний назначается антирезорбтивная терапия препаратами группы бисфосфонатов – алендроновая кислота в дозировке 70 мг 1 раз в неделю длительно и препаратом витамина Д – колекальциферол в дозировке 4000 Ед в сутки в течение 1 мес 2 раза в год. Кроме этого, мы учитывали клинический фактор – индекс массы тела при оценке динамики уровня МПКТ и витамина Д на фоне антирезорбтивной терапии. Был проведен сравнительный анализ частот генотипов полиморфных вариантов, расположенных в генах чувствительности к бисфосфонатам и витамину Д для оценки их роли в изменении уровня МПКТ при терапии данными препаратами в течение года наблюдения. Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции [10]. Реакцию амплификации проводили с использованием конкурентной аллель-специфической ПЦР в реальном времени технологией KASP-генотипирования.

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов с динамикой уровня МПКТ на фоне терапии аминокислотами проводился с использованием метода DID-регрессии (метод разности разностей difference-in-differences). Эффект воздействия определяется как разность между изменением результирующей переменной в группе воздействия (группа с рисковым генотипом) и группой контроля (группа с генотипом, ассоциированным с положительным ответом на лечение). Для анализа статистически значимых различий (в уровне МПКТ до (1 измерение) и после лечения (1 измерение)) применялся тест Вилкоксона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Показатели уровня минеральной плотности костной ткани до и после лечения подчиняются закону нормального распределения по тесту Шапира–Уилка: до лечения $W=0,98397$, $p=0,3996$) и после лечения $W=0,98474$, $p=0,4416$). Обнаружены статистически значимый прирост уровня МПКТ по тесту Вилкоксона: бисфосфонаты в целом приводят к значимому увеличению уровня МПКТ через год после приема ($W=3403$, W -критерий Вилкоксона, $p=3,729e^{-15}$). Распределение частот генотипов по всем полиморфным локусам поддерживает равновесие Харди–Вайнберга. По результатам моделирования на основе did-регрессии статистически значимого влияния индекса массы тела и полиморфных вариантов на прирост уровня МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника выявлено не было (таблица).

Таблица результатов did-регрессии по анализу выборки по приросту уровня минеральной плотности шейки бедра

Параметры	Коэффициент	Стандартная ошибка	t	p
Модель в целом	-4,7303	11,4081	-0,415	0,682
ИМТ	0,2189	0,3615	0,606	0,55
<i>FDPS</i> , rs2297480	-2,5643	2,6321	-0,974	0,339
<i>VDR</i> , rs1544410	2,1681	2,1594	1,004	0,325
<i>CALCR</i> , rs18011972	-1,3188	3,3357	-0,395	0,696
<i>DBP</i> , rs22826792	2,2324	3,6928	0,605	0,551

Примечание: коэффициент – коэффициент did-регрессии, стандартная ошибка – стандартное отклонение выборочного среднего, t – критерий для проверки значимости коэффициента регрессии.

Среди гетерозиготных носителей rs2297480 гена *FDPS* наблюдается значительное повышение уровня МПКТ, что, вероятно, обусловлено большим числом гетерозиготных носителей в выборке. На рис. 1 отображены графики средних значений динамики уровня МПКТ шейки бедра в зависимости от генотипов данного полиморфного варианта. При исследовании изменения показателей сывороточных концентраций витамина Д у пациентов с различными генотипами исследованных генов с применением критерия Манна–Уитни также не было выявлено статистически значимых различий, однако отмечается динамика увеличения концентрации витамина Д у лиц с носительством аллеля А полиморфного варианта rs2297480 гена *FDPS*, различия носят характер тенденции ($U=5$, $p=0,052$), но линейное изменение концентраций уровня витамина Д может свидетельствовать об участии данного локуса в регуляции изменения сывороточных концентраций при терапии препаратами витамина Д (рис. 2). Анализ динамики изменения концентраций уровня витамина Д в зависимости от генотипов других локусов не выявил линейных закономерностей.

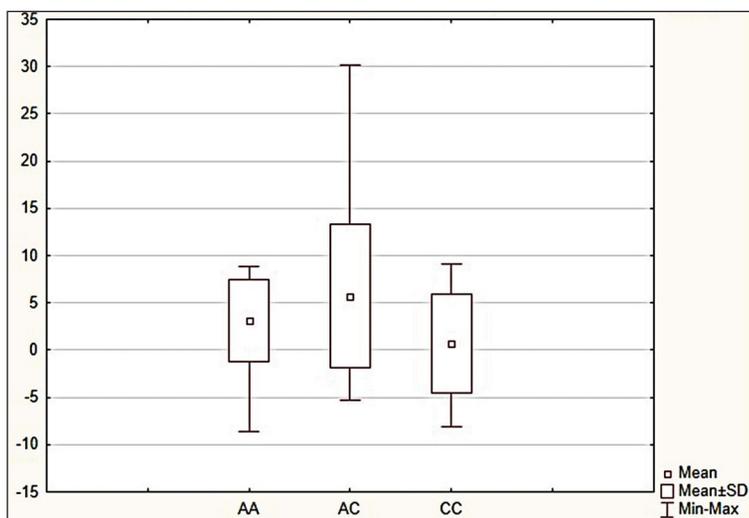


Рис. 1. Динамика уровня МПКТ поясничного отдела позвоночника в зависимости от генотипа полиморфного варианта rs2297480. По оси y – уровень МПКТ позвоночника в гр/см²

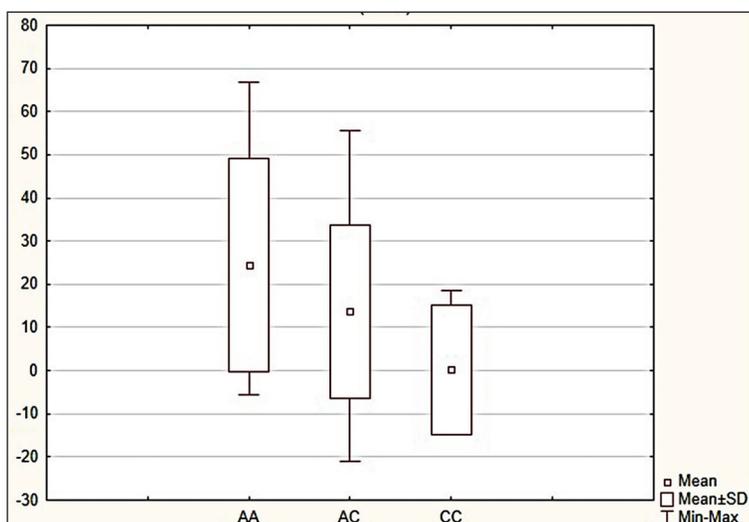


Рис. 2. Динамика уровня витамина Д в сыворотке в крови в зависимости от генотипа полиморфного варианта rs2297480. По оси y – концентрация витамина Д в нг/мл

Заключение. В настоящее время не опубликовано исследований, в которых была бы описана обнаруженная закономерность линейного повышения концентраций витамина Д у лиц с носительством аллеля *А полиморфного варианта rs2297480, однако, вероятно это объясняется комбинированным эффектом одновременного приема аминобисфосфонатов и витамина Д, что повышает уровень витамина Д в зависимости от благоприятного генотипа rs2297480 гена *FDPS*.

Таким образом, выявлена тенденция к ассоциации локуса rs2297480 гена *FDPS* с динамикой сывороточной концентрации витамина Д. Необходимо продолжить фармакогенетические исследования при остеопорозе с увеличением размера выборок и длительности наблюдения для установления закономерностей индивидуальной чувствительности к антирезорбтивной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-315-90083) и мегагранта Правительства Российской Федерации (№ 075-15-2021-595), а также в рамках государственного задания Минобрнауки России (№ АААА-А16-116020350032-1). В работе использованы образцы ДНК из ЦКП «Коллекция биологических материалов человека» ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Marini F, Brandi M.L.* Pharmacogenetics of osteoporosis // *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014. Vol. 28, № 6. P. 783–793.
2. *Yalaev B. I., Tyurin A.V., Nurlygayanov R.Z. et al.* Pharmacogenetics of bisphosphonates in osteoporosis // *Molekulyarnaya Meditsina*. 2020. Vol. 19, № 3. P. 3–10.
3. *Монахова А.И., Егорова Е.В., Лялина В.В. и др.* Фармакогенетика бисфосфонатов в лечении постменопаузального остеопороза. Обзор литературы // *Лечебное дело*. 2013. Т. 3. С. 53–58.
4. *Marozik P., Alekna V., Rudenko E. et al.* Bone metabolism genes variation and response to bisphosphonate treatment in women with postmenopausal osteoporosis // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, № 8. P. e0221511.
5. *Marini F.* Modulatory effect of farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS) rs2297480 polymorphism on the response to long term amino-bisphosphonate treatment in postmenopausal osteoporosis // *Current Medical Research and Opinion*. 2008. Vol. 24, № 9. P. 2609–2615.
6. *Conti Vol.* Polymorphism at the translation start site of the vitamin D receptor gene is associated with the response to anti-osteoporotic therapy in postmenopausal women from Southern Italy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, № 3. P. 5452–5466.
7. *Palomba S., Numis F.G., Mossetti G. et al.* Raloxifene administration in post-menopausal women with osteoporosis: Effect of different BsmI vitamin D receptor genotypes // *Human Reproduction*. 2003. Vol. 18, № 1. P. 192–198.
8. *Полужатова А.Ю., Мартынова Е.Ю., Фатхутдинов И.П. и др.* Генетические особенности чувствительности к витамину D и распространенность дефицита витамина D среди пациентов поликлиники // *РМЖ. Мать и дитя*. 2018. № 1. С. 11–17.
9. *Резниченко Н.А., Симрок В.В., Адунц А.Г.* Влияние отдельных генетических полиморфизмов на эффективность лечения постменопаузального остеопороза // *Медицинский вестник Юга России*. 2020. Т. 11, № 14. С. 58–66.
10. *Mathew C.G.P.* The Isolation of High Molecular Weight Eukaryotic DNA // *Nucleic Acids*. 1984. Vol. 2. P. 31–34.

КАРДИОЛОГИЯ

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ЦЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ В ВЫСОКОМ РАЗРЕШЕНИИ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Л.А. Богданов, Р.А. Мухамадияров, А.Г. Кутихин

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
г. Кемерово, Россия

Аннотация

Цель исследования – оценить эффективность использования оригинального метода обработки и окрашивания тканей для сохранения их целостности и визуализации с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. **Материал и методы.** После фиксации в 10% формалине (24 ч) атеросклеротические бляшки человека, кальцифицированные аортальные клапаны сердца человека, стент в составе сонной артерии человека, стент, удаленный из выводного отдела правого желудочка человека, металлический имплантат в составе костной ткани крысы и сонную артерию овцы постфиксировали 1% тетраоксидом осмия (12 ч) и затем окрашивали 2% водным раствором тетраоксида осмия (48 ч). Далее образцы окрашивали спиртовым раствором 2% уранилацетата (5 ч), обезвоживали этанолом (5 ч) и ацетоном (1 ч), пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой (1:1, 6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (24 ч) и далее проводили полимеризацию при 60 °С. После шлифовки и полировки выполняли контрастирование цитратом свинца (7 мин), напыляли эпоксидные блоки углеродом и визуализировали образцы при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. Элементный анализ выполняли при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. **Результаты.** Разработанный метод позволяет достичь высокого качества получаемых изображений на увеличениях до семи с половиной тысяч раз, предоставляет возможность визуализировать металлические конструкции и кальцификаты в составе тканей, а также идентифицировать отдельные клетки, отличая по форме и цитоплазматическому содержанию клетки мезенхимального ряда и иммунокомпетентные клетки. Кроме того, данный метод можно сочетать с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией, позволяющей определить процентное содержание химических элементов в ткани. **Выводы.** Благодаря сохранению минералов и металлоконструкций в составе тканей, высокой разрешающей способности сканирующего электронного микроскопа и возможности дополнения энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией, мы предлагаем данный метод как наиболее подходящий для изучения ультраструктуры тканей сердечно-сосудистой системы, в том числе кальцинированных и содержащих металлоконструкции.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, гистология, стент, элементный анализ, атеросклеротические бляшки, минерализованные клапаны сердца.

A NEW APPROACH TO STUDYING WHOLE TISSUES OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM IN HIGH RESOLUTION BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

L.A. Bogdanov, R.A. Mukhamadiyarov, A.G. Kutikhin

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Annotation

Aim. To evaluate the effectiveness of using an original method of processing and staining tissues to preserve their integrity and visualization using back-scattered electron scanning electron microscopy. **Material and methods.** After fixation in 10% formalin (24 h), biopsies were postfixed with 1% osmium tetroxide (12 h) and then stained with 2% aqueous osmium tetroxide (48 h). Next, the samples were stained with an alcohol solution of 2% uranyl acetate (5 h), dehydrated (5 h) and acetone (1 h), impregnated with a mixture of acetone with Epon epoxy resin (1:1, 6 h), and then transferred into a fresh portion of epoxy resin (24 h) and then

polymerization was carried out at 60°C. After grinding and polishing, contrasting with lead citrate (7 min) was performed, epoxy blocks were sprayed with carbon, and the samples were visualized using scanning electron microscopy in back-scattered electrons. The elemental composition was studied using energy-dispersive X-ray spectroscopy. **Results.** The developed method makes it possible to achieve high quality images obtained at magnifications of up to 7500 times, provides an opportunity to visualize metal structures and calcifications in tissues, as well as identify individual cells, distinguishing mesenchymal cells and immunocompetent cells in shape and cytoplasmic content. In addition, this method can be combined with energy dispersive X-ray spectroscopy, which makes it possible to determine the percentage of chemical elements in tissue. **Conclusion.** Due to the preservation of minerals and metal structures in the composition of tissues, the high resolution of a scanning electron microscope, and the possibility of supplementing with energy dispersive X-ray spectroscopy, we propose this method as the most suitable for studying the ultrastructure of the cardiovascular system, including calcified and containing metal structures.

Key words: scanning electron microscopy, histology, stent, elemental analysis, atherosclerotic plaques, mineralized heart valves.

Актуальность. Несмотря на прогресс в области гистологических методов исследования, существуют сложности при анализе тканей сердечно-сосудистой системы, особенно тканей, содержащих эктопические кальцификаты (атеросклеротические бляшки, кальцинированные створки клапана сердца) или цельнометаллические медицинские изделия или их прототипы [1–3]. Кроме того, изучение ультраструктуры таких тканей иммуногистохимическими и гистохимическими методами ограничено ввиду низкой разрешающей способности световой микроскопии, а флуоресцентная микроскопия атеросклеротических бляшек или створок клапанов сердца дает значительный фоновый шум, что иногда приводит к невозможности дифференцировать его от положительного сигнала [4]. Для исследования морфологии тканей методом световой микроскопии необходима их дополнительная пробоподготовка, включающая уплотнение, заливку в твердую среду и резку полученных блоков на микротоме или криотоме толщиной 3–5 мкм. Выполнение резки кальцинированных тканей или тканей, содержащих металлоконструкции, приводит к критической потере целостности образца [5–7]. Альтернативой этому является декальцификация минерализованной ткани, однако процесс сопровождается нарушением морфологии мягких тканей из-за длительного влияния на ткань химических растворов [8]. Для изучения структуры тканей, содержащих металлоконструкции, в настоящее время используют 2 подхода: 1) механическое отделение мягких тканей от металла, при этом нарушается их целостность, и нет возможности изучить морфологию ткани вокруг металлических конструкций; 2) резка металлических конструкций вместе с тканью при помощи ножей с алмазным напылением, однако качество резки неудовлетворительно, а стоимость таких ножей кратно выше обычных [8]. Таким образом, существует потребность в принципиально новом методе пробоподготовки тканей, включающей в себя фиксацию, проводку, окрашивание и микроскопирование, с целью визуализации тканей, содержащих металлические имплантаты или очаги эктопической минерализации. Ранее нашей группой был разработан оригинальный подход постфиксирования и окрашивания тканей после фиксации в забуференном 10% формалине, с последующим контрастированием уранилацетатом, пропиткой и заливкой в эпоксидную смолу для дальнейшей визуализации методом сканирующей электронной микроскопии [9].

Цель исследования – оценить эффективность использования оригинального метода обработки и окрашивания тканей для сохранения их целостности и визуализации с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах (BSEM).

Материал и методы

В качестве объектов исследования были использованы: атеросклеротические бляшки человека, кальцифицированные аортальные клапаны сердца человека, стент в составе сонной артерии человека, стент, удаленный из выводного отдела правого желудочка человека, полученные во время плановых операций, металлический имплантат в составе костной ткани крысы и сонная артерия овцы. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice), принципами Хельсинкской декларации (2013) и с соблюдением этических принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. До включения в работу от всех пациентов было получено письменное информированное согласие. Сразу после извлечения биоптаты были фиксированы в 10 % забуференном формалине не менее 24 ч с однократной заменой через первые 2 ч. После 2 ч

отмывки в водопроводной воде дополнительно постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия 12 ч для сохранения липидных структур, после чего окрашивали 2% раствором тетраоксида осмия 48 ч. Далее промывали в фосфатно-солевом буфере, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, подвергали окрашиванию спиртовым раствором уранилацетата в течение 5 ч, пропитывали и заливали в эпоксидную смолу. На следующем этапе полученные эпоксидные блоки шлифовали до зоны интереса и полировали до идеально гладкой поверхности образца для электронной микроскопии. После чего контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу 7 мин и отмывали в водопроводной воде. В качестве токопроводящего покрытия использовали углерод, который напыляли с помощью вакуумного напылительного поста (Leica EM ACE200, Германия). Визуализация осуществлялась методом сканирующей электронной микроскопии BSEM с напряжением 10 кВ (Hitachi-S-3400N, Япония). С целью определения элементного состава кальцификатов минерализованных тканей использовали энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию с помощью энергодисперсионного спектрометра XFlash 4010 (Bruker Daltonics, Германия), установленного на сканирующий электронный микроскоп. Элементный анализ выполняли в условиях низкого вакуума (давление в камере микроскопа 20 Па) и при ускоряющем напряжении 15 кВ в режиме BSEM.

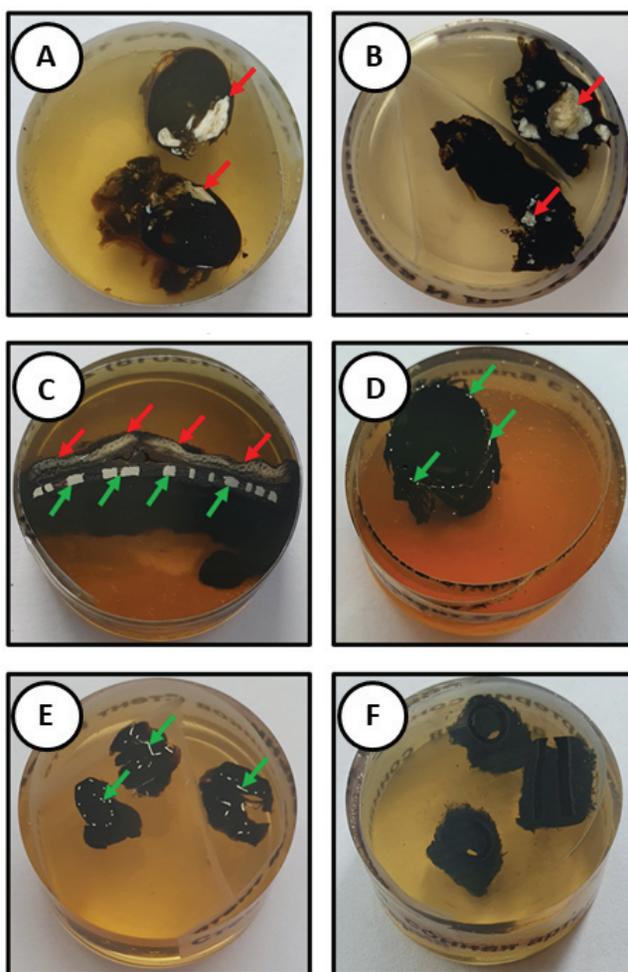


Рис. 1. А – кальцифицированная атеросклеротическая бляшка; В – кальцифицированный аортальный клапан; С – металлический имплантат в составе костной ткани; D – стент в составе сонной артерии; Е – стент, удаленный из выводного отдела правого желудочка; F – сонная артерия овцы

Результаты

Оригинальный метод пробоподготовки тканей дает возможность исследовать весь образец, включая металлические конструкции и кальцификаты при сохранении его целостности (рис. 1), остается возможность проводить послойное исследование образца путем последовательного шлифования и получать высококачественные изображения гистоархитектоники, внеклеточного матрикса и клеток при увеличении от 37 до 7500 раз. Преимуществами

сканирующей электронной микроскопии в режиме BSEM является высокая разрешающая способность, достаточная как для общего, так и для детального исследования морфологии ткани. Благодаря особенностям протокола, включающего в себя окрашивание тетраоксидом осмия, эластические мембраны выделяются на фоне других структур, а липидные отложения сохранены в неоинтиме. В составе неоинтимы возможно наблюдать цельный кальциевый депозит, окруженный мягкими тканями, визуальный осмотр которого может быть дополнен энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией. Кроме того, возможно дифференцировать скопления иммунокомпетентных клеток от нервного ствола (рис. 2). Благодаря

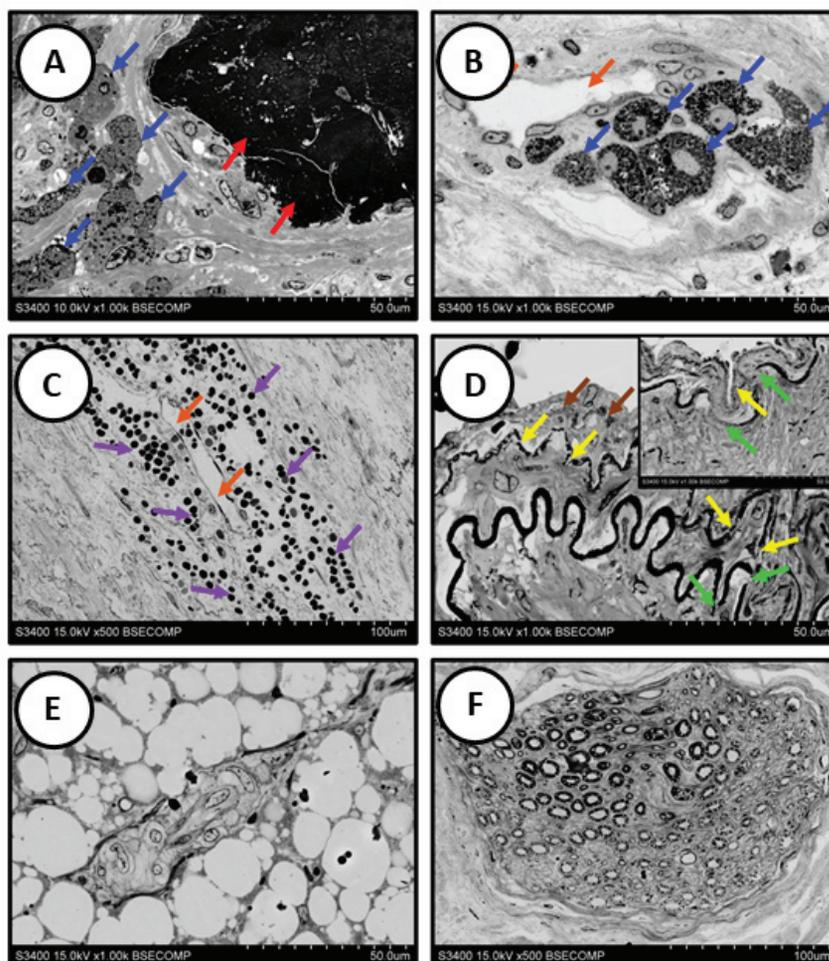


Рис. 2. А – неоинтимальная кальцификация, ув. x1000; В – липидные отложения, ув. x1000; С – кровоизлияние в бляшку, ув. x500; D – разрыв эластической мембраны, ув. x1000; E – скопление иммунных клеток, ув. x1000; F – нервный ствол, ув. x500

высокой разрешающей способности электронного микроскопа возможно наблюдать отдельные иммунные клетки. Так, при увеличении >2500 раз можно идентифицировать пенные клетки, гигантские многоядерные клетки и отдельные макрофаги, а на увеличении >5000 раз можно наблюдать нейтрофильную инфильтрацию, тучные клетки и отдельные лимфоциты (рис. 3). Благодаря стандартизированному качеству изображений, получаемых со сканирующего электронного микроскопа, существует возможность совместить данный метод с современными алгоритмами машинного обучения для автоматизированного аннотирования гистологических и клеточных паттернов, что позволит снизить время затраты на ручной подсчет объектов на гистологических снимках.

Выводы

Благодаря сохранению минералов и металлоконструкций в составе тканей, высокой разрешающей способности сканирующего электронного микроскопа и возможности дополнения метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией, мы предлагаем данный метод как наиболее подходящий для изучения ультраструктуры тканей сердечно-сосудистой системы, особенно кальцинированных и содержащих металлоконструкции.

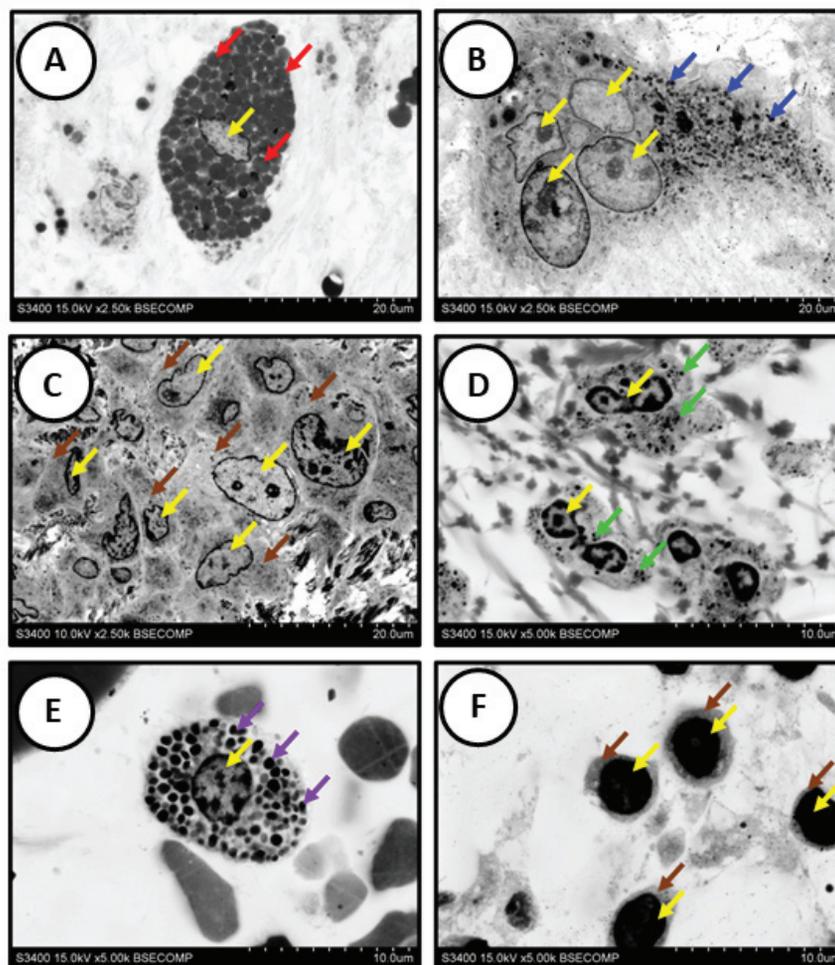


Рис. 3. А – пенящая клетка, ув. x2500; В – гигантские многоядерные клетки, ув. x2500; С – макрофаги, ув. x2500; Д – нейтрофилы, ув. x5000; Е – тучная клетка, ув. x5000; F – лимфоциты, ув. x5000

ЛИТЕРАТУРА

1. Timmermans F.J., Otto C. Contributed review: review of integrated correlative light and electron microscopy. *Rev Sci Instrum* 2015; 86(1): 011501, <https://doi.org/10.1063/1.4905434>.
2. Combs C.A., Shroff H. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr Protoc Neurosci* 2017; 79: 2.1.1–2.1.25, <https://doi.org/10.1002/cpns.29>.
3. Ryan J., Gerhold A.R., Boudreau V., Smith L., Maddox P.S. Introduction to modern methods in light microscopy. *Methods Mol Biol* 2017; 1563: 1–15, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6810-7_1.
4. Mukhamadiyarov R.A., Sevostyanova V.V., Shishkova D.K., Nokhrin A.V., Sidorova O.D., Kutikhin A.G. Grinding and polishing instead of sectioning for the tissue samples with a graft: implications for light and electron microscopy. *Micron* 2016; 85: 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.03.005>.
5. Wu M., Rementer C., Giachelli C.M. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93(4): 365–373, <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9712-z>.
6. Lanzer P., Boehm M., Sorribas V., Thiriet M., Janzen J., Zeller T., St Hilaire C., Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 2014; 35(23): 1515–1525, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu163>.
7. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Ovcharenko E.A., Kutikhin A.G. Development of calcific aortic valve disease: do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol* 2019; 132: 189–209, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.016>.
8. Bre L.P., McCarthy R., Wang W. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes. *Curr Med Chem* 2014; 21(22): 2553–2564, <https://doi.org/10.2174/0929867321666131212151216>.
9. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Mishinov S.V., Kutikhin A.G. A novel technique for preparation, staining, and visualization of tissue with metal implants and extraskeletal calcification areas. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(4): 13–22, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.4.02>.
10. Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 4(1): 6–14, <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14>.

РОЛЬ КАННАБИНОИДНЫХ И В2-БРАДИКИНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПОВЫШЕННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ СЕРДЦА К ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПРИ АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОЙ НЕПРЕРЫВНОЙ ГИПОКСИИ

И.А. Деркачев

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Цель исследования – изучение роли каннабиноидных и В2-брадикининовых рецепторов в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ). **Материал и методы.** Исследование было выполнено на самцах крыс Вистар (n=96) массой 250–300 г. Животных опытных групп подвергали воздействию ХННГ в течение 21 сут (12% O₂, 0,03% CO₂). Через 24 ч после адаптации у крыс воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч). Размер инфаркта определяли как соотношение размера зоны некроза к зоне риска (ЗН/ЗР). В исследовании использовали следующие фармакологические агенты: селективный антагонист каннабиноидных рецепторов первого типа (CB₁) римонабант (1 мг/кг), селективный антагонист каннабиноидных рецепторов второго типа (CB₂) AM630 (2,5 мг/кг), селективный антагонист В2-брадикининовых рецепторов HOE140 (50 мкг/кг). Антагонисты вводили внутривенно за 15 мин до коронароокклюзии. **Результаты.** Адаптация к ХННГ приводила к формированию выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта, который выразался в уменьшении отношения ЗН/ЗР с 53% у крыс нормоксического контроля до 25% в группе адаптированных к гипоксии животных. Блокада В2-брадикининовых рецепторов нивелировала повышенную толерантность сердца к ишемии/реперфузии (И/Р) после адаптации к ХННГ. Блокада CB₁ и CB₂ рецепторов не влияла на кардиопротекторное действие ХННГ. **Заключение.** В2-брадикининовые рецепторы играют важную роль в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ. CB₁ и CB₂ рецепторы не участвуют в адапционном повышении толерантности сердца к И/Р.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, адаптация к гипоксии, инфаркт миокарда.

THE ROLE OF CANNABINOID AND B2-BRADYKININ RECEPTORS IN THE REGULATION OF INCREASED CARDIAC TOLERANCE TO ISCHEMIA/REPERFUSION DURING ADAPTATION TO CHRONIC CONTINUOUS HYPOXIA

I.A. Derkachev

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, Tomsk, Russia

Annotation

The study aimed to investigate the role of cannabinoid and B2 bradykinin receptors in the infarct-limiting effect of chronic continuous normobaric hypoxia (CNH). **Material and methods.** The study was performed in male Wistar rats (n = 96) weighing 250–300 g. Animals of the experimental groups were exposed to CNH for 21 days (12% O₂, 0,03% CO₂). Rats were subjected to coronary artery occlusion (45 min) and reperfusion (2 h) 24 hours after the end of adaptation. Infarct size was defined as the ratio of infarct size to area at risk (IS/AAR). The following pharmacological agents were used in a study: the selective cannabinoid receptor type 1 (CB₁) antagonist rimonabant (1 mg/kg), the selective cannabinoid type 2 receptor (CB₂) antagonist AM630 (2.5 mg/kg), the selective B2-bradykinin receptor antagonist HOE140 (50 µg/kg). Antagonists were administered intravenously 15 minutes before coronary occlusion. **Results.** Adaptation to CNH led to the formation of a pronounced infarct-limiting effect, which consisted in a decrease in infarct size from 53% in normoxic control rats to 25% in the group of animals adapted to hypoxia. Blockade of B2-bradykinin receptor abolished increased cardiac tolerance to ischemia/reperfusion (I/R) after adaptation to CNH. Blockade of CB₁ and CB₂ receptors did not affect the cardioprotective effect of CNH. **Conclusion.** B2-bradykinin receptors

play an important role in the formation of the infarct-limiting effect of CNH. CB1 and CB2 receptors are not involved in an adaptation-induced increase in cardiac tolerance to I/R.

Key words: heart, ischemia, reperfusion, adaptation to hypoxia, myocardial infarction.

Актуальность. В настоящее время, несмотря на успехи современной кардиологии, смертность от острого инфаркта миокарда (ОИМ) составляет около 5% и не снижается в последние годы [1]. В России этот показатель составляет 6% для кардиологических клиник [2]. У пациентов с ОИМ и кардиогенным шоком смертность равна 70% [3]. В связи с этим во всем мире продолжают исследования механизмов и способов кардиопротекции, особо актуальной остается тема создания новых лекарственных препаратов для защиты миокарда при ишемии/реперфузии (И/Р).

Одним из важных направлений изучения механизмов защиты сердца является феномен адаптации к хронической гипоксии. Известно, что адаптация к хронической гипоксии оказывает инфаркт-лимитирующий эффект [4]. Известно, что инфаркт-лимитирующий эффект сохраняется в течение пяти недель после прекращения хронической гипоксии [5]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов кардиопротекторного эффекта адаптации к гипоксии способно предоставить перспективы для создания принципиально новых препаратов для профилактики острого инфаркта миокарда и внезапной сердечной смерти.

Цель исследования – изучить роль каннабиноидных и В2-брадикининовых рецепторов в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ).

Материал и методы

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар ($n = 96$) массой 250–300 г с соблюдением Хельсинкской конвенции по обращению с лабораторными животными и было одобрено локальным этическим комитетом НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол № 207 от 23 декабря 2020 г.).

Крыс разделили на четыре группы. Животных нормоксического контроля содержали в стандартных условиях вивария. Крыс подопытных групп подвергли воздействию ХННГ в течение 3 нед (12% O_2 , 0,03% CO_2), с использованием оборудования «Био-Нова-204G4R1» с блоком управления МХ-32. Адаптированных к гипоксии животных извлекали из гипоксической камеры за 24 ч до начала эксперимента.

В исследовании использовались следующие препараты: антагонист каннабиноидных рецепторов 1 типа (CB_1) римонабант (1 мг/кг), антагонист каннабиноидных рецепторов 2 типа (CB_2) am630 (2,5 мг/кг) и антагонист В2-брадикининовых рецепторов НОЕ140 (3 мг/кг). Препараты вводили внутривенно за 15 мин до коронароокклюзии.

Животных наркотизировали α -хлорозолой. Коронароокклюзия осуществлялась наложением лигатуры на левую коронарную артерию на 45 мин с последующим снятием для реперфузии ишемизированной области. Длительность реперфузии составляла 120 мин. Величину инфаркта выражали процентным соотношением площади зоны некроза (ЗН) к зоне риска (ЗР).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13 (StatSoft, Inc., США). Соответствие распределения нормальному закону оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Проверку на гомогенность дисперсий производили с использованием критерия Левена (Levene). Данные представлены средним значением и стандартной ошибкой среднего (среднее \pm ошибка среднего). Для выявления статистически значимых различий использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с последующим применением апостериорного критерия Тьюки для парных сравнений. За критический уровень значимости принимали $p = 0,05$.

Результаты

Размер инфаркта у адаптированных к гипоксии животных составил $25 \pm 1,9$ % против $53 \pm 2,2$ % у крыс группы нормоксического контроля (таблица).

Антагонист В2-брадикининовых рецепторов НОЕ140 устранял инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к гипоксии. Отношение ЗН/ЗР составило $68 \pm 1,7$ %. Блокада данного рецептора у неадаптированных к гипоксии животных не влияла на соотношение ЗН/ЗР – $52 \pm 1,9$ %.

Римонабант не устранял инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к гипоксии. Отношение ЗН/ЗР – $25 \pm 1,8$ %. Блокада данного рецептора у неадаптированных к гипоксии животных также не влияла на соотношение ЗН/ЗР, размер инфаркта составил $51 \pm 2,1$ %.

Am630 также не оказывал влияния на размер инфаркта как у адаптированных к гипоксии животных (23±2,4 %), так и у крыс нормоксического контроля (51±1,2 %).

Таблица

Влияние антагонистов каннабиноидных и В2-брадикининовых рецепторов на размер инфаркта у крыс при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии, М ± SEM

Группа	Зона некроза/зона риска (ЗН/ЗР), %	
	Нормоксия	ХННГ
Контроль	53 ± 2,2	25 ± 1,9*
Римонабант(1мг/кг)	51 ± 2,1	25 ± 1,8 *
AM630 (2,5мг/кг)	51 ± 1,2	23 ± 2,4*
НОЕ140 (50 мг/кг)	52 ± 1,9	68 ± 1,7*#

* – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой, # – p < 0,05 по сравнению с группой крыс, адаптированных к ХННГ, двухфакторный дисперсионный анализ (two-wayANOVA).

Заключение

В2-брадикининовые рецепторы играют важную роль в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ. Каннабиноидные СВ₁ и СВ₂ рецепторы не участвуют в индуцированном хронической гипоксией повышении толерантности сердца к И/Р.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № 21-515-53003.

ЛИТЕРАТУРА

1. Megaly M., Pershad A., Glogoza M., Elbadawi A., Omer M., Saad M., Mentias A., Elgendy I., Burke M.N., Capodanno D., Brilakis E.S. Use of Intravascular Imaging in Patients With ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction // Cardiovasc Revasc Med. 2021. Vol. 30. P. 59–64.
2. Bessonov I.S., Kuznetsov V.A., Gorbatenko E.A., Dyakova A.O., Sapozhnikov S.S. Influence of Total Ischemic Time on Clinical Outcomes in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction // Kardiologiya. 2021. Vol. 61, N. 2. P. 40–46.
3. Sambola A., Elola F.J., Buera I., Fernández C., Bernal J.L., Ariza A., Brindis R., Bueno H., Rodríguez-Padial L., Marín F., Barabés J.A., Hsia R., Anguita M. Sex bias in admission to tertiary-care centres for acute myocardial infarction and cardiogenic shock. // Eur J Clin Invest. 2021. Vol. 51, N. 7. P. e13526.
4. Tsubulnikov S.Y., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ma H., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Garlid K. Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia // Gen Physiol Biophys. 2018. Vol. 37, N. 5. P. 537–47.
5. Neckár J., Ostádal B., Kolár F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // Physiol Res. 2004. Vol. 53, N. 6. P. 621–8.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА И МИЛДРОНАТА В ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ИШЕМИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА

О.В. Дудченко

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Аннотация

Проведено исследование применения этилметилгидроксипиридина сукцината и милдроната у больных хронической сердечной недостаточностью. Отобрали группу из 72 пациентов с примерно одинаковыми клиническими проявлениями, произвели обследование, затем попросили пройти тест с шестиминутной ходьбой. Далее пациентов разделили на две группы, назначили каждой из групп свой препарат по схеме, затем повторили тест и сравнили результаты.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, этилметилгидроксипиридина сукцинат, милдронат, тест с шестиминутной ходьбой.

THE USING OF ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE AND MILDRONATE IN THE TREATMENT OF CHRONIC HEART FAILURE OF ISCHEMIC ORIGIN

O.V. Dudchenko

Belgorod State University, Belgorod, Russia

Annotation

A study was made of the use of ethylmethylhydroxypyridine succinate and mildronate in patients with chronic insufficiency. A group of 72 patients with approximately the same clinical manifestations was selected, examined, then asked to take a six-minute walk test. Then the patients were divided into two groups, each group was prescribed its own drug according to the scheme, then the test was repeated and the results were compared.

Key words: chronic heart failure, ethylmethylhydroxypyridine succinate, mildronate, six-minute walk test.

Актуальность. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) в разных ее проявлениях стала все чаще встречаться у пациентов амбулаторного звена [1, 2]. При хроническом стабильном течении ИБС иногда требуется антиоксидантная поддержка, вследствие чего происходит постоянный поиск и изучение препаратов, влияющих на данные механизмы [3].

Цель исследования – изучить использование этилметилгидроксипиридина сукцината и милдроната в терапии хронической сердечной недостаточности ишемического генеза.

Материал и методы

Исследование проводилось на базе ОГБУЗ «Городская поликлиника г. Белгорода». Произведен анализ медицинской документации 72 амбулаторных пациентов с установленным диагнозом хронической ИБС (ХИБС), приведшей к хронической сердечной недостаточности (ХСН) на основании клинико-инструментальных данных.

Все пациенты имели I–IIА степень ХСН по классификации В.Х. Василенко, Н.Д. Стражеско и 2 функциональный класс по классификации NYHA. Перед медицинским вмешательством все дали информированное согласие на него. Возраст пациентов составил от 65 до 82 лет ($M=74,5$). Исключены пациенты с перенесенными инсультами, преходящими нарушениями мозгового кровотока, острым инфарктом миокарда, нестабильной стенокардией, фатальными аритмиями, онкологией, психическими отклонениями, нарушениями в работе щитовидной железы.

В процессе обследования пациентов изучались жалобы, данные физикального обследования, рентгенография грудной клетки, общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, электрокардиограмма, эхокардиограмма, холтеровское мониторирование ЭКГ.

Пациенты поделены на две группы. Пациентам первой группы сначала вводили препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат 50 мг/мл 1 ампулу внутримышечно 3 раза в сутки 14 дней, затем переходили на таблетированные формы 250 мг в сутки в один или два приема в течение 8 нед (согласно инструкции к препарату). Пациентам второй группы сначала вводили милдронат (100 мг/мл) 5 мл один раз в сутки 14 дней, затем они принимали капсулы по 500 мг два раза в сутки 6 нед.

До начала приема препаратов и после курса терапии пациентам предложено провести тест с шестиминутной ходьбой. В обоих случаях производилось измерение систолического артериального давления (САД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), пройденного расстояния. Затем провели оценку результата по шкале Борга. Это специальная шкала с баллами от 0 до 10, пациенту предлагается выбрать одно из чисел, отражающее степень одышки, которую он испытывает при выполнении теста с шестиминутной ходьбой. Варианты показателей: 0 – покой, 1 – очень легко, 2 – легко, 3 – умеренная нагрузка, 4 – довольно тяжело, 5 – тяжело, 6 – тяжело, 7 – очень тяжело, 8 – очень тяжело, 9 – очень-очень тяжело, 10 – максимальная нагрузка.

Сбор и обработка материала производились с помощью таблиц Excel, сравнение результатов после применения лекарств методом непараметрической оценки данных «U-критерий Манна–Уитни».

Результаты

В первую группу вошло 35 человек, во вторую – 22 человека. Пациенты предъявляли жалобы на перебои в работе сердца, дискомфорт за грудиной, усиленное и учащенное сердцебиение. Все получали базисную сосудистую терапию, достигнуты целевые значения пульса, артериального давления, гликемии, липидов. В группе этилметилгидроксипиридина сукцината показатели изменялись следующим образом. САД со 155 (140;170) улучшилось до 145 (135;155) мм рт. ст. ЧСС изменилось со 140 (115;165) до 127 (110;145) ударов в минуту. Расстояние с 415 (400;430) до 432 (425;440) м. Оценка по шкале Борга с 5 (3;7) до 4 (3;5) баллов. Произведено сравнение результатов опроса по шкале Борга после применения обоих лекарств методом непараметрической оценки данных. U-критерий Манна–Уитни равен 183,5. $p=0,645$. При сравнении значений пульса после применения препаратов U-критерий получен 52,0, $p=0,875$. После сравнения пройденного расстояния U-критерий 19, $p=0,476$. При сравнении артериального давления U-критерий 32, $p=0,333$. Данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты прохождения теста с шестиминутной ходьбой до и после приема этилметилгидроксипиридина сукцината и милдроната

	До приема этилметилгидроксипиридинасукцината (Me; LQ; HQ)	p	После приема этилметилгидроксипиридинасукцината (Me; LQ; HQ)	До приема милдроната (Me; LQ; HQ)	p*	После приема милдроната (Me; LQ; HQ)	p**
САД, мм ртст	155 (140;170)	$p<0,05$	145 (135;155)	154 (144;165)	$p<0,05$	143 (132;155)	$p=0,333$
ЧСС, уд/мин	140 (115;165)	$p<0,05$	127 (110;145)	137 (120;155)	$p<0,05$	125 (105;145)	$p=52$
Пройденное расстояние, м	415 (400;430)	$p<0,05$	432 (425;440)	417 (410;425)	$p<0,05$	439 (430;448)	$p=0,476$
Оценка по шкале Борга, баллы	5 (3;7)	$p<0,05$	4 (3;5)	5,5 (3;8)	$p<0,05$	4,5 (3;6)	$p=0,645$

Примечание: p – p-уровень значимости при сравнении параметров в первой группе до и после приема лекарств; p* – p-уровень значимости при сравнении параметров во второй группе до и после приема лекарств; p** – p-уровень значимости при сравнении обеих групп между собой после приема лекарств

Заключение

При сравнении действия препаратов этилметилгидроксипиридина сукцината и милдроната между собой статистически значимой разницы не обнаружено. На фоне их приема выявлено одинаковое уменьшение клинических проявлений и улучшение объективных показателей пациентов, повышение переносимости физических нагрузок. Это может позволить включать их использование в терапии хронической сердечной недостаточности ишемического генеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Погурельская Е.П., Дудченко О.В., Ефремова О.А., Бондаренко Е.В., Гайворонская М.А., Котенко А.С. Приверженность лекарственной терапии больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, перенесших мозговой инсульт // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2019. Т. 42, №1. С. 65–71. DOI 10.18413/2075-4728-2019-42-1- 65-72.
2. Хроническая сердечная недостаточность. Клинические рекомендации 2020. // Российский кардиологический журнал. 2020. №25 (11). 4083 с. Doi:10.15829/1560-4071-2020-4083
3. Гайфулина Р.И. Современные подходы к улучшению приверженности к лечению // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: Материалы 76-й научной сессии ВГМУ / под ред. А.Т. Щастного. Витебск: Витебский государственный медицинский университет. 2021. С. 137–139.

ЖЕЛУДОЧКОВЫЕ НАРУШЕНИЯ РИТМА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

К.С. Зубрицкий

Государственная образовательная организация высшего профессионального образования
«Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», г. Донецк, Украина, ДНР

Аннотация

У больных сахарным диабетом 2-го типа зарегистрированы ЭКГ признаки преимущественно безболевого и в меньшей степени болевой ишемии миокарда. При этом комбинированное применение амиодарона с омакором, в отличие только от амиодарона, позволяет достоверно снизить численность и суммарную суточную продолжительность ишемии миокарда. Преобладающими классами желудочковых нарушений ритма явились 3 и 4А. Терапия без амиодарона приводила к уменьшению частоты классов 1 и 2 и увеличению 3 и 4А, что свидетельствует об увеличении частоты жизнеопасных нарушений ритма. Использование амиодарона (1-я группа) приводило к достоверному снижению частоты 1–3 классов, не оказывая значимого влияния на аритмии более высоких градаций. Комбинация амиодарона с омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами позволила более интенсивно снижать частоту классов 3–4Б и перераспределять больных в менее жизнеопасные 1 и 2 классы.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, желудочковые нарушения сердечного ритма.

VENTRICULAR RHYTHM DISTURBANCES IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

K.S. Zubritskiy

State educational organization of higher professional education
«Donetsk National Medical University them. M. Gorky», Donetsk, Ukraine, DPR

Annotation

On patients with type 2 diabetes mellitus, ECG signs of predominantly painless and, to a lesser extent, painful myocardial ischemia was recorded. At the same time, the combined use of amiodarone with omacor, in contrast to only amiodarone, can reliably reduce the number and total duration of myocardial ischemia. The predominant classes of ventricular arrhythmias were 3 and 4A. Therapy without amiodarone led only to a decrease in the frequency of classes 1 and 2 and an increase in 3 and 4A, which indicates an increase in the frequency of life-threatening rhythm disturbances. The use of amiodarone (group 1) led to a significant decrease in the frequency of grades 1–3, without having a significant effect on arrhythmias of higher grades. The combination of amiodarone with omacor made it possible to more intensively reduce the frequency of classes 3-4B classes and redistribute patients into less life-threatening classes 1 and 2.

Key words: type 2 diabetes mellitus, ventricular rhythm disturbances.

Актуальность. В последние годы сахарный диабет 2-го типа (СД 2-го типа) рассматривается с позиции фактора риска нарушений ритма сердца [1–2], что обусловлено присутствием как хронических форм ишемической болезни сердца (ИБС), так и безболевого ишемии миокарда (БИМ) в рамках диабетической нейрокардиопатии, а также комплекса метаболических и электрофизиологических изменений, формирующихся вследствие инсулинрезистентности, гиперактивации симпатической нервной системы, глюкозотоксичности, преимущественно ночной гипогликемии, активации атеросклероза и фибротической перестройки миокарда с формированием диастолической или систоло-диастолической дисфункции левого желудочка [3–4].

Цель исследования – выявление вариантов нарушений сердечного ритма и разработка эффективного противоритмического лечения желудочковых нарушений ритма.

Материал и методы

В исследование включено 126 пациентов СД 2-го типа в возрасте $53 \pm 1,5$ года (73 мужчины и 53 женщины). Средний возраст больных в дебюте заболевания/выявления диабета составил $47,9 \pm 1,3$ года, а средняя длительность заболевания – $5,1 \pm 0,1$ года.

Критериями включения были: СД 2-го типа средней тяжести в стадии суб-/компенсации без инсулина. После скринингового и инициализирующего этапов методом случайной выборки больные были рандомизированы в 3 группы наблюдения, статистически гомогенные по возрасту (1 и 2-я – $t=0,2$, $p=0,78$; 1 и 3-я – $t=0,9$, $p=0,16$; 2 и 3-я – $t=1,3$, $p=0,31$ соответственно), полу (1 и 2-я – $\chi^2=0,6$, $p=0,33$; 1 и 3-я – $\chi^2=1,2$, $p=0,25$; 2 и 3-я – $\chi^2=0,4$, $p=0,58$ соответственно), длительности диабетического синдрома (1. и 2-я – $t=1,3$, $p=0,20$; 1 и 3-я – $t=0,5$, $p=0,77$; 1-и 3-я – $t=0,3$, $p=0,89$ соответственно).

Пациенты 1-й группы (42 человека) получали двухкомпонентную оральную противодиабетическую терапию, амиодарон 200–600 мг/сутки, ингибитор АПФ или сартан независимо от наличия артериальной гипертензии (АГ) и исходного уровня артериального давления, ингибитор ГМГ-Ко редуктазы или фибрат (при гипертриглицеридемии), бета-адреноблокатор, дезагрегант. При наличии артериальной гипертензии к лечению добавляли дигидропиридиновые антагонисты кальция. Представители 2-й группы получали такое же лечение, но в сочетании с омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами (препарат «Омакор», Abbott Laboratories GmbH) в суточной дозе 1000 мг. Представители 3-й группы получали только базисное лечение без амиодарона и омакора.

Суточное мониторирование ЭКГ проводили при помощи кардиомонитора «Кардиотехника-04-АД-3», Россия.

При анализе желудочковых нарушений ритма изучали морфологию аритмии, интервал сцепления желудочковой экстрасистолии (ЖЭ), связь с нагрузкой и ишемическими эпизодами. Классифицировали ЖЭ по Lown B. и Wolf M. (1971).

Для статистической обработки применялся пакет статистических программ Statistica 6,0. Значимость различий между группами, а также между показателями в динамике в каждой из групп оценивали при помощи критерия Стьюдента для зависимых или независимых выборок. При сравнении качественных показателей использовался критерий χ^2 . Уровень значимости соответствовал величине $p<0,05$.

Результаты

Динамика частоты классов желудочковых нарушений сердечного ритма представлена в таблице.

Таблица

Частота (%) классов желудочковых нарушений ритма по Lown-Wolf в модификации Ryan M. на этапах лечения

Группы больных и этапы обследования	1	2	3	4А	4Б
1-я до лечения	4,7	14,3	28,6	42,9	11,9
1-я через 3,5 месяца	0	9,5 ¹	23,8 ¹	40,5	11,9
2-я до лечения	4,7	13,9	27,9	41,9	11,6
2-я через 3,5 месяца	9,3 ¹	20,9 ¹²	30,2 ¹²	39,5 ¹	2,3 ¹²
3-я до лечения	4,9	12,1 ³	26,8 ³	43,9 ³	12,2
3-я через 3,5 месяца	2,4 ⁴	9,8 ¹⁴	29,3	48,8 ¹⁴	12,2 ⁴

Примечание. ¹ – различия между аналогичными показателями до и после лечения статистически достоверны; ² – различия между аналогичными показателями у больных 1-ой и 2-ой групп после лечения статистически достоверны; ³ – различия аналогичных показателей у больных 1-ой и 3-ей групп после лечения статистически достоверны; ⁴ – различия между аналогичными показателями у больных после лечения 2-ой и 3-ей групп статистически достоверны.

Исходными доминирующими вариантами в группах больных были классы 3 и 4А. Терапия с включением амиодарона (группа 1) способствовала достоверному снижению частоты 2 и 3-го классов и исчезновению класса 1. Сочетанная антиаритмическая терапия омакором и амиодароном (группа 2) приводила к достоверному ($p<0,05$) снижению частоты класса 3 и в меньшей степени 4А и 4Б. Лечение в группе 3 преимущественно позиционировалось относительно снижения частоты нежизнеопасных классов 1 и 2. Напротив, в этой группе отмечен рост прогностически неблагоприятных классов 4А и Б.

Заключение

Преобладающими классами желудочковых нарушений ритма при СД 2-го типа являются 3 и 4А. Терапия без амиодарона (3-я группа) приводила лишь к уменьшению частоты классов 1 и 2 и увеличению 3 и 4А, что свидетельствует об увеличении частоты жизнеопасных нарушений ритма. Использование монотерапии амиодароном (1-я группа) приводило к достоверному снижению частоты 1–3 классов, но не оказывало значимого влияния на аритмии

более высоких градаций. Комбинация амиодарона с омакором позволила более интенсивно снижать частоту классов 3–4Б и перераспределять больных из них в нежизнеопасные 1 и 2-й классы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гимаев Р.Х., Рузов В.И., Разин В.А. Нарушение электрофизиологических свойств миокарда у больных артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа // Клиническая медицина. 2012. №2. С. 35–38.
2. Мальцева Л.С., Замяткина О.В., Шульгина Т.С. Антиаритмический эффект омакора у больных хронической ишемической болезнью сердца с нарушением ритма в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа // Профилактическая медицина. 2016. №19 (2). С. 51–51.
3. Agarwal G., Singh S.K. Arrhythmias in Type 2 Diabetes Mellitus // Indian J. Endocrinol. Metab. 2017. Vol. 21(5). P. 715–718.
4. American Diabetes Association standards of medical care in diabetes 2020 // Diabetes Care. 2020. Vol. 43(supplement 1). S1–S2.

ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ ТАХИКАРДИИ ТИПА «ПИРУЭТ» У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННО-ИНДУЦИРОВАННЫМ УДЛИНЕНИЕМ ИНТЕРВАЛА QT

Л.В. Колоцей

УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь

Аннотация

Цель исследования – выявить электрокардиографические предикторы развития лекарственно-индуцированной желудочковой тахикардии (ЖТ) типа «пируэт». **Материал и методы.** В исследование включено 110 пациентов с ишемической болезнью сердца и/или артериальной гипертензией и нарушениями ритма сердца, принимавших антиаритмические препараты III класса (амиодарон либо соталол). В зависимости от наличия или отсутствия лекарственно-индуцированного синдрома удлинённого интервала QT (СУИ QT) пациенты были разделены на 2 группы: «СУИ QT» (n=64) и «Без СУИ QT» (n=46). По наличию или отсутствию ЖТ типа «пируэт» пациенты были дополнительно разделены на группы «СУИ QT с TdP» (n=17) и «СУИ QT без TdP» (n=47). Всем пациентам проводились клинико-лабораторные и инструментальные исследования, включавшие сбор анамнеза, физикальное исследование, общеклинические лабораторные исследования, холтеровское мониторирование, а также запись ЭКГ в 12 отведениях до начала и во время приема антиаритмических препаратов. **Результаты.** При анализе исходных показателей стандартной ЭКГ пациентов между исследуемыми группами пациентов не было выявлено достоверных различий, за исключением большей продолжительности скорректированного интервала JT у пациентов с ЖТ типа «пируэт» по сравнению с пациентами без СУИ QT (p=0,03). При сопоставлении показателей, характеризующих реполяризацию миокарда желудочков, было установлено, что у пациентов с ЖТ типа «пируэт» отмечалась достоверно большая продолжительность скорректированных интервалов QT и JT (p<0,001). Значения показателей баланса деполяризации и реполяризации миокарда желудочков (iCEB (QT/QRS) и iCEBc (QTc/QRS)) были достоверно выше у пациентов с ЖТ типа «пируэт» (p<0,001). По итогам проведенного анализа таблиц сопряженности самым информативным предиктором ЖТ типа «пируэт» было значение iCEBc≥5,81 (ОШ=7,294, 95%ДИ [4,245–11,532]). По результатам однофакторного ROC-анализа значение iCEBc≥5,81 продемонстрировало высокие показатели чувствительности (94,1%) и специфичности (84,9%), а также достаточно высокую площадь под ROC-кривой (0,901). **Выводы.** Полученные нами результаты указывают на то, что значение скорректированного индекса кардиоэлектрофизиологического баланса ≥5,81 может использоваться для прогнозирования возникновения ЖТ типа «пируэт» в дополнение к существующим электрокардиографическим показателям.

Ключевые слова: лекарственно-индуцированный синдром удлинённого интервала QT, антиаритмические препараты, желудочковая тахикардия типа «пируэт», электрокардиография, скорректированный индекс кардиоэлектрофизиологического баланса.

ELECTROCARDIOGRAPHIC PREDICTORS OF TORSADES DE POINTES IN PATIENTS WITH DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME

L.V. Kalatsei

Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

Abstract

Objective. To identify electrocardiographic predictors of drug-induced torsades de pointes. **Material and methods.** The study included 110 patients with ischemic heart disease and /or arterial hypertension and cardiac arrhythmias who were taking class III antiarrhythmic drugs (amiodarone or sotalolol). According to the presence of the drug-induced QT interval prolongation, patients were divided into 2 groups: «LQTS» (n=64) and «Non LQTS» (n=46). According to the presence or absence of torsades de pointes, patients were additionally divided into the «TdP» (n=17) and «Non TdP» (n=47) groups. All patients underwent clinical, laboratory and instrumental examinations, which included taking anamnesis, physical examination, general clinical laboratory examinations, Holter monitoring, and 12-lead ECG recording before and while taking antiarrhythmic drugs. **Results.** When analyzing the baseline ECG parameters before the initiation of antiarrhythmic therapy, no significant differences were found between the groups except for a greater QT interval dispersion in the group of patients with torsades de pointes compared with patients without LQTS (p=0.03). While receiving antiarrhythmic therapy, patients with torsades de pointes had a longer duration of the corrected QT and JT intervals (p<0.001). The values of the parameters of the balance of depolarization and repolarization of the ventricular myocardium (iCEB and iCEBc) were significantly higher in patients with torsades de pointes (p<0.001). The most effective predictor of torsades de pointes was an iCEBc value ≥ 5.81 (OR = 7.294, 95% CI [4,245-11,532]). According to the results of one-way ROC-analysis, the iCEBc value ≥ 5.81 demonstrated high sensitivity (94.1%) and specificity (84.9%), as well as a fairly high area under the ROC-curve (0.901). **Conclusions.** Our results indicate that the value of the corrected index of the cardio-electrophysiological balance ≥ 5.81 can be used in the prediction of torsades de pointes in addition to the existing electrocardiographic parameters.

Key words: drug-induced long QT syndrome, antiarrhythmic drugs, torsades de pointes, electrocardiography, repolarization, corrected index of cardioelectrophysiological balance.

Актуальность. Синдром удлинённого интервала QT (СУИ QT) – это потенциально жизнеугрожающая каналопатия, сопровождающаяся удлинением интервала QT на 12-канальной ЭКГ, синкопальными состояниями и высоким риском внезапной сердечной смерти (ВСС) вследствие развития полиморфной желудочковой тахикардии (ЖТ) типа «пируэт» [1–3]. Стратификация риска внезапной сердечной смерти при лекарственно-индуцированном СУИ QT остается сложной задачей [4]. На сегодняшний день не существует всеобъемлющего, легко измеряемого и широкодоступного показателя, который обладал бы достаточно высокой способностью прогнозировать возникновение желудочковых нарушений ритма, в частности ЖТ типа «пируэт» у данной категории пациентов.

Цель исследования – оценить значения электрокардиографических показателей, характеризующих деполяризацию и реполяризацию миокарда желудочков сердца у пациентов, принимающих антиаритмические препараты III класса, с наличием лекарственно-индуцированного удлинения интервала QT и выявить электрокардиографические предикторы развития лекарственно-индуцированной ЖТ типа «пируэт».

Материал и методы

Для достижения поставленной цели было обследовано 110 пациентов, преимущественно с ишемической болезнью сердца (ИБС), артериальной гипертензией (АГ) и нарушениями ритма сердца. Пациенты с фибрилляцией предсердий (ФП) направлялись в стационар для проведения электрической кардиоверсии либо с целью подбора антиаритмической терапии. Пациенты с желудочковыми нарушениями ритма госпитализировались с целью уточнения диагноза и определения тактики и стратегии дальнейшего лечения. Всем пациентам в стационаре с целью антиаритмической терапии назначались антиаритмические препараты III класса (амиодарон либо соталол).

Все пациенты были разделены на две группы в зависимости от наличия или отсутствия удлинения интервала QT в ответ на прием антиаритмической терапии. Первую группу («СУИ QT») составили 64 пациента, из них 37 (57,9%) женщин и 27 (42,1%) мужчин, средний воз-

раст – 57,2±9,4 лет, у которых отмечалось лекарственно-индуцированное удлинение скорректированного интервала QT (Bazett) (свыше 450 мс у мужчин и свыше 470 мс у женщин) на фоне приема антиаритмических препаратов III класса. Во вторую группу («Без СУИ QT») вошли 46 пациентов, из них 19 (41,3%) женщин и 27 (58,7%) мужчин, средний возраст – 56,1±9,2 лет, без наличия лекарственно-индуцированного удлинения скорректированного интервала QT.

Всем пациентам проводились клинико-лабораторные и инструментальные исследования, включавшие в себя сбор анамнеза, физикальные исследования, запись ЭКГ в 12 отведениях, эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), 24-часовое холтеровское мониторирование ЭКГ, общеклинические лабораторные исследования.

В зависимости от наличия либо отсутствия ЖТ типа «пируэт» по данным 24-часового холтеровского мониторирования ЭКГ на фоне приема антиаритмической терапии, пациенты с лекарственно-индуцированным СУИ QT были дополнительно разделены на 2 группы: с ЖТ типа «пируэт» (17 человек) и без ЖТ типа «пируэт» (47 человек). Средняя длительность эпизода полиморфной ЖТ типа «пируэт» составила 7,3±4,1 секунды, среднее количество эпизодов за сутки – 2,7±2,3, средняя ЧСС – 245±32 ударов в минуту.

Статистический анализ выполнялся с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0 с предварительной проверкой на нормальность распределения с помощью гистограммы распределения. Для оценки различий количественных признаков между двумя независимыми группами использовали критерий Манна-Уитни. При уровне значимости $p < 0,05$ считалось, что исследуемый показатель в сравниваемых группах имел статистически значимые различия. Для сопоставления диагностической ценности показателей, продемонстрировавших статистически значимые различия между группами, применяли ROC-анализ с помощью построения характеристических кривых зависимости чувствительности и специфичности исследуемых признаков.

Результаты

Пациенты с наличием и без наличия лекарственно-индуцированного СУИ QT на момент включения в исследование не различались по полу, возрасту, основному заболеванию, наличию в анамнезе инфаркта миокарда, некардиальной сопутствующей патологии ($p > 0,05$). Из антиаритмической терапии пациенты исследуемых групп получали амиодарон либо соталол. В группе «СУИ QT» амиодарон был назначен 42 (65,6%), а соталол – 22 (34,4%) пациентам, что значимо не отличалось от показателей группы «Без СУИ QT», 32 пациентов (69,6%) из которой получали амиодарон ($p = 0,719$), а 14 (30,4%) – соталол ($p = 0,724$).

При анализе исходных стандартных ЭКГ пациентов, записанных до начала приема антиаритмических препаратов, между всеми тремя группами пациентов не было выявлено статистически достоверных различий, за исключением большей продолжительности скорректированного интервала JT (JTc) у пациентов с ЖТ типа «пируэт» по сравнению с пациентами без СУИ QT ($p = 0,03$).

Значения электрокардиографических показателей, зарегистрированные у пациентов обеих групп на фоне приема антиаритмических препаратов III класса, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Электрокардиографические показатели пациентов на фоне приема антиаритмической терапии (Me (25%;75%))

Параметры	Группа «СУИ QT с TdP» (n=17)	Группа «СУИ QT без TdP» (n=47)	Группа «Без СУИ QT» (n=46)
Показатели реполяризации миокарда желудочков			
Продолжительность интервала QTc (Bazett), мс	509,7 (479; 542)#*	474,4 (458; 488)*	411,9 (396; 427)
Дисперсия интервала QT, мс	83,6 (59; 98)*	69,7 (58; 82)*	60,9 (50; 72)
Продолжительность интервала JTc (Bazett), мс	427,9 (395; 462)#*	388,1 (372; 398)*	321,1 (306; 337)
Дисперсия интервала JT, мс	77,2 (52; 90)*	65,3 (54; 75)*	56,9 (46; 67)
Продолжительность интервала T peak – T end, мс	131,4 (113; 147)*	123,1 (113; 135)*	98,7 (91; 107)
Дисперсия интервала T peak – T end	35,3 (30; 40)*	31,9 (20; 40)*	19,3 (10; 27,5)
Соотношение интервала T peak – T end / QT	0,26 (0,25; 0,29)*	0,27 (0,25; 0,29)*	0,24 (0,22; 0,25)

Окончание таблицы 1

Показатели деполяризации миокарда желудочков			
Продолжительность комплекса QRS, мс	82,3 (80; 90)	86,3 (80; 90)	85,4 (80; 90)
Фрагментация комплекса QRS, n (%)	7 (41,2%)#*	7 (14,9%)	3 (6,5%)
Показатели баланса деполяризации и реполяризации миокарда желудочков			
Индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QT/QRS)	6,26 (5,88; 6,86)#*	5,54 (5,22; 5,65)*	4,76 (4,41; 5,08)
Корригированный индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QTc/QRS)	6,24 (5,99; 6,55)#*	5,54 (5,14; 5,78)*	4,56 (4,31; 4,84)

Примечание: # – значение $p < 0,05$ по сравнению с группой «СУИ QT без TdP», * – значение $p < 0,05$ по сравнению с группой «Без СУИ QT»

Проведенный статистический анализ продемонстрировал выраженные различия в значениях большинства электрокардиографических показателей между пациентами с наличием лекарственно-индуцированного удлинения интервала QT и без его наличия. При сопоставлении показателей, характеризующих реполяризацию миокарда желудочков, было установлено, что у пациентов с ЖТ типа «пируэт» отмечалась достоверно большая продолжительность интервала QT ($p=0,03$), а также продолжительность интервалов QTc и JTc ($p < 0,001$). Обращала на себя внимание тенденция к большим значениям дисперсии интервалов QT и JT, однако не достигавшим критериев статистической значимости.

У пациентов с ЖТ типа «пируэт» также отмечалась тенденция к более высоким значениям дисперсии интервала T peak – T end ($p=0,06$), однако значения продолжительности интервала T peak – T end и его отношения к продолжительности интервала QT были сопоставимы. Значения показателей баланса деполяризации и реполяризации миокарда желудочков (iCEB и iCEBc) были значительно выше у пациентов с ЖТ типа «пируэт» ($p < 0,001$).

При проведении однофакторного ROC-анализа были выявлены пороговые значения электрокардиографических показателей, ассоциированные с развитием ЖТ типа «пируэт» (табл. 2).

Таблица 2

Результаты однофакторного ROC-анализа

Показатели	Пороговое значение	AUC	ДИ 95 %	Se, %	Sp, %	ППЗ, %	ОПЗ, %
Продолжительность корригированного интервала QT (Bazett), мс	474,7	0,884	[0,77-0,99]	82,3	80,6	44,8	95,1
Продолжительность корригированного интервала JT (Bazett), мс	388,3	0,908	[0,81-1]	88,2	79,6	49,7	96,6
Дисперсия интервала QT, мс	87	0,683	[0,53-0,83]	47,1	93	57,1	91,2
Дисперсия интервала JT, мс	84	0,681	[0,53-0,83]	52,9	86	42,8	91,7
Индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QT/QRS)	5,75	0,889	[0,78-0,99]	88,2	87,1	57,7	97,6
Корригированный индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QTc/QRS)	5,81	0,901	[0,80-1,0]	94,1	84,9	57,1	98,7

Сокращения: AUC – площадь под кривой; ДИ – доверительный интервал; Se – чувствительность; Sp – специфичность; ППЗ – положительная прогностическая значимость; ОПЗ – отрицательная прогностическая значимость.

Самую большую площадь под ROC-кривой (0,908) из всех исследованных электрокардиографических показателей имело значение корригированного интервала JT $\geq 388,3$ мс (таблица 6). Наибольшую специфичность (93%), однако самую низкую чувствительность (47,1%) имел показатель дисперсии интервала QT ≥ 87 мс. Следует отметить, что значение iCEBc $\geq 5,81$ продемонстрировало самую высокую чувствительность (94,1%), а также довольно высокую специфичность (84,9%) и площадь под ROC-кривой (0,901).

Прогностическая значимость исследованных электрокардиографических показателей в отношении развития ЖТ типа «пируэт» представлена в табл. 3.

Таблица 3

Прогностическая значимость электрокардиографических показателей в отношении развития ЖТ типа «пируэт»

Показатели	Отношение шансов	95% ДИ
Продолжительность скорректированного интервала QT (Bazett) > 474,67 мс	4,444	2,647-7,461
Продолжительность скорректированного интервала JT (Bazett) > 376,67 мс	3,567	2,404-5,295
Корректированный индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QTc/QRS) > 5,85	6,459	4,171-10,343
Индекс кардиоэлектрофизиологического баланса (QT/QRS) > 5,75	7,294	4,245-11,532
Дисперсия интервала QT > 87 мс	4,706	2,609-10,210
Дисперсия интервала JT > 76 мс	4,412	2,202-8,837

Сокращения: ДИ – доверительный интервал.

Согласно полученным данным, самым информативным предиктором ЖТ типа «пируэт» является значение iCEVc более 5,81 (ОШ=7,294, 95%ДИ [4,245-11,532]).

Заключение

У пациентов с ЖТ типа «пируэт» на фоне лекарственно-индуцированного удлинения интервала QT отмечались более высокие значения продолжительности скорректированного интервала QT и JT, дисперсии интервалов QT и JT, а также индекса кардиоэлектрофизиологического баланса и скорректированного индекса кардиоэлектрофизиологического баланса. Самым информативным предиктором ЖТ типа «пируэт» является значение скорректированного индекса кардиоэлектрофизиологического баланса $\geq 5,81$ (ОШ=7,294, 95%ДИ [4,245-11,532]). С учетом полученных нами результатов значение индекса кардиоэлектрофизиологического баланса $\geq 5,81$ может использоваться для прогнозирования возникновения ЖТ типа «пируэт» в дополнение к существующим электрокардиографическим показателям. Принимая во внимание небольшой размер исследуемой выборки пациентов, возможность применения данного показателя требует проверки на более многочисленной группе пациентов, с учетом проводимой фармакотерапии и структурной патологии сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tester D.J., Ackerman M.J. Genetics of long QT syndrome // *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2014. Vol. 10, № 1. P. 29–33.
2. Rohatgi R.K., Sugrue A., Bos J.M. et al. Contemporary outcomes in patients with Long QT Syndrome // *J Am Coll Cardiol*. 2017. Vol. 70, № 4. P. 453–462. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.046.
3. Etchegoyen C.V., Keller G.A., Mrad S. et al. Drug-induced QT Interval Prolongation in the Intensive Care Unit // *Curr Clin Pharmacol*. 2017. Vol. 12, № 4. P. 210–222. doi: 10.2174/15748847136661802231239.
4. Колоцей Л.В. Методологические подходы к измерению и оценке длительности интервала QT стандартной электрокардиограммы / Л.В. Колоцей, В.А. Снежицкий // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2019. Т.17, №1. С. 99–105. doi: 10.25298/2221-8785-2019-17-1-99-105

КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ДОКАЗАННУЮ ПНЕВМОНИЮ COVID-19, ЧЕРЕЗ 3 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ВЫПИСКИ ИЗ СТАЦИОНАРА

**И.О. Коровина¹, Е.А. Горбатенко², Е.П. Гулятьева², В.Д. Гаранина²,
Н.А. Осокина², А.В. Мигачева², Е.И. Ярославская²**

ГБУЗ ТО «ОКБ № 1», Тюмень, Россия¹

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Тюмень, Россия²

Аннотация

Изучены клинические показатели 369 пациентов, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через 3 мес после выписки из стационара (средний возраст 52±11 лет, 50,9% женщин). Выявлено наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у 73,4%. Ожирение демонстрировали 46,5%, артериальную гипертонию – 71,5%, ишемическую болезнь сердца – 22,5%. Признаки хронической сердечной недостаточности выявлены у 49,1% пациентов, нарушения сердечного ритма и проводимости – у 19,8%,

сахарный диабет – у 11,6%. Данному контингенту требуется тщательное наблюдение для профилактики прогрессирующего имеющегося и развития новых ССЗ, а также для своевременного их выявления.

Ключевые слова: COVID-19, пневмония, сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертония.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH PROVEN COVID-19 PNEUMONIA 3 MONTHS AFTER HOSPITAL DISCHARGE

I.O. Korovina, E.A. Gorbatenko, E.P. Gulyaeva, V.D. Garanina,
N.A. Osokina, A.V. Migacheva, E.I. Yaroslavskaya

Tyumen Regional Clinical Hospital No. 1, Tyumen, Russia¹
Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia²

Abstract

We studied the clinical parameters of 369 patients with proven COVID-19 pneumonia 3 months after discharge from the hospital (mean age 52±11 years, 50.9% of women. Cardiovascular disease (CVD) was detected in 73.4%. Obesity demonstrated 46.5%, arterial hypertension - 71.5%, coronary heart disease - 22.5%. Chronic heart failure was detected in 49.1% of patients, cardiac arrhythmias and conduction disturbances - in 19.8%, diabetes mellitus - in 11.6%. This contingent requires careful monitoring to prevent the progression of existing and the development of new CVD, as well as for their timely diagnostics.

Key words: COVID-19, pneumonia, cardiovascular diseases, arterial hypertension.

Актуальность. Новая коронавирусная инфекция поражает не только дыхательную, но и сердечно-сосудистую систему. Изучение сердечно-сосудистого статуса перенесших осложненное течение COVID-19 после выписки из стационара необходимо как для разработки оптимальных тактик лечения и реабилитации, так и для прогнозирования последствий пандемии.

Цель исследования – изучить клинические показатели лиц, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через 3 мес после выписки из стационара.

Материал и методы

Исследование представляет собой первый этап «Проспективного наблюдения пациентов, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию», соответствует стандартам клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинкской декларации (протокол одобрен локальным этическим комитетом – № 159 от 23.07.2020), зарегистрирован в международном реестре клинических исследований Национального института здоровья США (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04501822). Пациенты идентифицированы по данным медицинской информационной системы ИС моноинфекционного госпиталя с апреля 2020 г. по июль 2021 г. Критерии включения: документированный диагноз COVID-19-ассоциированной пневмонии и желание пациента участвовать в наблюдении. Критерии невключения: хронические заболевания в стадии обострения; в анамнезе онкологические заболевания длительностью менее 5 лет, туберкулез и другие заболевания, сопровождающиеся пневмофиброзом; ВИЧ; гемодинамически значимые пороки сердца, хронические гепатиты. В исследование включено 380 пациентов, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через 3 мес±3 нед после выписки из стационара, в возрасте от 19 до 84 лет (средний возраст 52±11 лет), из которых 188 (50,9%) женщин. Критерии исключения: неудовлетворительная визуализация при ЭхоКГ; кардиомиопатии; беременность; выявленные за период наблюдения онкологические заболевания; отказ от участия. Исключены 11 пациентов: 3 по беременности, 1 – в связи с неудовлетворительной визуализацией при ЭхоКГ, 1 – в связи с выявленным по данным компьютерной томографии (КТ) «сотовым» легким, 4 отказались от участия в связи с нежеланием проходить КТ легких в динамике, 2 – в связи с отъездом на работу в другой регион. Проанализированы данные оставшихся 369 пациентов.

Изучены результаты обследования в госпитальном периоде, содержащиеся в выписках

из историй заболевания. В госпитализации тяжесть поражения легких оценивалась в соответствии с рекомендациями [1], проанализирован максимальный объем поражения легких. Все результаты обследования внесены в электронную базу данных (свидетельство о государственной регистрации № 2021622535 от 18.11.2021).

Статистический анализ проводился с помощью пакета прикладных программ SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) и Statistica 12.0. Распределение переменных оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении количественных данных показатели представлены в виде среднего±стандартное отклонение ($M\pm SD$), в случае распределения отличного от нормального – в виде медианного значения (Me) и интерквартильного размаха в 25 и 75 перцентилей [25;75]. Сравнение показателей между группами проводили в зависимости от распределения количественных данных критерием Стьюдента для независимых групп или критерием Манн–Уитни. Различия между категориальными переменными оценивали критерием χ -квадрат. Результаты считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Средний возраст обследованных составил 52 ± 11 (от 18 до 84 лет) лет, из них 51% женщин. Большинство пациентов русские (74%), остальные национальности представлены татарами (7%), украинцами (3%), азербайджанцами и армянами (2%), были также белорусы, казахи, киргизы, немцы, молдаване, чеченцы, чуваша. Все обследуемые являются жителями Тюменского региона, из них 90% проживают в г. Тюмени, пенсионеров 19%. По данным КТ легких при госпитализации поражения легкой степени отмечались у 15,6% пациентов, среднетяжелые – у 33,1%, тяжелые – у 39,4%, критические – у 11,9%. Средний процент поражения легочной ткани при госпитализации составил 52% [32; 64]. Лечению в отделениях реанимации и интенсивной терапии подверглись 10,5% пациентов.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) диагностированы у 73,4% обследуемых, в том числе артериальная гипертония (АГ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), хроническая сердечная недостаточность (ХСН), нарушения сердечного ритма и проводимости. Самую высокую распространенность имела АГ (71,5%). Чаще регистрировали АГ 2 и 3-й степени – по 41,2%, реже – 1-й степени (17,6%). Ишемическая болезнь сердца (ИБС) встречалась у 22,5% обследуемых, причем у большинства этих больных ИБС сопровождалась АГ (у 21%). Инфаркт миокарда в анамнезе имели 20 пациентов (5,4%). Признаки ХСН выявлены у 49,1% пациентов. Из них I функциональный класс (ФК) ХСН по классификации NYHA демонстрировали 30,4% пациентов, ФК II – 16,8%, ФК III – 4,9%. У 19,8% пациентов выявлены нарушения сердечного ритма и проводимости, к ним относили синусовые аритмии, экстрасистолию, фибрилляцию и трепетание предсердий, внутрисердечные блокады. Распространенность нарушений гликемического профиля составила 14,4%, из них большинство (11,6%) представлено сахарным диабетом (СД) 2-го типа, нарушения гликемии натощак – у 8 пациентов (2,2%). Ожирение выявлено у 46,5% лиц, избыточный вес – у 34%.

Обсуждение

Полученные нами данные говорят о высокой распространенности ССЗ среди перенесших пневмонию COVID-19 через 3 мес после выписки из стационара. По данным евразийского регистра АКТИВ, объединившего 9 тыс. пациентов из 7 стран постсоветского пространства (их средний возраст старше, чем у пациентов нашего исследования, – 63 года, но тяжесть поражения легких по данным КТ в ходе госпитализации сопоставима), частота ССЗ практически та же, за исключением частоты выявления сахарного диабета (у наших пациентов она ниже) и хронической сердечной недостаточности [2] (у пациентов нашего исследования она выше). Планируется продолжение исследования в динамике с проведением субгруппового анализа для выявления предикторов развития новых ССЗ с учетом тяжести перенесенного заболевания, влияния проводимого в остром периоде заболевания лечения и пр.

Выводы

По данным проспективного наблюдения 369 пациентов, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию, через 3 мес после выписки из стационара выявлено наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у 73,4%. Ожирение демонстрировали 46,5%, артериальную гипертонию – 71,5%, ишемическую болезнь сердца – 22,5%. Признаки хронической сердечной недостаточности выявлены у 49,1% пациентов, нарушения сердечного ритма и проводимости – у 19,8%, сахарный диабет – у 11,6%. Данному контингенту требуется тщательное наблюдение для профилактики прогрессирования имеющихся и развития новых ССЗ, а также для своевременного их выявления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лучевая диагностика коронавирусной болезни (COVID-19): организация, методология, интерпретация результатов: препринт № ЦДТ - 2020 - I / сост. С. П. Морозов, Д. Н. Проценко, С. В. Сметанина [и др.] // Серия «Лучшие практики лучевой и инструментальной диагностики». Вып. 65. М.: ГБУЗ «НПКЦ ДиТ ДЗМ», 2020 – 60 с.
2. Arutyunov G.P., Tarlovskaya E.I., Arutyunov A.G., Belenkov Yu.N., Konradi A.O., Lopatin Yu.M. et al. International register «Analysis of Chronic Non-infectious Diseases Dynamics After COVID-19 Infection in Adult Patients (ACTIV SARS-CoV-2)». *Kardiologiya*. 2020;60(11):31-34.

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ДОКАЗАННУЮ ПНЕВМОНИЮ COVID-19, ПОСЛЕ ВЫПИСКИ ИЗ СТАЦИОНАРА (ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ГОДИЧНОГО НАБЛЮДЕНИЯ)

**А.В. Мигачева¹, Д.В. Криночкин¹, Н.Е. Широков¹, Е.А. Горбатенко¹,
Е.П. Гультяева¹, И.О. Коровина², В.Д. Гаранина¹, Н.А. Осокина¹,
Е.И. Ярославская¹**

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Тюмень, Российская Федерация¹
ГБУЗ ТО «ОКБ N 1», Тюмень, Россия²

Аннотация

При сравнении клинических и эхокардиографических показателей 116 пациентов, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через год после выписки из стационара в зависимости от величины глобальной продольной деформации левого желудочка (LV GLS) выявлено снижение LV GLS при сохранной фракции выброса левого желудочка (ЛЖ). Требуется тщательное наблюдение для профилактики развития или своевременного выявления в будущем таких состояний, как сердечная недостаточность, дисфункция ЛЖ или аритмия. Механизм развития нарушений LV GLS в отдаленном периоде после COVID-19 остается предметом последующего изучения.

Ключевые слова: COVID-19, пневмония, сердечно-сосудистые заболевания, эхокардиография, деформация миокарда, стрейн.

CLINICAL AND ECHOCARDIOGRAPHIC PARAMETERS OF PATIENTS WITH PROVEN COVID-19 PNEUMONIA AFTER HOSPITAL DISCHARGE (FIRST RESULTS OF A YEAR OBSERVATION)

**A.V. Migacheva¹, D.V. Krinochkin¹, N.E. Shirokov¹, E.A. Gorbatenko¹,
E.P. Gultyayeva¹, I.O. Korovina², V.D. Garanina¹, N.A. Osokina¹,
E.I. Yaroslavskaya¹**

Tyumen cardiology research center, Tomsk national research medical center,
Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia¹
GBUZ TO «OKB N 1», Tyumen²

Abstract

Comparison of clinical and echocardiographic parameters of 116 patients who have had proven COVID-19 pneumonia, a year after discharge from the hospital, depending on the value of the global longitudinal deformation of the left ventricle (LV GLS), a decrease in LV GLS was revealed in patients with preserved LV ejection fraction. Careful monitoring is required to prevent the development or timely detect of conditions such as heart failure, LV dysfunction or arrhythmia. The mechanism of development of LV GLS disorders in the long-term period after COVID-19 remains the subject of further study.

Key words: COVID-19, pneumonia, cardiovascular diseases, echocardiography, myocardial deformity, strain.

Цель исследования – сравнить клинические и эхокардиографические показатели лиц, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через год после выписки из стационара в зависимости от величины глобальной продольной деформации левого желудочка (LV GLS).

Материал и методы

Исследование представляет собой промежуточный этап «Проспективного наблюдения пациентов, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию», соответствует стандартам клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинкской декларации (протокол одобрен локальным этическим комитетом – № 159 от 23.07.2020), зарегистрирован в международном реестре клинических исследований Национального института здоровья США (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04501822). Пациенты идентифицировались по данным медицинской информационной системы IC моноинфекционного госпиталя в период с апреля 2020 г. по июль 2021 г. Критериями включения были: документированный диагноз COVID-19-ассоциированной пневмонии и желание пациента участвовать в наблюдении. В исследование включено 116 пациентов, перенесших доказанную пневмонию COVID-19, через 3 мес±2 нед после выписки из стационара, в возрасте от 19 до 84 лет (средний возраст 49±14,4 года), из которых 50,4% мужчины. В период госпитализации, по данным компьютерной томографии легких (КТ), у 31,3% пациентов отмечались поражения легкой степени, среднетяжелые – у 33,3%, тяжелые – у 29,3%, критические – у 6,1%. Всем обследуемым проводилась ЭхоКГ. Параметры глобальной и сегментарной продольной миокардиальной деформации ЛЖ изучены у 80 обследованных с оптимальным качеством визуализации. В группу 1 с нормальным LV GLS (-20% и менее) вошло 35 человек, в группу 2 с нарушенным LV GLS (более -20%) – 45 человек.

Результаты

В группе 2 чаще диагностировали ишемическую болезнь сердца (ИБС), в том числе в сочетании с АГ. Разрешение симптомов пневмонии по данным КТ наблюдалось у большинства группы 1 и немногим более чем у половины пациентов группы 2, статистической значимости различия по этому признаку группы не показали. Нарушение LV GLS через год после выписки выявлено у 57,5% из 80 пациентов с оптимальным качеством визуализации, при этом фракция выброса ЛЖ на обоих визитах у всех пациентов исследования была нормальной. В группе 2 преобладали мужчины (71,1% против 28,6%, $p < 0,001$), также в этой группе чаще диагностировали сочетание ишемической болезни сердца (ИБС) и артериальной гипертензии (АГ) (22% против 6%, $p = 0,040$). При ЭхоКГ не было значимых межгрупповых различий по фракции выброса ЛЖ, однако LV GLS был значимо хуже в группе 2 ($-17,6 \pm 1,9\%$ против $-21,8 \pm 1,2\%$, $p < 0,001$). В группе 2 были хуже и параметры диастолической функции – меньше индекс объема опорожнения ЛП ($1,3 \pm 0,3$ мл/м² против $1,4 \pm 0,3$ мл/м², $p = 0,052$) и ниже скорость латеральной части ФК МК e' ($10,8 \pm 4,4$ см/с против $12,8 \pm 4,0$ см/с, $p = 0,045$). Группа 2 отличалась и худшими структурно-функциональными параметрами ПЖ: его площадь, поперечные размеры и индексы сферичности были больше, а фракция изменения площади ПЖ ($53,3 \pm 9,3\%$ против $57,7 \pm 8,3\%$, $p = 0,031$) и скорость S' трикуспидального кольца ниже, чем в группе 1 ($11,5 \pm 2,2$ см/с против $12,9 \pm 2,4$ см/с, $p = 0,008$). При оценке правых отделов сердца в группе 2 были выявлены структурные отличия ПЖ: площадь, поперечные размеры и индексы сферичности ПЖ были больше, чем в группе 1. При этом и показатели систолической функции ПЖ группы 2 были хуже, что выражалось в более низкой фракции изменения площади ПЖ и более низкой скорости S' трикуспидального кольца. Показатели диастолической функции ЛЖ в группе 2 также были хуже, о чем говорят меньший объем опорожнения ЛП и более низкая скорость ФК МК e' . Интеграл линейной скорости потока в ВТ ЛЖ, отражающий его насосную функцию, также был ниже в группе 2 в сравнении с группой 1. Несмотря на то, что в этой группе индексы КДР и длины ЛЖ были меньше, значимых различий по ФВ ЛЖ мы не получили.

Согласно данным магнитно-резонансной томографии (МРТ), частота снижения показателя общей продольной деформации у реконвалесцентов после COVID-19 увеличивается с 2% менее 3 мес от окончания заболевания до 30% в период от 3 до 6 мес [1]. Аналогичные цифры были получены S. Mahajan et al. при трансторакальной ЭхоКГ через 1–1,5 мес после выписки: снижение LV GLS наблюдалось у 29,9% со средним значением $-19,7 \pm 4,6\%$ [2]. По нашим результатам, частота снижения глобальной продольной деформации ЛЖ в отдаленные сроки после заболевания составила 57,5%, что значительно превышает данные, полученные S. Mahajan et al., а также частоту ухудшения LV GLS при МРТ [1]. Однако следует отметить, что такое сравнение является достаточно грубым – и в силу низкой сопоставимости клинических характеристик пациентов (не у всех наблюдаемых S. Mahajan et al. течение COVID-19

было симптомным, тогда как все наши пациенты прошли стационарное лечение и имели подтвержденный диагноз пневмонии), и из-за разных сроков наблюдения после заболевания (в работе S. Mahajan et al. – через 1–3 мес, в нашем исследовании – через 12 мес).

Среднее значение LV GLS у наших пациентов (общая группа до разделения) через 3 мес после выписки составило $-20,3 \pm 2,2\%$ [3]. В наблюдении китайских коллег у 46 перенесших COVID-19 пациентов значение LV GLS в те же сроки после выписки составило $-26,6 \pm 4,4\%$ [4], что выше полученного нами, несмотря на более старший возраст китайских пациентов (59 ± 13 лет) и более частое их нахождение в ОРИТ (18,9%). Возможно, свой вклад в различия между нашими исследованиями внесли разные вендоры – коллеги пользовались системой Philips Medical Systems, Andover, MA, USA.

Среднее значение LV GLS у наших пациентов (общая группа до разделения) значительно ухудшилось через год после выписки в сравнении с данными обследования через 3 мес после выписки ($-20,3 \pm 2,2\%$ против $-19,4 \pm 2,7\%$, $p=0,001$) [3]. Когортное проспективное наблюдение ECHOVID-19 92 пациентов MCH Lassen et al. через 2 мес после госпитализации в сравнении с госпитальными данными не выявило значимого улучшения показателя LV GLS ($-17,4 \pm 2,9\%$ vs. $-17,6 \pm 3,3\%$, $p=0,6$) [5]. Это хуже величины, полученной нами через 3 мес после выписки. Пациентам, у которых даже через год после перенесенной пневмонии выявлено снижение LV GLS при сохранной ФВ ЛЖ, требуется тщательное наблюдение для профилактики развития или своевременного выявления в будущем таких состояний, как сердечная недостаточность, дисфункция ЛЖ или аритмия.

Полученные данные говорят о необходимости дальнейшего изучения влияния пневмонии COVID-19 на состояние сердечно-сосудистой системы переболевших. Планируется продолжение исследования с увеличением числа наблюдений, проведением субгруппового анализа для выявления предикторов нарушения деформационных свойств миокарда с учетом проводимого в остром периоде заболевания лечения, влияния сопутствующих ССЗ и пр.

Выводы

Скрытая систолическая дисфункция миокарда в виде нарушения LV GLS через год после перенесенной пневмонии COVID-19 выявлена у 57,5% лиц с нормальной фракцией выброса ЛЖ. В группе с нарушением LV GLS преобладали мужчины, чаще выявлялась ИБС в сочетании с АГ. Показатели диастолической функции ЛЖ и систолической функции ЛЖ в этой группе были хуже в сравнении с группой с нормальным LV GLS. Механизм развития нарушений LV GLS в отдаленном периоде после COVID-19 остается предметом последующего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramadan M.S., Bertolino L., Zampino R., Durante-Mangoni E. Monaldi Hospital Cardiovascular Infection Study Group. Cardiac sequelae after coronavirus disease 2019 recovery: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27(9): 1250–1261. DOI:10.1016/j.cmi.2021.06.015.
2. Mahajan S., Kunal S., Shah B., Garg S., Palleda G.M., Bansal A. et al. Left ventricular global longitudinal strain in COVID-19 recovered patients // *Echocardiography.* 2021; 38:1722–1730. DOI:10.1111/echo.15199.
3. Yaroslavskaya E.I., Krinochkin D.V., Shirokov N.E., Gorbatenko E.A., Krinochkina I.R., Gulyaeva E.P. et al. Comparison of clinical and echocardiographic parameters of patients with pneumonia COVID-19 three months and one year after discharge. *Cardiology.* Accepted for publication. (In Russ.) Ярославская Е.И., Криночкин Д.В., Широков Н.Е., Горбатенко Е.А., Криночкина И.Р., Гульяева Е.П. и др. Сравнение клинических и эхокардиографических показателей пациентов, перенесших пневмонию COVID-19, через три месяца и через год после выписки. *Кардиология.*
4. Xie Y., Wang L., Li M., Li H., Zhu S., Wang B. et al. Biventricular Longitudinal Strain Predict Mortality in COVID-19 Patients. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. DOI:10.3389/fcvm.2020.632434.
5. Lassen M.C.H., Skaarup K.G., Lind J.N., Alhakak A.S., Sengelov M., Nielsen A.B. et al. Recovery of cardiac function following COVID-19 - ECHOVID-19: a prospective longitudinal cohort study. *Eur J Heart Fail.* 2021; 23(11):1903–1912. DOI: 10.1002/ejhf.2347.

ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

В.Р. Миминошвили

Государственная образовательная организация высшего профессионального образования
«Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»,
г. Донецк, Украина, ДНР

Аннотация

Сонографические изменения у мужчин характеризовались статистически значимой дилатацией левого предсердия и более низкими показателями, чем у женщин, отражающими систолическую функцию левого желудочка. У женщин, напротив, морфологические нарушения характеризовались преобладанием гипертрофических процессов. Гендерные различия характеризовались достоверным преобладанием у женщин сонографических признаков уплотнения митрального и аортального клапанов, гипертрофии и диастолической дисфункции. У мужчин преобладающими нарушениями явились выраженность митральной регургитации, дилатация левого предсердия, систолическая дисфункция левого желудочка и наличие зон акинеза.

Ключевые слова: гендерные различия, морфофункциональное состояние сердца, сахарный диабет 2-го типа.

GENDER DIFFERENCES IN THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE HEART IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

V.R. Miminoshvili

State educational organization of higher professional education
«Donetsk National Medical University them. M. Gorky», Donetsk, Ukraine, DPR

Annotation

In men, in contrast to women, the clinical manifestations of myocardial dysfunction of the left ventricle were significantly revealed, and the anamnetically, they arose before the primary diagnosis of diabetes. The frequency of their men twice was superior to the female sample, which indicates the accelerated development of heart failure among male representatives. Sonographic changes in men were characterized by statistically significant dilatation of the left atrium and lower indicators reflecting the systolic function of the left ventricle. In women, on the contrary, morphological disorders were characterized by the predominance of hypertrophic processes. Gender differences were characterized by a reliable predominance in women echo-signs of sealing of mitral and aortic valves, hypertrophy and diastolic dysfunction. In men, the prevailing disorders were the severity of mitral regurgitation, the dilatation of the left atrium, systolic dysfunction of the left ventricle, and the presence of akinease zones.

Key words: gender differences, morphofunctional state of the heart, type 2 diabetes mellitus.

Актуальность. Сахарный диабет 2-го типа (СД 2-го типа) является ведущим метаболическим фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. В структуре смертности пациентов с СД 2-го типа доминируют сердечно-сосудистые причины, при чем около 50 % смертей приходится на внезапную аритмическую смерть [3]. Формирование диабетической автономной нейропатии, диабетической хронической болезни почек, гиперкоагуляции и повышенного риска тромбообразования, обструктивного апноэ сна, эндотелиальной дисфункции и вазоконстрикции, воздействие некоторых классов лекарственных препаратов, в том числе и гипогликемических, определяют сложность и комплексность механизмов кардиальной патологии у такой категории больных [4].

Изучение гендерных механизмов формирования дисфункции миокарда в условиях метаболических нарушений является актуальным направлением исследований в современной кардиодиабетологии. С одной стороны, это обусловлено стремительным увеличением распространенности такой патологии в популяции, а с другой – появлением новой информации о половых различиях течения, а также особенностях лечения и прогноза диабетических пациентов [5].

Цель исследования – анализ гендерных особенностей морфофункционального состояния сердца у больных СД 2-го типа.

Материал и методы

В исследование включены 70 пациентов СД 2-го типа (42 мужчины и 28 женщин) в возрасте $43,7 \pm 0,5$ лет с длительностью заболевания $4,2 \pm 0,16$ года.

Критериями включения в исследование были: СД 2-го типа с инсулинрезистентностью (индекс НОМА>2,77) и гиперинсулинемией, среднетяжелое течение диабета, метаболический синдром, миокардиальная дисфункция вследствие хронических форм ИБС и/или перенесенного в анамнезе инфаркта миокарда.

Верификацию диабета проводили в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по СД (1999 г.) и Российскими клиническими рекомендациями по диагностике и лечению диабета (2015).

Сонографическое исследование сердца проводили при помощи универсального сонографа «Sonoscape S22» фирмы «Sonoscape Co», Китай, из трансторакального доступа по стандартной методике.

Статистическая обработка результатов проведена при помощи программы Statistica for Windows, Release 6.5 StatSoft, Inc. Нормальность распределения оценивали в тесте Колмогоров-Смирнова. Достоверность различий одноименных количественных показателей у представителей разного пола при нормальном распределении оценивалось при помощи парного t-критерия. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

При анализе морфофункционального состояния сердца у представителей разного пола оказалось, что у женщин толщина межжелудочковой перегородки в диастолу (МЖПд) и задней стенки левого желудочка в диастолу (ЗСЛЖд) статистически достоверно ($p < 0,05$) превосходила аналогичные показатели у мужчин (таблица).

Таблица 1

Показатели морфофункционального состояния сердца у больных СД 2-го типа разного пола (M±m)

Показатели	Пол	
	мужчины (n=42)	женщины (n=28)
МЖПд, см	1,39±0,02	1,44±0,03*
ЗСЛЖд, см	1,79±0,01	1,86±0,02*
ЛПр, см	4,26±0,08	4,12±0,03*
ΔS ЛЖ, %	26,0±1,20	29,5±1,18*
КСО, мл	59,14±2,19	56,02±2,10*
КДО, мл	132,7±2,24	129,2±2,30*
УО, мл	75,43±2,29	78,70±2,06*
ФВ, %	59,19±1,28	65,14±1,27*

Примечание: *различия аналогичных показателей у мужчин и женщин статистически достоверны.

Напротив, у мужчин размеры левого предсердия (ЛПр) были достоверно ($p < 0,05$) больше, а степень укорочения передне-заднего размера левого желудочка в систолу (ΔS ЛЖ) - меньше, чем у женщин. У мужчин конечносистолический и конечнодиастолический объемы (КСО и КДО соответственно) оказались достоверно ($p < 0,05$) больше, чем у женщин. Напротив, ударный объем левого желудочка (УО) и фракция его выброса (ФВ) в мужской категории достоверно ($p < 0,05$) уступали женской. Гендерные различия также касались и наличия, и степени выраженности уплотнения митрального и аортального клапанов, тяжести митральной регургитации и выраженности гипертрофии, левопредсердной дилатации, нарушений систолических и диастолических характеристик левого желудочка, а также акинетических постинфарктных изменений.

Выводы

Сонографические изменения у мужчин характеризовались статистически значимой по сравнению с женщинами дилатацией левого предсердия и более низкими показателями, отражающими систолическую функцию левого желудочка (УО, ФВ, ΔS). У женщин, напротив, морфофункциональные нарушения характеризовались преобладанием гипертрофических процессов левого желудочка.

Гендерные различия также касались достоверного преобладания у женщин ЭхоКГ-признаков уплотнения митрального и аортального клапанов, гипертрофии ЗСЛЖд и МЖПд и диастолической дисфункции. У мужчин преобладающими нарушениями явились выраженность митральной регургитации, дилатация левого предсердия, систолическая дисфункция левого желудочка и наличие зон акинеза (постинфарктный кардиосклероз и/или зоны гибернирующего миокарда).

ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: учеб. пос. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1032 с.
2. Dimitropoulos G., Tahrani A.A., Stevens M.J. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus // World J. Diabetes. 2014. Vol. 15. P. 17–39.
3. Mahajan R., Lau D.H., Brooks A.G. et al. Electrophysiological, electroanatomical and structural remodeling of the atria as consequences of sustained obesity // J. Am. Coll. Cardiol. 2015. V.66. P. 1–11.
4. Tan Yi., Zhang Z., Zheng Ch. et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence // Nat. Rev. Cardiol. 2021. V.2. P. 11–13.
5. Anderson E.J., Kypson A.P., Rodriguez E. et al. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart // J. Am. Coll. Cardiol. 2009. V.54. P. 1891–1898.

СКРЫТАЯ СИСТОЛИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ЧЕРЕЗ 3 МЕСЯЦА ПОСЛЕ COVID-19-ПНЕВМОНИИ

Н.А. Осокина, Н.Е. Широков, Д.В. Крinochkin, Е.И. Ярославская

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Аннотация

В исследование были включены 60 пациентов молодого возраста ($23,6 \pm 4,1$ года): 30 лиц, перенесших COVID-19-пневмонию 3 мес назад (I группа) и 30 человек, не переносивших COVID-19 (II группа). При эхокардиографии в I группе были выявлены достоверно меньшие параметры продольной эндокардиальной деформации правого желудочка (ПЖ) ($20,8 \pm 3,5\%$ и $23,1 \pm 2,8\%$; $p=0,014$) и продольной эндокардиальной деформации свободной стенки правого желудочка ($22,0 \pm 3,8\%$ и $24,3 \pm 2,8\%$; $p=0,018$), последние не достигающие референсных значений. Таким образом, нами выявлена скрытая систолическая дисфункция ПЖ у молодых пациентов, перенесших пневмонию COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, метод отслеживания деформации пятна.

HIDDEN SYSTOLIC RIGHT VENTRICLE DYSFUNCTION IN YOUNG PATIENTS 3 MONTHS AFTER COVID-19 PNEUMONIA

N.A. Osokina, N.E. Shirokov, D.V. Krinochkin, E.I. Yaroslavskaya

Tyumen Cardiology Science Center, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences

Abstract

60 young people were included in the study (23.6 ± 4.1 years). Among them 30 patients were examined 3 months after COVID-19 pneumonia (I group) and 30 people who did not suffered COVID-19 (II group). Echocardiography in group I revealed smaller parameters of the right ventricle (RV) endocardial longitudinal strain ($20.8 \pm 3.5\%$ vs $23.1 \pm 2.8\%$; $p=0.014$) and the right ventricle free wall endocardial strain (RV FWS) ($22.0 \pm 3.8\%$ vs $24.3 \pm 2.8\%$; $p=0.018$), which did not reach normal values. Hidden systolic dysfunction RV was revealed by STE in young patients 3 months after COVID-19 pneumonia.

Key words: COVID-19, speckle tracking echocardiography.

Актуальность. Летальность от COVID-19 среди лиц старше 30 лет возрастает с увеличением возраста. Однако продемонстрировано нетяжелое течение заболевания у большинства подростков и молодых взрослых за период госпитализации [1]. При этом у части спортсменов молодого возраста, перенесших COVID-19 в амбулаторных условиях, по данным МРТ выявлялся миокардит [2].

Цель – исследовать контрактильную функцию правого желудочка (ПЖ) у лиц молодого возраста при помощи эхокардиографии в зависимости от наличия в анамнезе перенесенной COVID-19-пневмонии.

Материал и методы

В одномоментное обсервационное исследование были включены 60 пациентов молодого возраста ($23,6 \pm 4,1$ года): 30 лиц, перенесших COVID-19-пневмонию, через 3 мес после по-

лучения двух отрицательных результатов теста полимеразной цепной реакции (I группа) и 30 человек, не переносивших COVID-19 (II группа). Оценка функции ПЖ проводилась в соответствии с действующими рекомендациями. Анализ продольной деформации (longitudinal strain, LS) миокарда ПЖ осуществлялся с помощью метода отслеживания пятна (speckle tracking echocardiography, STE).

Результаты

При оценке функции ПЖ между группами не было выявлено достоверных различий по фракционному изменению площади ПЖ ($50,0 \pm 9,1\%$ и $51,4 \pm 8,3\%$; $p=0,540$) и систолической экскурсии кольца трикуспидального клапана (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE) ($22,9 \pm 3,2$ мм и $23,6 \pm 2,4$ мм; $p=0,417$). С другой стороны, при помощи метода STE в I группе были выявлены достоверно меньшая продольная эндокардиальная деформация ПЖ ($20,8 \pm 3,5\%$ и $23,1 \pm 2,8\%$; $p=0,014$) и продольная эндокардиальная деформация свободной стенки правого желудочка (right ventricle free wall strain, RV FWS) ($22,0 \pm 3,8\%$ и $24,3 \pm 2,8\%$; $p=0,018$). При использовании корреляционного анализа Спирмена найдена связь умеренной значимости эндокардиальной FW RWS и TAPSE ($r=0,525$; $p=0,012$) в I группе.

Обсуждение

У больных старше 40 лет RV FWS и RV LS меньше в сравнении со здоровыми добровольцами через 3 мес после COVID-19 [3]. Нами была обнаружена систолическая дисфункция ПЖ по данным метода STE у лиц молодого возраста через 3 мес после COVID-19-пневмонии в сравнении с данными группы здоровых добровольцев. Найденное угнетение эндокардиальной RV FWS может интерпретироваться как дисфункция ПЖ ввиду представленных значений, опубликованных ранее [4].

Возможно, дисфункция ПЖ может быть связана с гипоксической легочной вазоконстрикцией [5]. Но, несмотря на статистически значимо большее значение систолического давления в легочной артерии у пациентов с перенесенной COVID-19-пневмонией, увеличения легочного сосудистого сопротивления нами не обнаружено.

Заключение

Скрытая систолическая дисфункция ПЖ выявлена при проведении STE у пациентов молодого возраста, перенесших 3 мес назад COVID-19-пневмонию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liao J., Fan S., Chen J. et al. Epidemiological and clinical characteristics of COVID-19 in adolescents and young adults. The Innovation. 2022; 1(1): 100001. doi: 10.1016/j.xinn.2020.04.001
2. Corrales-Medina V.F., Alvarez K.N., Weissfeld L.A. et al. Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. Jama. 2015; 313(3): 264-274. doi: 10.1001/jama.2014.18229
3. Akkaya F., Yenercağ F.N.T., Kaya A. et al. Long term effects of mild severity COVID-19 on right ventricular functions. The International Journal of Cardiovascular Imaging. 2021; 37(12): 3451-3457. doi: 10.1007/s10554-021-02340-x
4. Li Y., Li H., Zhu S. et al. Prognostic value of right ventricular longitudinal strain in patients with COVID-19. Cardiovascular Imaging. 2020; 13(11): 2287-2299. doi: 10.1016/j.jcmg.2020.04.014
5. Широков Н.Е., Ярославская Е.И., Осокина Н.А. и др. Скрытая систолическая бивентрикулярная дисфункция у пациентов молодого возраста через 3 месяца после covid-19-пневмонии. [принято в печать. Кардиология]

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА КАРДИОРЕНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ СИНТРОПИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА И ГИПОТИРЕОЗЕ

Ю.С. Паламарчук

Государственная образовательная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», г. Донецк, Украина, ДНР

Аннотация

У больных сахарным диабетом 2-го типа и гипотиреозом отмечено снижение объема циркулирующей плазмы при неизменных параметрах объема циркулирующей крови, а также уменьшение скорости гломерулярной фильтрации. 6-месячная комбинированная терапия метформином и производными глюкагонподобного пептида-1, а также метформином и ингибиторами дипептидилпептидазы-4 позволила улучшить как кардиальные, так и почечные функциональные показатели.

Ключевые слова: комбинированная гипогликемическая терапия, кардио-ренальные показатели, сахарный диабет 2-го типа, гипотиреоз.

THE EFFECT OF COMBINED HYPOGLYCEMIC THERAPY ON CARDIO-RENAL PARAMETERS IN THE SYNTROPIC COURSE OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND HYPOTHYROIDISM

Yu.S. Palamarchuk

State Educational Organization of Higher Professional Education «Donetsk National Medical University named after M. Gorky», Donetsk, Ukraine, DPR

Annotation

In patients with type 2 diabetes mellitus and hypothyroidism, a decrease in circulating plasma volume was noted with unchanged parameters of circulating blood volume, as well as a decrease in glomerular filtration rate. 6-month combination therapy with metformin and derivatives of glucagon-like peptide-1, as well as metformin and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, improved both cardiac and renal functional parameters.

Key words: combined hypoglycemic therapy, cardio-renal parameters, type 2 diabetes mellitus, hypothyroidism.

Актуальность. Распространенность патологии щитовидной железы у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (СД 2-го типа) 2–3-кратно превосходит общую популяцию, что позволяет судить об этой патологии, как о синтропии взаимосвязанных патологий, а не случайного сочетаний эндокринных болезней [1].

Полагают, что в основе диабетическо-тироидной синтропии лежит полигенная генетическая предрасположенность, имеющая единую генетическую платформу и ассоциированную в основном с экспрессией генов HLA-II (гаплотипы DR3-DQ2/ DR4-DQ8) и HLA I (гаплотипы B8) [2].

Цель исследования – оценка влияния трех режимов комбинированной гипогликемической терапии на кардиоренальные показатели при синтропическом течении СД 2-го типа и гипотиреозе.

Материал и методы

В исследование включено 72 пациента СД 2-го типа средней степени тяжести и манифестным гипотиреозом, среди которых 41 (41,8%) мужчина и 57 (58,2%) женщин ($p < 0,05$). Средний возраст мужчин составил $50,7 \pm 0,13$, а у женщин – $45,9 \pm 0,24$ года ($p < 0,05$). Средняя продолжительность диабетических проявлений у мужчин была достоверно длительнее ($p < 0,05$) и составила $5,8 \pm 0,09$ против $4,5 \pm 0,12$ лет у женщин. Продолжительность тироидного синдрома, напротив, у женщин была достоверно больше ($p < 0,05$), чем у мужчин, и составила $10,7 \pm 0,04$ против $6,3 \pm 0,02$ года.

Каждый пациент предварительно подписал информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения были: СД 2-го типа средней тяжести в стадии суб-/компенсации без инсулина (с или без признаков инсулинрезистентности или гиперинсулинемии), клинические и/или лабораторные проявления гипотиреоза.

Методом случайной выборки все пациенты были распределены в 3 сопоставимые между собой по возрасту и полу группы наблюдения. В группу 1 вошли 24 (24,5%) пациента СД 2-го типа с гипотиреозом, которые получали метформин и гликлазид в общепринятых дозировках; в группу 2 включено 23 (23,5%) пациента, которые получали метформин и производный глюкагонподобного пептида-1 (ГПП-1); в группу 3 включены 25 (25,5%) пациентов, которые получали метформин и ингибитор дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4).

Коррекция гипотиреоза предполагала индивидуальное дозирование левотироксина, исходя из стартовых параметров тироидных показателей. Лечение начинали с дозы $12,5–25$ мкг в зависимости от степени тяжести и клинических проявлений.

Контрольную группу составили 11 здоровых мужчин и 14 женщин аналогичного возраста. Средний возраст здоровых мужчин равнялся $50,1 \pm 0,90$ против $45,5 \pm 0,56$ у женщин ($p < 0,05$). Не установлено возрастных различий ($p > 0,05$) между представителями аналогичного пола у больных и здоровых.

Верификацию диабета проводили в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по СД (1999 г.) и Российскими клиническими рекомендациями по диагностике и лечению диабета (2015).

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по формуле Кокрофта-Голта. Инсулинрезистентность устанавливали при помощи гомеостатической модели НОМА (НОМА-IR, ед.) по формуле: инсулин натощак (мЕД/мл) × глюкоза натощак (ммоль/л)/22,5. При индексе НОМА > 2,77 пациентов считали инсулинрезистентными.

Объемы циркулирующей плазмы и крови (ОЦП и ОЦК) изучены методом разведения синего красителя Эванса Т-1824.

Весь период исследования был поделен на этап I, во время которого изучали исходные параметры, и этап II – через 6 месяцев после начала подбора терапии и отработки индивидуальных доз препаратов, требующих времени.

Для статистической обработки применялся пакет программ Statistica 6,0. Значимость различий между группами, а также между показателями в динамике в каждой из групп оценивали при помощи критерия Стьюдента для зависимых/независимых выборок. Уровень значимости соответствовал величине $p < 0,05$.

Результаты

Исходные значения ОЦК у больных имели лишь тенденцию к снижению относительно здоровых ($p > 0,05$), на фоне трех режимов терапии достоверные ($p < 0,05$) изменения были получены только для 2-й группы (таблица).

Таблица 1

Динамика кардиоренальных показателей у больных СД 2-го типа с гипотиреозом, а также у здоровых

Показатели	Этапы обследования	Варианты комбинированной гипогликемической терапии			Здоровые
		1	2	3	
ОЦК, мл/кг	I	67,5±1,2	67,9±1,9	67,3±1,3	68,7±1,5
	II	68,2±1,7	69,4±1,0 ¹	68,0±1,4	
ОЦП, мл/кг	I	40,4±1,1 ²	40,2±1,2 ²	40,5±1,7 ²	43,3±1,6
	II	42,0±1,2 ¹²	44,7±1,0 ¹²	42,3±1,8 ¹²	
СКФ, мл/минуту	I	87,3±2,0 ²	87,4±2,2 ²	87,5±2,0 ²	110,8±2,6
	II	89,0±1,5 ¹²	96,7±1,7 ¹²	92,0±1,3 ¹²	

Примечания:

1. Этапы обследования: I – до лечения, II – через 6 месяцев;
2. ¹ - различия между аналогичными показателями на I-м и 2-м этапах статистически достоверны; ² – различия показателей у больных и здоровых статистически достоверны;
3. Комбинированные варианты терапии: 1 – метформин+гликлазид, 2 – метформин+ ГПП-1, 3 – метформин+ингибиторы ДПП-4.

При этом на 2-м этапе исследования величина ОЦК также не имела статистически достоверных различий с аналогичным показателем у здоровых ($p > 0,05$). В группах 1 и 3 имела место лишь тенденция ($p > 0,05$) увеличения ОЦК.

Напротив, исходные значения ОЦП у больных статистически достоверно были меньше ($p < 0,05$), чем референтные значения у здоровых, что указывает на снижение объема плазмы за счет частичной ее диффузии (пропитывания) в ткани и висцеральные органы. На фоне лечения ОЦП достоверно увеличился во всех группах больных ($p > 0,05$). Однако если в группе 1 различия между I и II этапом исследования равнялись 1,6, то в группах 2 и 3 – 4,5 и 1,8 мл/кг соответственно.

Исходные величины СКФ у больных высокодостоверно ($< 0,01$) отличались от здоровых, что указывает на формирование почечной недостаточности. На фоне трех режимов терапии отмечена позитивная динамика СКФ в виде увеличения данного показателя, однако в группах это происходило с разной интенсивностью. Умеренно выраженный прирост ($p < 0,05$) имел место в группах 2 и 3, а минимальный – в группе 1. Следует отметить, что функция почек независимо от лечебной программы не восстановилась до нормы ни в одной из групп наблюдения.

Взаимосвязь диабета и гипотиреоза многогранна, изучена явно недостаточно и, по-видимому, должна иметь свои особенности, включая лечение. При гипотиреозе нарушается инсулинозависимый клиренс глюкозы, способствуя высокому риску развития осложнений диабета [3]. Наблюдается снижение кишечной абсорбции глюкозы, которое обуславливает низкий гликемический пик при проведении глюкозотолерантного теста, что может вносить

дополнительные изменения не только в суточный гликемический профиль, но и в корректировку доз сахароснижающих средств [2]. Тиреоидная недостаточность ускоряет прогрессирование микроангиопатий и способствует формированию сульфаниламидорезистентности, что является важным практическим аспектом, поскольку многие пациенты СД 2-го типа получают именно данный класс гипогликемических препаратов, как в виде монотерапии, так и в составе комбинированного лечения [1].

При микседеме реализация влияния тиреоидных гормонов осуществляется за счет снижения сердечного выброса (тиреоидная кардиомиопатия) через воздействие на кардиомиоциты и механизмы электрохимической передачи сигнала, что реализуется в клинически значимые процессы снижения контрактильной функции желудочков и торможение миокардиальной проводимости [4]. Регуляция ренального потока крови в сторону снижения при гипотиреозе также связана с повышением периферического сосудистого сопротивления, внутриклубочковой дисрегуляцией в виде избыточного расширения приносящей артериолы нефрона, снижения внутриклубочкового фильтрационного давления и экспрессии ренальных вазодилататоров, таких как сосудистый эндотелиальный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста 1.

В связи со снижением сердечного выброса, ОЦК и ОЦП объем почечного кровотока уменьшен. Для гипотиреоза характерна задержка в организме натрия из-за связывания с внеклеточными мукополисахаридами. СКФ обратимо снижается более чем у 55% пациентов с гипотиреозом, что обусловлено ухудшением чувствительности к бета-адренергической стимуляции и уменьшением высвобождения ренина совместно со снижением образования ангиотензина II. Именно поэтому увеличение диастолического давления примерно у 30% больных при гипотиреозе сопровождается низким уровнем ренина и является соль-зависимой формой гипертензии.

При гипотиреозе ухудшается мощность канальцевого транспорта почки, снижается активность $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ азы, сначала в проксимальных канальцах, а затем, со временем, и во всех сегментах нефрона, что сопровождается сокращением реабсорбции натрия и бикарбонатов. Избыточные потери электролитов с мочой ведут к нарушению процессов подкисления мочи. Утраченная реабсорбтивная мощность приводит к неспособности поддерживать должный уровень давления в мозговом слое почки, который и обеспечивает концентрирование мочи [1].

Заключение

У больных СД 2-го типа и гипотиреозом отмечено снижение ОЦП при неизменных параметрах ОЦК, а также уменьшение СКФ. 6-месячная комбинированная терапия метформином и производными глюкагонподобного пептида-1, а также метформином и ингибиторами дипептидилпептидазы-4 позволила улучшить как кардиальные, так и почечные функциональные показатели.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Взаимосвязь сахарного диабета и тиреоидной патологии (Обзор литературы)* / С.И. Исмаилов, Х.Р. Гулямова, Ш.У. Ахмедова, Н.Н. Максимова // Международный эндокринологический журнал. 2015. №3(67). С. 76–84.
2. *Шпаков А.О.* Взаимосвязь между тиреоидной патологией и сахарным диабетом 2-го типа // Трансляционная медицина. 2017. Т.4, №2. С.29–39.
3. *Diabetes mellitus and thyroid diseases* / M. Nishi // Diabetol. Int. 2018. Vol.9 (2). P. 108–112.
4. *Diez J.J.* Prevalence of thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes / J. J. Diez, P. Sánchez, P. Iglesias // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2011. Vol.119. P.201–207.

ТИРОИДНАЯ ДИСФУНКЦИЯ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ПОДАГРОЙ С КАРДИАЛЬНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ГИПОТИРЕОЗА

М.В. Присяжнюк

Донецкое клиническое территориальное медицинское объединение, г. Донецк, Украина, ДНР

Аннотация

Выявлены изменения функции щитовидной железы у больных первичной подагрой, которые имеют вторичное происхождение, зависимое от состояния пуринового обмена. Применение аллопуринола способствовало восстановлению функции щитовидной железы.

Ключевые слова: тиреоидная дисфункция, первичная подагра, кардиальные проявления гипотиреоза.

THYROID DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH PRIMARY GOUT WITH CARDIAC MANIFESTATIONS OF HYPOTHYROIDISM

M.V. Prisyazhnyuk

Donetsk Clinical Territorial Medical Association, Donetsk, Ukraine, DPR

Annotation

Changes in the function of the thyroid gland were found in the primary gout, having a secondary origin, depending on the state of purine metabolism. The use of allopurinol helps to restore the function of the thyroid gland.

Key words: thyroid dysfunction, primary gout, cardiac manifestations of hypothyroidism.

Актуальность. Накоплены многочисленные данные о высокой распространенности коморбидной патологии среди больных первичной подагрой, в том числе показана высокая частота у них артериальной гипертензии (20–60%), ишемической болезни сердца (до 80%), церебрального инсульта, атеросклеротических поражений сонных артерий, сосудистой деменции, что позволило рассматривать подагру и бессимптомную гиперурикемию в качестве компонентов глобального метаболического синдрома. В последние годы отмечена высокая частота гипотиреоза с кардиальными проявлениями при подагре, в том числе и у мужчин, для которых данная патология является нетипичной [1]. К кардиальным проявлениям гипотиреоза относят симптомокомплекс, включающий гипертензивный, кардиалгический, метаболический и аритмический синдромы.

Взаимоотношение системы гипофиз-щитовидная железа и пуринового обмена мало изучено. Известно, что тиреотропный гормон (ТТГ) стимулирует аденилатциклазный механизм синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), которая, вступая во взаимодействие с рибозо-5-фосфатом, является начальным звеном синтеза пуриновых нуклеотидов. В свою очередь, синтез последних находится под непосредственным контролем тироксина (T_4) [2].

Цель исследования – оценка взаимосвязи пуринового обмена и функции щитовидной железы у больных подагрой с кардиальными проявлениями гипотиреоза.

Материал и методы

Под наблюдением находились 47 мужчин с первичной подагрой, с клиническими кардиальными проявлениями гипотиреоза (кардиалгический, аритмический, гипертензивный, метаболические синдромы). В качестве базисной урикодепрессивной терапии подагры использовали урикодепрессант аллопуринол в дозе 300–500 мг/сутки, дозу которого корригировали в зависимости от уровня урикемии. Из исследования были исключены пациенты, страдающие подагрической нефропатией и почечной недостаточностью, для устранения вероятности получения недостоверных результатов, связанных с нарушением ренального метаболизма гормонов, а также вторичного гиперпаратиреоза при сниженной функции почек.

Средний возраст пациентов составил $46,3 \pm 1,60$ года, а длительность заболевания $12,6 \pm 1,39$ года. Контрольную группу составили 30 здоровых мужчин аналогичного возраста. Больные были распределены в зависимости от тяжести течения подагры на лёгкую 1 (2,2%), средней тяжести 24 (51,0%) и тяжёлую 22 (46,8%). По форме артрита классифицировали хронический 37 (78,7%) и интермиттирующий 10 (21,3%). Периферические тофусы выявлены у 19 (40,4%) больных.

Состояние пуринового обмена у людей оценивали по уровню мочевой кислоты (МК) и оксипуринола (ОП) крови. Исследование тиреоидных гормонов проводили стандартным радиоиммунным методом. Показатели пуринового обмена, функции гипофиза и щитовидной железы исследовали до лечения и спустя 3 месяца от начала терапии.

Статистическую обработку материала проводили при помощи компьютерной программы для статистической обработки «Statistica 5.1» с подсчетом парного критерия t . Табличные значения МК, ОП и тиреоидных гормонов в крови больных и здоровых представлены в виде среднего значения и ее ошибки ($M \pm m$). Статистически значимые различия показателей считали при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты

В крови больных людей установлено достоверное повышение уровня МК и ОП, концентрация которых снижалась до нормальных значений на фоне гипопурикемической терапии (табл. 1).

Таблица 1

Показатели пуринового обмена до и после лечения у больных и здоровых (M±m)

Показатели пуринового обмена	Больные		Здоровые
	до лечения	после лечения	
МК крови (ммоль/л)	0,45±0,020 [*]	0,25±0,015 ^{**}	0,27±0,020
ОП крови (мкмоль/л)	89,5±10,62 [*]	63,6±12,30 [*]	20,4±4,79

Примечание: ^{*}) различия между аналогичными показателями у больных и здоровых статистически достоверны при $p < 0,05$; ^{**}) различия между показателями до и после лечения статистически достоверны при $p < 0,05$.

При исходном определении уровня гормонов у больных оказалось, что содержание трийодтиронина (T_3) и T_4 снижено в сравнении со здоровыми. Проводимое лечение способствовало увеличению уровня T_3 до нормы, тогда как уровень T_4 и ТТГ оставались неизменными (табл. 2).

Таблица 2

Содержание тиреоидных гормонов в крови до и после лечения у больных и здоровых (M±m)

Тиреоидные гормоны	Больные		Здоровые
	до лечения	после лечения	
T_3 (нмоль/л)	1,13±0,116 ^{**}	1,35±0,197 [*]	1,45±0,053
T_4 (нмоль/л)	96,14±6,870 ^{**}	104,29±15,054	148,35±11,242
ТТГ (мЕд/л)	1,9±0,127	1,8±0,105	2,05±0,115

Примечание: ^{*}) различия между аналогичными показателями до и после лечения статистически достоверны при $p < 0,05$; ^{**}) различия между аналогичными показателями у больных и здоровых статистически достоверны при $p < 0,05$.

В подавляющем числе случаев формирование гипотиреоза с кардиальными проявлениями при подагре рассматривают с позиции хронического аутоиммунного тиреоидита [3]. С другой стороны, считается, что наиболее частой причиной развития субклинического первичного гипотиреоза является токсическое воздействие солей свинца и химическое загрязнение окружающей среды выхлопными газами автомобилей, которые оказывают блокирующее влияние на процессы секреции ТТГ гипофизом [4]. Соляма свинца отводится роль индуктора нарушений пуринового обмена, особенно в связи с интенсивным ростом заболеваемости подагрой и, особенно, «бессимптомной» гиперурикемией в индустриально развитых странах мира [5].

Основными биологическими регуляторами транспортных процессов петли Генле, помимо инсулина, паратиреоидных гормонов, являются тиреоидные гормоны, участвующие в регуляции реабсорбции моноурата натрия в проксимальных канальцах, оказывающие влияние на МК в организме. Следовательно, снижение уровня тиреоидных гормонов в сыворотке крови может гипотетически изменять реабсорбцию уратов в проксимальных канальцах почек, приводить к избыточному накоплению ее в крови с возникновением клинических симптомов подагры.

Известно, что синтез тиреоидных гормонов регулируется ТТГ, а секреция последнего, в свою очередь, зависит от выработки тирелиберина в преоптической области гипоталамуса, поэтому в качестве одного из возможных механизмов сниженной функции щитовидной железы следует рассматривать подавление секреции тирелиберина в ядрах гипоталамуса за счет гиперпродукции МК [2]. В настоящее время подтверждено существование А1 рецепторов аденозина в аденогипофизе, которые играют роль в регуляции секреции адренокортикотропного гормона и ТТГ [1], посредством которых можно пояснить развитие дисбаланса в функционировании системы гипофиз-щитовидная железа при подагре, зависящей от состояния пуринового обмена. Нельзя недооценивать и роль МК в образовании иодтираминов – предшественников T_3 и T_4 , патологическое изменение синтеза которых лежит в основе развития первичного гипотиреоза [3]. Вместе с тем, хорошо известна способность некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов, применяющихся в лечении

подагры, снижать и даже полностью блокировать связь гормонов щитовидной железы с транспортными протеинами, что приводит к относительному изменению уровня гормонов в сыворотке крови и может способствовать развитию вторичного, медикаментозно индуцированного гипотиреоза [3].

Полученные результаты дали возможность предположить «вторичность» гормональных нарушений при подагре, зависящих от состояния пуринового обмена. В качестве дополнительного аргумента в пользу данной гипотезы можно привести факт, свидетельствующий об улучшении функционального состояния щитовидной железы в ответ на оптимальную (стандартную) уриконормализующую терапию аллопуринолом.

В перспективе нами будут проанализированы клинические кардиальные проявления гипотиреоза у данной категории больных, а также будет оценена их динамика в процессе лечения урикодепрессивными препаратами. Нам предстоит выяснить генез гипотиреоза, в полной ли он мере обусловлен подавлением синтеза тиреоидных гормонов в условиях гиперурикемии или имеет место и аутоиммунный механизм, реализующийся в тиреоидит.

Заключение

Установлены признаки тиреоидной дисфункции у больных подагрой с кардиальными проявлениями гипотиреоза. Результаты свидетельствуют о вторичности дисгормональных нарушений, которые зависят от состояния пуринового обмена. Применение аллопуринола способствует восстановлению функции щитовидной железы, что может способствовать уменьшению клинических кардиальных проявлений гипотиреоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губанова Г.В., Беляева Ю.Н., Шеметова Г.Н. Гипотиреоз в общей врачебной практике: современный взгляд на проблему // Земский врач. 2015. № 3 (27). С. 12–15.
2. Долгих Ю.А., Вербовой А.Ф., Шаронова Л.А. Субклинический гипотиреоз // Клиническая медицина. 2017. Т. 95, № 2. С. 118–122.
3. Гончарова Е.С., Пестун Е.М., Пояркова А.И., Строев Ю.И., Чурилов Л.П. Мочевая кислота, подагра и аутоиммунный тиреоидит: От Е.С. Лондона – до наших дней // CLINICAL PATHOPHYSIOLOGY. 2018. №4. С. 56–67.
4. Esfandiari N.H., Papaleontiou M. Biochemical Testing in Thyroid Disorders // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 2017. № 46 (3). P. 631–648.
5. Redford C., Vaidya B. Subclinical hypothyroidism: Should we treat? // Post Reprod. Health. 2017. № 23 (2). P. 55–62.

АССОЦИАЦИИ ОБЪЕМА ПАРЕНХИМЫ ПОЧЕК ПО ДАННЫМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ С БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ИХ ДИСФУНКЦИИ ПРИ РЕЗИСТЕНТНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Н.И. Рюмшина, А.М. Гусакова, А.Ю. Фальковская

НИИ кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Резистентная артериальная гипертензия (РАГ) часто сопровождается поражением почек, поэтому раннее выявление изменений почечной паренхимы помогает избежать тяжелых сердечно-сосудистых почечных осложнений. В связи с недостатком данных о визуальных маркерах почечной дисфункции при РАГ нашей целью было определить взаимосвязь между объемами почечной паренхимы и сывороточными маркерами, определяющими их функцию. Наиболее значимым маркером развития почечной дисфункции, согласно нашим результатам, оказался объем коры почек, индексированный на рост, т.к. он оказался значимо ниже и независимо от пола, возраста и антропометрических показателей, связан с рСКФ в группе с почечной дисфункцией.

Ключевые слова: резистентная артериальная гипертензия, магнитно-резонансная томография, объем паренхимы почек, креатинин, расчетная скорость клубочковой фильтрации.

ASSOCIATIONS MRI-BASED OF KIDNEY PARENCHYMAL VOLUME AND BIOMARKERS OF RENAL DYSFUNCTION IN RESISTANT HYPERTENSION

N.I. Ryumshina, A.M. Gusakova, A.Yu. Falkovskaya

Cardiology Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Annotation

Resistant hypertension (RHT) is often associated with kidney injury. Early detection of renal changes contributes to avoiding severe cardiovascular and renal complications, but imaging characteristics of renal dysfunction in RHT remain unclear. The aim of the present study was to determine the relationships between the renal parenchyma volumes and biomarkers reflecting kidney function in a cohort of patients with RHT. According to our results, the most significant marker of the development of renal dysfunction was the volume of the renal cortex indexed for height, since it turned out to be significantly lower and, regardless of gender, age and anthropometric indicators, associated with eGFR in the group with renal dysfunction.

Key words: resistant hypertension, magnetic resonance imaging, renal parenchymal volume, creatinine, estimated glomerular filtration rate.

Актуальность. Резистентная артериальная гипертензия (РАГ) является малоизученной нозологической единицей. Имеется недостаточно данных о причинах, патогенетических механизмах, характеристиках пациента, прогностических факторах и сходах РАГ. Распространенность РАГ, по данным разных источников, составляет от 7% до 27% в различных популяциях пациентов [1], поэтому сохраняется актуальность расширения знаний по всем аспектам диагностики и лечения РАГ.

Исследование органов-мишеней имеет решающее значение для постановки правильного диагноза и обеспечения надлежащего лечения РАГ. В частности, повреждение почек при РАГ является независимым фактором риска сердечно-сосудистых осложнений (SCORE). Согласно современным рекомендациям, функцию почек при РАГ необходимо оценивать по уровню мочевой кислоты, показателю расчетной скорости клубочковой фильтрации (рСКФ) и по уровню протеинурии [2]. Среди инструментальных методов диагностики почек рекомендуется ультразвуковое исследование [3], однако наравне с доступностью имеется и ряд ограничений метода. Напротив, современная магнитно-резонансная томография (МРТ) позволяет проводить одновременное качественное и количественное исследование структуры и функции почек. В настоящее время использование МРТ почек редко встречается у пациентов с РАГ в рутинной клинической практике [4]. Недостаточность данных о связи между измененной ультраструктурой почечной паренхимы и функцией почек определила цель настоящей работы, как выявление взаимосвязи между МРТ-объемами почечной паренхимы и биомаркерами, отражающими функцию почек, в группе пациентов с РАГ.

Материал и методы

Одномоментное наблюдательное исследование проведено на выборке из 34 мужчин и женщин, средний возраст которых составил 57.8 ± 8.4 лет. Объемные показатели почечной паренхимы рассчитывались по результатам МРТ (магнитное поле 1.5 Т, 8-канальные встроенные и поверхностные катушки, коронарные и аксиальные взвешенные по T1- и T2-быстрые спин-эхо изображения) согласно формуле эллипсоида [5]. Для анализа использовались также объемы, индексированные на рост, индекс массы тела и площадь поверхности тела, поскольку размер почек имеет зависимость от антропометрических параметров. Для лабораторной оценки функции почек определялись уровень сывороточного креатинина и расчетная скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) (СКД-ЕП). Артериальное давление оценивалось по значениям офисного, а также суточного мониторинга. Статистическая обработка выполнялась с помощью Statistica 10.0.

Результаты

При сравнении выборки по полу оказалось, что объемные показатели почечной паренхимы значительно различаются у мужчин и женщин (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение абсолютных и индексированных объемов почек у мужчин и женщин

	Женщины	Мужчины	p value
TKV	333.1 ± 77.6	425.1 ± 66.1	0.002
ht-TKV	94.9 ± 17.8	93 ± 15.9	0.7
bsa-TKV	173.8 ± 33.2	202.1 ± 33.5	0.03
bmi-TKV	9.5 ± 2.5	13.9 ± 2.6	0.000
T-Cortex-V	118.5 ± 40.5	167.1 ± 31.7	0.001
ht-T-Cortex-V	33.7 ± 9.9	36.5 ± 6.9	0.4
bsa-T-Cortex-V	61.8 ± 18.4	79.4 ± 15.1	0.01
bmi-T-Cortex-V	3.4 ± 1.2	5.5 ± 1.2	0.000

Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. TKV – общий объем почек, ht-TKV – общий объем почек, индексированный на рост, bsa-TKV – общий объем почек, индексированный на площадь поверхности тела, bmi-TKV – общий объем почек, индексированный на индекс массы тела, T-Cortex-V – общий объем коркового вещества почек, ht-T-Cortex-V – общий объем коркового вещества почек, индексированный на рост, bsa-T-Cortex-V – общий объем коркового вещества почек, индексированный на площадь поверхности тела, bmi-T-Cortex-V – общий объем коркового вещества почек, индексированный на индекс массы тела

При разделении пациентов на группы по уровню рСКФ: 1 гр. – рСКФ > 90 мл/мин/1.73 м²; 2 гр. – рСКФ = 60–90 мл/мин/1.73 м²; и 3 гр. – с рСКФ < 60 мл/мин/1.73 м² – значимых межгрупповых различий по общему объему почек (TotalKidneyVolume, TKV) выявлено не было (p > 0.05). Напротив, были получены достоверные различия по общему объему почек, индексированному на рост (TotalKidneyVolumeindexedbyheight, ht-TKV), а также по объему коркового вещества и его индексов (рис. 1).

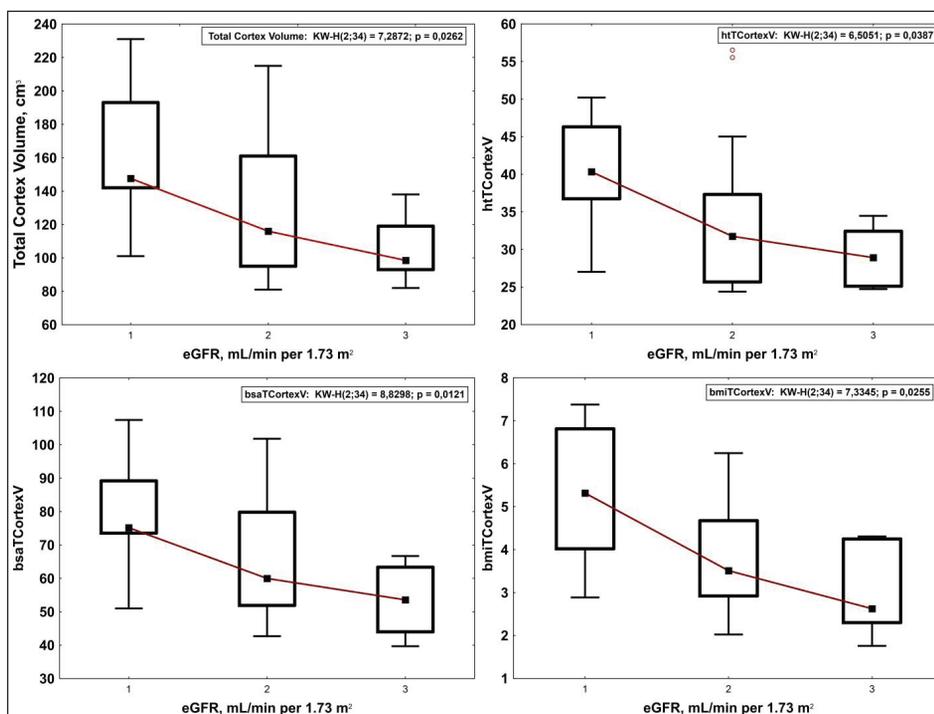


Рис. 1. Сравнение общего объема коркового вещества и его индексов в группах с разной функциональной активностью почек (1 – группа с рСКФ > 90 мл/мин/ 1,73 м²; 2 – группа с рСКФ = 60–90 мл/мин/ 1,73 м²; 3 – группа с рСКФ < 60 мл/мин/ 1,73 м²)

Наиболее показательным согласно корреляционному анализу оказался параметр ht-TKV, показавший связь и с креатинином, и с рСКФ. Данные корреляционного анализа остальных индексов представлены в табл. 2. ROC-анализ позволил выявить МРТ-маркер дисфункции почек у пациентов с рСКФ ниже 60 мл/мин/1,73 м². Риск развития почечной дисфункции при РАГ возрастал вместе с уменьшением объема почечной паренхимы. Общий объем коркового вещества почек, индексированный на рост (TotalCortexVolumeindexedbyheight, ht-Cortex-V)

продемонстрировал наивысшую диагностическую ценность (рис. 2): при значении $< 32,4$, его чувствительность составила 83,3%, а специфичность 60,7% ($p=0,03$).

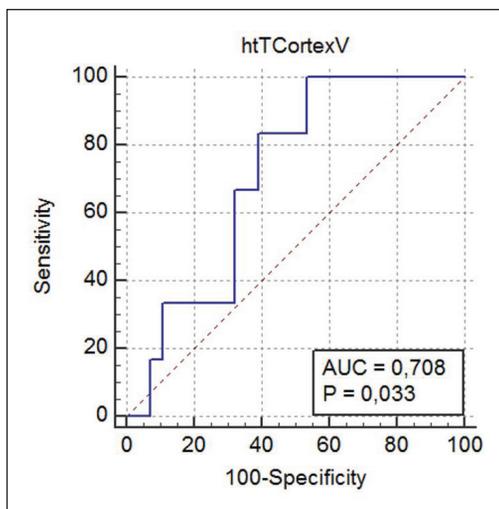


Рис. 2. ROC-кривая, определяющая пороговое значение объема коры почек, индексированного на рост, при котором рСКФ < 60 мл/мин / $1,73$ м²

Заключение

Определенные по данным МРТ общий объем почек и коркового слоя почек, индексированные на рост, показали сильную взаимосвязь с биомаркерами почечной дисфункции при РАГ. Последующее изучение данных маркеров в аспекте их взаимосвязей с артериальным давлением, длительностью гипертонии, СД2 и биохимическими параметрами позволит более полноценно оценить их клиническую значимость. Кроме того, получение новых неинвазивных данных оценки состояния почек будет способствовать разработке таргетной терапии РАГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chiu N., Lauffenburger J.C., Franklin J.M., Choudhry N.K. Prevalence, predictors and outcomes of both true- and pseudo-resistant hypertension in the action to control cardiovascular risk in diabetes trial: a cohort study // *Hypertens. Res.* 2021. V. 4, № 11. P. 1471–1482.
2. Williams B., Mancia G., Spiering W., Agabiti Rosei E., Azizi M., Burnier M. et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension // *J. Hypertens.* 2018. Vol. 36, № 10. P. 1953–2041.
3. Чазова И.Е., Жернакова Ю.В. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертонии // *Системные гипертонии.* 2019. Т. 16, № 1. С. 6–31.
4. Фальковская А.Ю., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рупп Т.М., Манукян М.А., Личикаки В.А., Ситкова Е.С., Зюбанова И.В., Гусакова А.М., Баяв А.Е., Рябова Т.Р., Рюмишина Н.И. Ренальная денервация как новая стратегия нефропротекции у больных резистентной артериальной гипертонией, ассоциированной с сахарным диабетом 2-го типа // *Сибирский медицинский журнал.* 2020. Т. 35, № 1. С. 80–92.
5. Рюмишина Н.И., Лукьяненко П.И., Мордовин В.Ф., Усов В.Ю. Использование антропометрической оценки почек и надпочечников методами МР-томографии для прогнозирования эффективности ренальной симпатической денервации почечных артерий у пациентов с медикаментозно-резистентной артериальной гипертонией // *Медицинская визуализация.* 2017. Т. 21, № 4. С. 58–64.

ОЦЕНКА ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И С ОЖИРЕНИЕМ I СТЕПЕНИ

Б.Р. Салихов, А.Л. Аляви

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр терапии и медицинской реабилитации, г.Ташкент, Узбекистан

Аннотация

Артериальная гипертония является самостоятельным фактором риска развития ремоделирования миокарда левого желудочка с нарушением его диастолического расслабления и сократимости [1].

Расстройства диастолической функции часто предшествуют гипертрофии левого желудочка, снижению его систолической функции и могут возникать при отсутствии каких-либо симптомов сердечной недостаточности [2]. Одним из наиболее ранних предикторов риска сердечно-сосудистых событий с АГ, несомненно, являются показатели диастолической функции ЛЖ. У больных с АГ встречаемость ДДЛЖ колеблется от 30 до 87% [3]. Таким образом, одной из приоритетных задач профилактической медицины является ранняя диагностика диастолического нарушения левого желудочка и строгий контроль этих состояний для предупреждения прогрессирования.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, диастолическая дисфункция, эхокардиография, индекс массы тела, ожирение 1 степени.

EVALUATION OF THE DIASTOLIC FUNCTION OF THE LEFT VENTRICLE IN MILITARY PERSONNEL WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND OBESITY OF THE 1ST DEGREE

B.R. Salikhov, A.L. Alyavi

The republican specialized scientific and practical medical center for therapy and medical rehabilitation, Tashkent, Uzbekistan

Annotation

Arterial hypertension is an independent risk factor development of left ventricular myocardial remodeling with impaired diastolic relaxation and contractility [1]. Disorders of diastolic function often precede left ventricular hypertrophy, a decrease in its systolic function, and may occur in the absence of any symptoms of heart failure [2]. One of the earliest predictors of the risk of a cardiovascular event with hypertension is undoubtedly the indicators of LV diastolic function. In patients with hypertension, the incidence of LVDD ranges from 30 to 87 % [3]. Thus, one of the highest priority tasks of preventive medicine is the early diagnosis of diastolic disorders of the left ventricle and the strict control of these conditions to prevent the progression of this condition.

Key words. Arterial hypertension, diastolic dysfunction, echocardiography, body mass index, obesity of the 1st degree.

Актуальность. Артериальная гипертензия вызывает субклинические изменения структуры и функции левого желудочка, а именно диастолическую дисфункцию. Диастолическая функция – это способность ЛЖ к адекватному наполнению для обеспечения соответствующего ударного объема без превышения определенных пределов давления [4]. Диастолическая дисфункция левого желудочка (ДДЛЖ) признана важным фактором диастолической сердечной недостаточности и связана с повышенной заболеваемостью и смертностью [5].

Цель исследования – оценка диастолической функции левого желудочка (ЛЖ) у военнослужащих с артериальной гипертензией (АГ) и с ожирением 1 степени.

Материал и методы

В исследование включены 56 пациентов с АГ 1-2 степени, военнослужащие мужского пола в возрасте от 35 до 55 лет ($40,1 \pm 2,8$ лет). Индекс массы тела (ИМТ) у обследованных в среднем составил $31,3 \pm 3,2$ кг/м². В зависимости от диастолической функции ЛЖ пациенты были разделены на 2 группы: с нормальной диастолической функцией левого желудочка (НДФЛЖ) и больные с ДДЛЖ. Диастолическая функция ЛЖ оценивалась с помощью ЭхоКГ, по трансмитральному кровотоку в режиме импульсного доплера из апикальной четырехкамерной позиции. Показателями диастолической функции ЛЖ по трансмитральному потоку явились следующие параметры: время изоволюмического расслабления (IVRT – isovolumicrelaxationtime) левого желудочка, пиковая скорость раннего диастолического наполнения (E, см/с), пиковая скорость позднего диастолического наполнения, т.е. наполнения левого желудочка в систолу предсердий (A, см/с), отношение пиковой скорости раннего диастолического наполнения левого желудочка к пиковой скорости позднего диастолического наполнения левого желудочка (скорость E/A), время замедления раннего диастолического наполнения ЛЖ – DT (мс).

Результаты

Из всех обследованных ДДЛЖ отмечалась у 22 (39,3%) лиц. У 34 (60,7%) обследованных выявлена НДФЛЖ ($p < 0,05$). В отношении вида ДДЛЖ выявлен только 1 тип нарушения диасто-

лической функции, т.е. наблюдается нарушение эластичности и повышение жесткости миокарда левого желудочка у пациентов АГ с ожирением 1 степени. Псевдонормальный и рестриктивный типы наполнения у обследуемых больных не встречались. У больных с нарушением диастолической функции ИМТ в среднем составил $33,8 \pm 2,5$ кг/м². У пациентов с нормальной диастолической функцией ЛЖ данный показатель составил $31,1 \pm 1,8$ кг/м² ($p > 0,05$).

Пациенты с ДДЛЖ характеризовались нарушением процессов активной релаксации ЛЖ в диастоле, на что указывало статистически значимое снижение показателей скорости раннего диастолического наполнения ЛЖ – скорость пика Е до $66,7 \pm 1,85$ см/с и у лиц с НДФЛЖ выявлено нормальное значение $-74,2 \pm 2,1$ см/с ($p < 0,05$).

Позднее диастолическое наполнение ЛЖ – скорость пика А, являющаяся скоростным показателем, также имела тенденцию к увеличению у больных с ДДЛЖ – $68,4 \pm 3,4$ см/с, этот показатель у больных с НДФЛЖ составлял $61,5 \pm 2,1$ см/с ($p > 0,05$).

Соотношения этих пиков в группе с ДДЛЖ было $1,02 \pm 0,3$, а в группе с НДФЛЖ – $1,3 \pm 0,2$ ($p > 0,05$). Тенденция к уменьшению этих соотношений, которые развиваются при дисфункции диастолы, указывают на развитие затруднения оттока крови из ЛП, уменьшение объема и скорости раннего пассивного наполнения. При этом наполнение ЛЖ закономерно становится все более зависимым от сокращения предсердия в конце диастолы.

Время замедления скорости потока в фазу раннего диастолического наполнения – ДТ – также выявлено увеличение значения в группе с ДДЛЖ до $208,3 \pm 3,1$ мс. В группе НДФЛЖ время замедления скорости потока в фазу раннего диастолического наполнения – ДТ – в среднем составило $179,4 \pm 1,4$ мс ($p < 0,05$).

Время изоволюмического расслабления левого желудочка соответствует интервалу от момента окончания аортального систолического потока до момента начала трансмитрального потока. У пациентов с НДФЛЖ этот показатель в среднем составил $69,3 \pm 1,5$ мс, который в норме от 45 мс до 85 мс. Надо отметить, что IVRT зависит от скорости релаксации миокарда, от давления в аорте и левом предсердии. В группе с ДДЛЖ отмечалась тенденция к увеличению времени изоволюмического расслабления левого желудочка до $88,1 \pm 1,2$ мс ($p < 0,05$), что указывает на замедление релаксации левого желудочка и повышение давления в аорте, а также увеличение этого показателя характерно для ДДЛЖ по 1 типу.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствует о том, что нарушение диастолической функции левого желудочка с нарушением активной релаксации и повышением жесткости миокарда непосредственно зависит также от массы тела больного.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Esposito R., Sorrentino R., Galderisi M.* The use of transthoracic echocardiography for the assessment of left ventricular systolic and diastolic function in patients with suspected or ascertained chronic heart failure // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2016; 14: 37–50.
2. *Krutikov Ye.S., Tsvetkov V.A., Chistyakova S.I.* Cardiac remodeling in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension // *New Armenian Medical Journal.* 2019;13(2):4–9.
3. *Самоявцева С.В., Гурвич Е.В., Шкарин В.В.* Взаимосвязи диастолической функции левого желудочка с его морфофункциональными особенностями, показателями периферической гемодинамики и данными суточного мониторинга артериального давления у пациентов с артериальной гипертензией // *Архив внутренней медицины.* 2014. № 5(19). Болезни сердца и сосудов. С. 47–51.
4. *Sherif F.* ASE/EACVI GUIDELINES AND STANDARDS. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging / *Sherif F. Nagueh, Smiseth Otto A.* // *Journal of the American Society of Echocardiography.* 2016. Vol.29, № 4. P. 277–314.
5. *Mitter S.S., Shah S.J., Thomas J.D.* A Test in Context: E/A and E/e' to Assess Diastolic Dysfunction and LV Filling Pressure // *J Am Coll Cardiol.* 2017, Mar 21; 69 (11): 1451–1464. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.12.037.

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖАЛОБ ПРИ ГИПОТЕНЗИИ У МОЛОДЫХ

О.А. Халаимова, К.С. Кудлаева, Л.А. Камышникова, Д.В. Бондарева

НИУ «БелГУ», г. Белгород, Россия

Аннотация

Высокая распространенность низкого артериального давления (НАД) у молодых диктует необходимость врачам общей практики правильно оценивать жалобы и клиническую картину как у девушек, так и у

юношей с низким артериальным давлением для постановки верного диагноза и дальнейшего лечения, чтобы предупредить у этих пациентов сердечно-сосудистые осложнения. **Цель исследования** – изучить особенности жалоб у девушек и юношей при гипотензии. **Методика.** В основную группу было включено 49 студентов в возрасте от 19 до 26 лет (30 девушек и 19 юношей), которые соответствовали критериям НАД. В группу контроля вошли 49 человек с нормальным АД, сопоставимых по возрасту. Оценку жалоб проводили по результатам анкетирования. **Результаты.** Анализ жалоб у мужчин и женщин при НАД позволил выявить, что жалобы на «вялость», «головные боли» и «сонливость» были самыми частыми у девушек и достигали 86,67 %, а жалобы на «сниженную способность к физической нагрузке», «вялость» были самыми частыми у юношей, достигая 68,42 %. **Заключение.** В исследовании выявлено большое разнообразие жалоб при НАД, все 12 жалоб встречаются в основной группе. Имеются четкие гендерные различия в частоте предъявляемых жалоб в основной группе, так, 4 жалобы встречаются достоверно чаще у лиц женского пола в сравнении с мужчинами: «головокружение», «раздражительность», «сонливость» и «снижение аппетита». Обращает внимание жалоба на «головокружение», которая в 3 раза чаще встречается у женщин (66,67 %), чем у мужчин (21,2 %).

Ключевые слова: артериальная гипотензия, низкое давление, жалобы, молодые люди, гендерные различия.

GENDER FEATURES OF COMPLAINTS WITH HYPOTENSION IN YOUNG PEOPLE

O.A. Chalaimova, K.S. Kudlaeva, L.A. Kamyshnikova, D.V. Bondareva

Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

Annotation

The high prevalence of low blood pressure (LBP) in young people necessitates general practitioners to correctly evaluate complaints and the clinical picture of both girls and boys with low blood pressure in order to make a correct diagnosis and further treatment in order to prevent these patients cardiovascular complications. **Objective:** it is study the characteristics of complaints in young girls and boys with hypotension. **Methods.** The main group included 49 students aged 19 to 26 years (30 girls and 19 boys) who met the LBP criteria. The control group included 49 people with normal blood pressure, comparable in age. Complaints were assessed based on the results of the survey. **Results.** It was found that complaints of “lethargy”, “headaches” and “drowsiness” were the most frequent and reached 86.67%, and complaints of “reduced ability to exercise”, “lethargy” “were the most frequent in young men reaching 68.42%. **Conclusions.** Our study revealed a wide variety of complaints with LBP, all 12 complaints are found in the main group. Gender differences in the frequency of complaints were revealed in the main group, thus 4 complaints were found more often in women than in men: “vertigo”, “irritability”, “drowsiness” and “loss of appetite”. The complaint about “vertigo”, which is 3 times more common in women (66.67%) than in men (21.2%), is noteworthy.

Key words: arterial hypotension, complaints, young people, gender differences.

Актуальность. Предрасполагающим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) является не только артериальная гипертензия (АГ), но и артериальная гипотензия (АГТ) [1, 2]. Она встречается при целом ряде заболеваний, но может возникать первично. Частота низкого артериального давления (НАД) составляет 49,2% в популяции и регистрируется чаще у лиц женского пола – до 56 % случаев [1]. Согласно проведенным ранее исследованиям, жалобы, встречающиеся при АГТ, слабо изучаемы в практической деятельности врача. При идиопатической форме АГТ наблюдается выраженная клиническая симптоматика: головная боль, головокружение, ощущение «нехватки» воздуха в состоянии покоя, нарушение сердечной деятельности (сердцебиение), бессонница, слабость и утомляемость (чаще в утренние часы), ухудшение памяти, снижение работоспособности [2]. Симптоматическая АГТ возникает на фоне таких заболеваний, как надпочечниковая недостаточность, гипотиреоз, анемия, острый и хронический гастрит, цирроз печени и другие заболевания, в клинике вторичной АГТ на первом месте будут проявления основного заболевания [3]. Со временем артериальная гипотензия приводит к развитию артериальной гипертензии, это связано с тем, что сосуды при НАД «нетренированные» [4]. Продолжительная гипотензия способствует уменьшению притока крови к органам и тканям, что приводит к расстройству их функций. Как следствие, это развитие таких опасных осложнений, как инсульт, инфаркт

миокарда (ИМ), почечная недостаточность и ишемия кишечника. Симпатикотония и парасимпатикотония у молодых женщин с идиопатической АГТ связаны с различными вариантами ремоделирования сердца [5]. Умение врачей общей практики правильно оценить жалобы и клиническую картину как у девушек, так и у юношей с низким артериальным давлением (НАД) поможет в постановке верного диагноза и дальнейшему лечению, чтобы предупредить у этих пациентов сердечно-сосудистые осложнения [6].

Цель исследования – изучить особенности жалоб у девушек и юношей с гипотензией.

Материал и методы

В исследовании принимали участие 98 студентов медицинского института НИУ «БелГУ», которым производилась оценка АД путем троекратного измерения на плече тонометром. Критерием низкого артериального давления считали САД менее 100 мм рт. ст. и ДАД менее 60 мм рт. ст. В основную группу было включено 49 студентов в возрасте от 19 до 26 лет (30 девушек и 19 юношей), которые соответствовали критериям НАД. В группу контроля вошли 49 человек с нормальным АД, сопоставимые по возрасту. Оценка жалоб проводилась по результатам анкетирования. У девушек САД $94 \pm 1,6$ мм рт. ст. и контрольной группы САД $121 \pm 2,1$ мм рт. ст. САД у лиц мужского пола составил $97 \pm 1,7$ мм рт. ст. и контрольной группы САД $123 \pm 1,9$ мм. рт. ст. Статистический анализ осуществляли с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ жалоб у мужчин и женщин при НАД выявил, что жалобы на «вялость», «головные боли» и «сонливость» были самыми частыми у девушек и достигали 86,67%, а жалобы на «сниженную способность к физической нагрузке», «вялость» были самыми частыми у юношей, достигая 68,42 %. Последняя стоит на втором месте среди жалоб у девушек, далее шли «раздражительность и эмоциональная неустойчивость». При этом частота и разнообразие жалоб у женщин достоверно чаще по сравнению с мужчинами. В основной группе из 12 представленных жалоб 4 жалобы регистрировались достоверно чаще у лиц женского пола в сравнении с мужским. Причиной этому служит гормональный фон у лиц женского пола, а именно уровень эстрогена, который снижает стрессоустойчивость [7].

У лиц мужского пола на 2-м месте жалобы на «головные боли», «трудности с концентрацией внимания», достигая 63,15 %. Обращает внимание жалоба на «головокружение», которая в 3 раза чаще встречается у женщин (66,67 %), чем у мужчин (21,2 %), $p < 0,05$. Жалобы на «головокружение», «раздражительность», «сонливость» и снижение аппетита встречаются чаще у лиц женского пола, в сравнении с мужчинами, $p < 0,05$ (рис. 1).

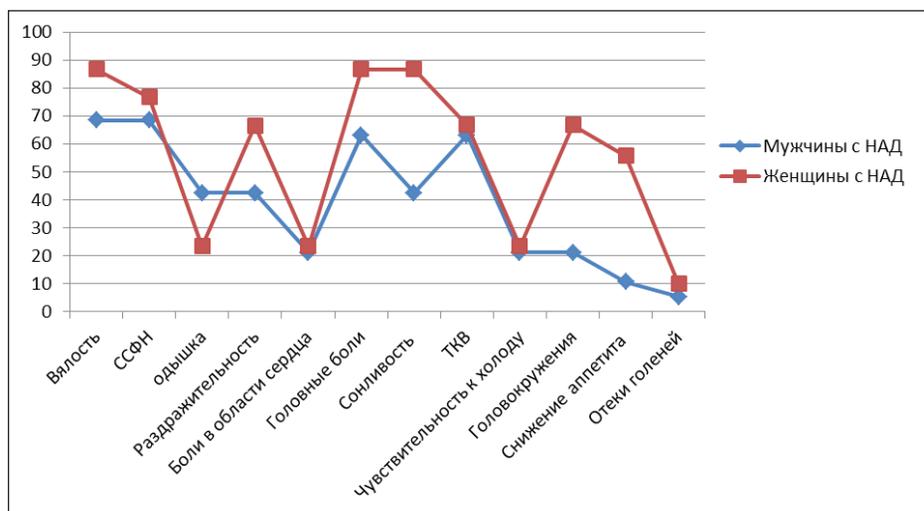


Рис. 1. Сравнительный анализ жалоб у женщин и мужчин при НАД, %

При сравнении основной группы у женщин выявлена более частая встречаемость жалобы по сравнению с контрольной группой. При этом достоверно чаще в основной группе встречаются жалобы на «головокружение», «снижение аппетита» и «боли в области сердца», $p < 0,05$

При сравнении основной группы у мужчин достоверно чаще по сравнению с контрольной группой выявлены жалобы на «вялость», «сниженную способность к физической нагрузке», «одышку», «боли в области сердца» «головные боли», «трудности с концентрацией внимания», «головокружения», $p < 0,05$.

При анализе результатов проведенного исследования мы выявили, что среди студентов медицинского института у многих выявляются симптомы АГТ, но также данные жалобы могут быть связаны с повышенной учебной и психологической нагрузкой, что согласуется с другими исследованиями [8].

Заключение

В нашем исследовании выявлено большое разнообразие жалоб при низком артериальном давлении, все 12 жалоб встречаются в основной группе независимо от пола, хотя частота встречаемости выше среди женщин по сравнению с мужчинами. Выявлены четкие гендерные различия в частоте предъявляемых жалоб в основной группе, так, 4 жалобы встречаются достоверно чаще у лиц женского пола в сравнении с мужчинами: «головокружение», «раздражительность», «сонливость» и «снижение аппетита». Обращает внимание жалоба на «головокружение», которая в 3 раза чаще встречается у женщин (66,67%), чем у мужчин (21,2%), $p < 0,05$. Самыми распространенными жалобами при гипотензии независимо от пола являются «вялость, слабость, чувство утомляемости» и «головные боли», достигая 86,67 % среди лиц женского пола и 68,42 % среди лиц мужского пола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баев В.М., Кудрявцева Е.Н., Самсонова О.А. Гендерные различия жалоб у молодых людей при низком артериальном давлении // Врач – аспирант. 2015. Т.70, №5. С. 70–75.
2. Баев В.М., Агафонова Т.Ю., Изумнова О.А. Особенности жалоб при идиопатической артериальной гипотензии у молодых женщин // Пермский медицинский журнал. 2018. Т.35, №2. С. 19–25.
3. Murillo-Godínez G. “Essencial” systemic arterial hypotension // MedIntMex. 2020. Т.36, №4. С. 550–556.
4. Остроумова О.Д., Черняева М.С., Петрова М.М. и др. Ортостатическая гипотензия: определение, патофизиология, классификация, прогностические аспекты, диагностика и лечение // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2018. Т.14, №5. С. 747–756.
5. Баев В.М., Агафонова Т.Ю. Патогенетическая роль автономной нервной системы в ремоделировании сердца при артериальной гипотензии у молодых женщин // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2019; Т.18, №1:67–72. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2019-1-67-72>.
6. Park C.S., Lee H.Y. Clinical utility of sympathetic blockade in cardiovascular disease management // Expert Review of Cardiovascular Therapy. 2017. V.15, N.4. P. 277–288.
7. Дороговцев В.Н., Гречко А.В. Значение ортостатических изменений кровообращения в развитии сосудистых нарушений // Клиническая медицина. 2017. Т.95, №11. С. 977–986.
8. Камышиникова Л.А., Макарян Б.С. Оценка соблюдения принципов здорового образа жизни в молодом возрасте и оценка риска кардиоваскулярной патологии на примере студентов медицинского института // Научный результат. Серия: Медицина и фармация. 2015. Т.1, №2. С. 62–68.

СВЯЗЬ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ С РЕЦИДИВИРОВАНИЕМ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ

И.А. Бахронov¹, Г.В. Какурина¹, Е.А. Сиденко^{1,2}

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия²

Аннотация

Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) характеризуется частым рецидивированием. Опухолевые клетки обладают подвижностью, что служит одним из основных механизмов рецидивирования. Клеточная подвижность регулируется актин-связывающими белками. Недостаточно исследована их связь с развитием рецидивов у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. **Целью** работы было исследование уровня актин-связывающих белков фасцина1 и эзрина, кофилина, профилина и CAP 1 в сыворотке крови больных ПРГШ в зависимости от рецидивирования. В исследование вошел 41 пациент с ПРГШ (T₁₋₄N₀₋₂M₀). Изучение уровня белков в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа. Было показано, что уровни эзрина и кофилина значимо выше в группе больных с рецидивированием по сравнению с больными ПРГШ, у которых рецидивы не развились в течение трех лет после комбинированного лечения. Таким образом, уровни кофилина и эзрина в сыворотке крови могут быть дополнительными факторами, позволяющими выявлять рецидивы ПРГШ.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, рецидивирование, актин-связывающие белки.

ASSOCIATION OF ACTIN-BINDING PROTEINS WITH RECURRENCE OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK

I.A. Bakhronov¹, G.V. Kakurina¹, E.A. Sidenko^{1,2}

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Abstract

Squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) is characterized by frequent recurrence. Tumor cells have mobility, which is one of the main mechanisms of recurrence. Cellular motility is regulated by actin-binding proteins. Their connection with the development of relapses in patients with SCCHN has not been sufficiently studied. The aim of the work was to study the level of actin-binding proteins fascin1 and ezrin, cofilin, profilin and CAP 1 in the blood serum of patients with SCCHN depending on recurrence. The study included 41 patients with head and neck squamous cell carcinoma (T₁₋₄N₀₋₂M₀). The study of the level of proteins in the blood serum was carried out by enzyme immunoassay. It was shown that the levels of ezrin and cofilin significantly higher in the group of patients with relapse compared with patients with SCCHN, who did not develop relapse within three years after combined treatment. Thus, the levels of cofilin and ezrin in the blood serum may be additional factors that allow the detection of relapses of SCCHN.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma, recurrence, actin-binding proteins.

Актуальность. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) представляет собой одну из сложнейших медико-социальных проблем современной онкологии и составляет 5 % от всех выявленных злокачественных опухолей. Ежегодно в мире регистрируется свыше 680 000 новых случаев ПРГШ и более 370 000 больных умирает от этого заболевания [1]. ПРГШ отличается долгим бессимптомным течением, высоким метастатическим потенциалом и частым рецидивированием, который во многом определяется высокой локомоторной подвижностью клеток [2]. Важной проблемой является поиск молекулярных маркеров для прогнозирования течения заболевания [3]. В развитии злокачественных опухолей важную роль играет клеточная подвижность, которая регулируется актин-связывающими белками (АСБ) [4]. Исследования сыворотки крови выявили, что некоторые АСБ могут быть определены в сыворотке крови больных ПРГШ [5]. Актин-связывающие белки регулируют перестройку цитоскелета, обеспечивая подвижность клеток, что служит причиной развития метастазов и рецидивов [6]. Показано, что в процессе локомоции клеток ПРГШ важная роль принадлежит АСБ: фасцину, эзрину, кофилину, профилину и аденилциклаза-ассоциированному протеину 1 (САР 1). Фасцин вовлечен в формирование пучков актина, связан с миграцией и инвазией клеток карциномы в тканях ПРГШ [7, 8]. Эзрин избыточно экспрессируется в тканях ПРГШ и может играть важную роль в миграции и инвазии [9]. САР 1 достаточно недавно идентифицирован в клетках человека, экспрессируется в немышечных клетках и локализуется в актиновых динамических структурах, регулирует динамику перестройки актиновых филаментов и включен в процесс клеточного движения [5]. Чрезмерная экспрессия кофилина была обнаружена в различных типах злокачественных опухолей [10, 11]. Есть данные о сверхэкспрессии профилина 1 при почечно-клеточной карциноме и карциноме гортани [12, 13]. Несмотря на то, что экспрессия генов и уровень АСБ в тканях активно исследуются, большой интерес представляют данные, полученные в результате изучения этих белков в сыворотке крови онкологических больных, что позволит разработать малоинвазивные способы прогнозирования рецидивирования заболевания. **Цель исследования** – изучение уровня актин-связывающих белков фасцина, САР 1, эзрина, кофилина и профилина в сыворотке крови больных ПРГШ в зависимости от рецидивирования.

Материал и методы

В исследование вошел 41 пациент с ПРГШ (T1–4N0–2M0), поступивших на лечение в отделение опухолей головы и шеи НИИ онкологии Томского НИМЦ, и 15 доноров. Средний возраст пациентов составил 56 ± 7 лет. Диагноз был гистологически верифицирован, во всех случаях опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточной карциномы разной степени дифференцировки. До проводимого исследования пациенты не получали специального лечения. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, получено разрешение этического комитета института. Всеми пациентами было дано информированное согласие на проведение исследования. Материалом для исследования явилась сыворотка крови больных, которую получали для исследований в соответствии со стандартным протоколом и хранили при -80°C . Определение АСБ в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом на микропланшетном ридере Multiskan FC 100 (ThermoFisher Scientific) с помощью ИФА наборов. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 10.0 и IBM SPSS Statistics 22.0. Результаты, представленные в таблицах, выражали как Me (Q1;Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили. Значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты

В табл. 1 приведены данные по содержанию актин-связывающих белков в сыворотке крови у больных плоскоклеточным раком области головы и шеи по сравнению со здоровыми донорами. В представленном исследовании наблюдались значимые различия в уровне САР 1. На следующем этапе работы было проведено исследование зависимости уровней исследуемых показателей в сыворотке крови от рецидивирования в течение 3 лет после комбинированного лечения больных ПРГШ. В представленной выборке пациентов прогрессирование опухолевого процесса наблюдалось у 12 (40 %) больных за счет развития рецидивов опухоли в период от 12 до 36 мес. Уровни эзрина и кофилина были значимо выше в группе больных ПРГШ с рецидивированием по сравнению с больными, у которых рецидивы не развились (табл. 2). Это позволяет говорить о существовании зависимости развития рецидивов от уровней эзрина и кофилина, определяемых в сыворотке крови до начала лечебных процедур.

Таблица 1.

Содержание актин-связывающих белков в сыворотке крови больных ПРГШ

Ng/ml	Контроль (n=15)	ПРГШ (n=41)	p
Кофилин	0.84 (0.77;0.93)	0.80 (0.63;1.14)	0.41
Фасцин	5.46 (3.65;6.9)	1,8 (0.43;8.1)	0.07
CAP1	0.025 (0.02;0.028)	0.11 (0.08;1.15)	0.001
Эзрин	2.3 (1.9;2.5)	2.1 (1.69;2.56)	0.89
Профилин	0.26 (0.22;0.29)	0.28 (0.23;0.38)	0.06

Примечание: p – значимость различий в группах.

Таблица 2.

Уровень актин-связывающих белков в сыворотке крови больных ПРГШ в зависимости от развития рецидивов после комбинированного лечения

	R1	R0	p
Фасцин I (нг/мл)	6,05 (0,52; 7,50)	1,18 (0,46; 7,08)	0,45
Эзрин (нг/мл)	2,55 (2,33; 2,715)	1,93 (1,87; 2,53)	0,02
Профилин	22,4 (19,5; 23,82)	19,8 (16,54; 24,07)	0,14
Кофилин	25,6 (24,46; 26,74)	4,21 (3,15; 5,89)	0,03
CAP 1	41,3 (37,89; 53,45)	28,64 (25,46; 39,21)	0,25

Примечания: R1 – рецидив есть, R0 – рецидива нет, p – значимость различий между группами.

Представленные результаты согласуются с данными литературы, указывающими на снижение безрецидивной выживаемости у больных с высоким содержанием эзрина в клетках ПРГШ [14]. Показано, что эзрин вносит существенный вклад в развитие опухолевой прогрессии плоскоклеточного рака гортани и является фактором прогноза этой локализации [15]. Таким образом, уровни эзрина и кофилина в сыворотке крови могут быть дополнительными факторами, позволяющими выявлять рецидивы ПРГШ. Результаты, представленные в данной работе, создали фундаментальную базу для разработки малоинвазивного способа прогнозирования развития рецидивов и обуславливают необходимость дальнейших исследований роли актин-связывающих белков в опухолевой прогрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmitt K., Molfenter B., Laureano N. K., Tawk B., Bieg M., Hostench X. P., Hess J. Somatic mutations and promotor methylation of the ryanodine receptor 2 is a common event in the pathogenesis of head and neck cancer // International journal of cancer. 2019. Vol. 145, № 12. P. 3299–3310.
2. Kostrzewska-Poczekaj M., Byzia E., Soloch N., Jarmuz-Szymczak M., Janiszewska J., Kowal E., Giefing M. DIAPH2 alterations increase cellular motility and may contribute to the metastatic potential of laryngeal squamous cell carcinoma // Carcinogenesis. 2019. Vol. 40, № 10. P. 1251–1259.
3. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Вопросы онкологии. 2012. Т. 58, № 1. С. 26–32.
4. Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. Роль актинсвязывающих белков в клеточном движении в норме и при опухолевом росте // Молекулярная медицина. 2011, № 6. С. 14–18.
5. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. Аденилилизциклаза-ассоциированный белок 1 в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160, № 11. С. 648–651.
6. Tada H., Takahashi H., Ida S., Nagata Y., Chikamatsu K. Epithelial-mesenchymal transition status of circulating tumor cells is associated with tumor relapse in head and neck squamous cell carcinoma // Anticancer Research. 2020. Vol. 40, № 6. P. 3559–3564.
7. Bu M., Liu X., Liu X., Xu W. Upregulation of fascin-1 is involved in HIF-1 α -dependent invasion and migration of hypopharyngeal squamous cell carcinoma // International journal of oncology. 2019. Vol. 55, № 2. P. 488–498.
8. Wahab A., Hyytäinen A., Wahbi W., Tuomainen K., Tervo S., Conesa Zamora P., Al Samadi A. The effect of fascin 1 inhibition on head and neck squamous cell carcinoma cells // European Journal of Oral Sciences. 2021. Vol. 129, № 6. P. e12819.
9. Saito S., Yamamoto H., Mukaisho K. I., Sato S., Higo T., Hattori T., Sugihara H. Mechanisms underlying cancer progression caused by ezrin overexpression in tongue squamous cell carcinoma // PLoS one. 2013. Vol. 8, № 1. P. e54881.
10. Lee M.H., Kundu J.K., Chae J.I., Shim, J.H. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer // Archives of pharmaceutical research. 2019. Vol. 42, № 6. P. 481–491.
11. Qin Y., Li W., Long Y., Zhan, Z. Relationship between p-cofilin and cisplatin resistance in patients with ovarian cancer and the role of p-cofilin in prognosis // Cancer Biomarkers. 2019. Vol. 24, № 4. P. 469–475.
12. Ding Z., Joy M., Bhargava R., Gunsaulus M., Lakshman N., Miron-Mendoza M., Roy P. Profilin-1 downregulation has contrasting effects on early vs late steps of breast cancer metastasis // Oncogene. 2014. Vol. 33, № 16. P. 2065–2074.
13. Adami G. R., O'Callaghan T. N., Kolokythas A., Cabay R. J., Zhou Y., Schwartz J. L. A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma // Journal of Oral Pathology & Medicine. 2017. Vol. 46, № 7. P. 489–495.
14. Schlecht N. F., Brandwein-Gensler M., Smith R. V., Kawachi N., Broughel D., Lin J., Prystowsky M. B. Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma // Head and neck pathology. 2012. Vol. 6, № 2. P. 232–243.
15. Gao W., Zhang C., Feng Y., Chen G., Wen S., Huangfu H., Wang B. Fascin-1, ezrin and paxillin contribute to the malignant progression and are predictors of clinical prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 11. P. e50710.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛЮНЫ ПРИ РАЗНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.В. Бельская

Омский государственный педагогический университет, г. Омск, Россия

Аннотация

Выявлены 12 биохимических показателей слюны, изменение которых может характеризовать метаболические особенности разных молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы (РМЖ). Различия с контрольной группой для всех подтипов РМЖ обусловлены содержанием белка, α -аминокислот и мочевины, а также активностью каталазы, гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и α -амилазы. Различия между молекулярно-биологическими подтипами РМЖ обусловлены содержанием продуктов липопероксидации. При этом близки между собой оказались группы люминального А и нелюминального рака груди, а также обе подгруппы люминального В рака.

Ключевые слова: слюна, рак молочной железы, молекулярно-биологический подтип, биохимия.

METABOLIC FEATURES OF SALIVA IN DIFFERENT MOLECULAR BIOLOGICAL SUBTYPES OF BREAST CANCER

L.V. Bel'skaya

Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

Abstracty

Twelve biochemical indicators of saliva have been identified, the change in which can characterize the metabolic features of different molecular biological subtypes of breast cancer. Differences with the control group for all subtypes of breast cancer are due to the content of protein, α -amino acids and urea, as well as the activity of catalase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and α -amylase. Differences between the molecular biological subtypes of breast cancer are due to the content of lipid peroxidation products. At the same time, the groups of luminal A and non-luminal breast cancer, as well as both subgroups of luminal B cancer, turned out to be close to each other.

Key words: saliva, breast cancer, molecular biological subtype, biochemistry.

Актуальность. Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространенная женская онкологическая патология во всем мире [1]. Несмотря на улучшение ранней диагностики и активное использование адъювантного лекарственного лечения, 5-летний период наблюдения в России переживают всего 59 % пациенток, а смертность от РМЖ в России не снижается вследствие выявления заболевания на поздних сроках [2]. Современный уровень знаний о молекулярных механизмах возникновения и развития РМЖ, его чувствительности или резистентности к различным препаратам, воздействиям позволяет осуществить переход от усредненных стандартных схем терапии к так называемой «персонализированной медицине», т. е. назначению лечения в соответствии с индивидуальными особенностями больного и биологическими характеристиками опухоли [3]. Определение молекулярно-генетических характеристик возможно только после хирургического лечения или биопсии опухоли, причем результаты могут быть значительно искажены после проведения предоперационной химио- и лучевой терапии. Для некоторых пациенток данные о молекулярных характеристиках опухоли не могут быть получены по ряду причин. Так, в нашей выборке пациенток с РМЖ у 9,8 % отсутствуют результаты ИГХ, что накладывает определенные ограничения на выбор лечебной тактики и выявление прогноза заболевания. В связи с этим необходим поиск альтернативных неинвазивных маркеров, позволяющих характеризовать отдельные типы опухолей и выступающих в качестве диагностических и прогностических признаков. Ряд авторов для этой цели предлагает использовать слюну [4, 5]. В настоящей работе нами

была исследована взаимосвязь биохимических показателей слюны и молекулярных характеристик опухолей при РМЖ.

Материал и методы

В исследование включены 487 пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ и 298 добровольцев, у которых при плановой диспансеризации не было выявлено патологий молочных желез. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациенток 30–75 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент включения в исследование, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого. В каждом случае проведено определение молекулярно-биологического подтипа РМЖ, в том числе: люминальный А ($n=64/13,1\%$), люминальный В HER2-положительный ($n=230/47,4\%$), люминальный В HER2-отрицательный ($n=63/12,9\%$), нелюминальный ($n=38/7,8\%$) и базальноподобный ($n=28/5,7\%$).

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 5 мл. Во всех образцах определяли pH, минеральный состав (кальций, фосфор, натрий, калий, магний, хлориды), содержание мочевины, общего белка, альбумина, мочевой кислоты, α -аминокислот, имидазольных соединений, серогликоидов, сиаловых кислот, молочной и пировиноградной кислот, оксида азота (NO), а также активность ферментов (аминотрансферазы – ALT, AST; щелочная фосфатаза – ALP; лактатдегидрогеназа – LDH; гамма-глутамилтранспептидаза – GGT; α -амилаза). Дополнительно определяли содержание субстратов процессов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов – DC, триеновых конъюгатов – TC, оснований Шиффа – SB, малонового диальдегида – MDA), уровень молекул средней массы (ММ 254 и 280 нм). Оценивали антиоксидантную активность, активности антиоксидантных ферментов (каталазы – CAT, супероксиддисмутазы – SOD) и пероксидазы. Исследование одобрено на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

Результаты

На первом этапе исследования методом главных компонент было показано, что биохимический состав слюны при разных молекулярно-биологических подтипах рака груди имеет различия (рис.1).

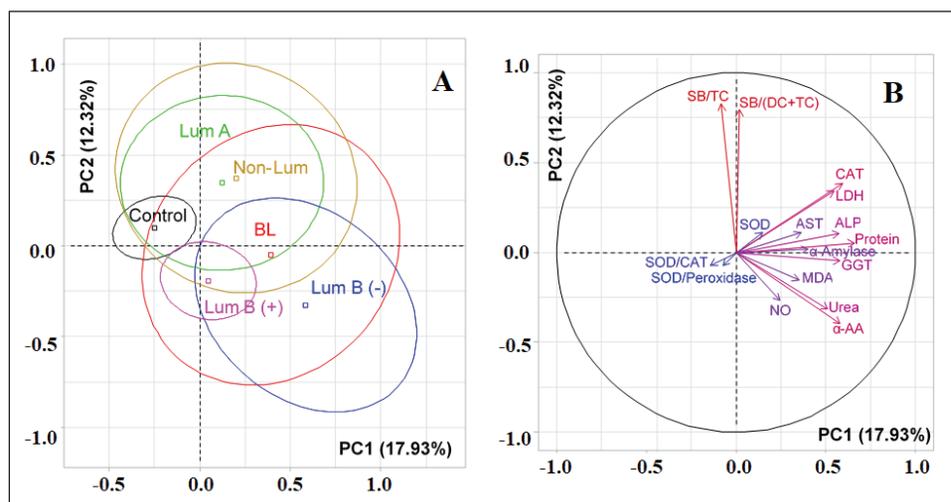


Рис. 1. Факторная диаграмма (А) и корреляционный круг (В) для разделения молекулярно-биологических подтипов РМЖ по составу слюны методом главных компонент

Первая главная компонента (PC1) разделяет между собой контрольную группу (левее вертикальной оси) и все группы пациентов с РМЖ (правее вертикальной оси) (рис. 1а). Максимальный вклад в разделение вносят белок ($r=0,6587$), суммарное содержание α -аминокислот ($r=0,5804$) и мочевины ($r=0,5088$), а также активности каталазы ($r=0,5933$), ГГТ ($r=0,5756$), ЩФ ($r=0,5732$), ЛДГ ($r=0,5451$) и α -амилазы ($r=0,4008$). Разделение по PC1 статистически значимо ($p=0,0052$). Разделение групп относительно горизонтальной оси (PC2) обусловлено вкладом показателей липопероксидации, высокие коэффициенты корреляции определены для SB/TC-ratio и SB/(DC+TC)-ratio и составили 0,8241 и 0,7935 соответственно (рис.1б). При этом близки между собой группы люминального А и нелюминального рака груди, а также обе подгруппы люминального В рака груди (рис. 1а).

Мы выделили 12 биохимических показателей, различия в содержании которых между группами статистически значимы (рис.2). Показано, что содержание общего белка снижалось во всех группах, однако только для люминальных подтипов оно было статистически значимо. На фоне снижения содержания белка увеличивалось содержание α-аминокислот и мочевины.

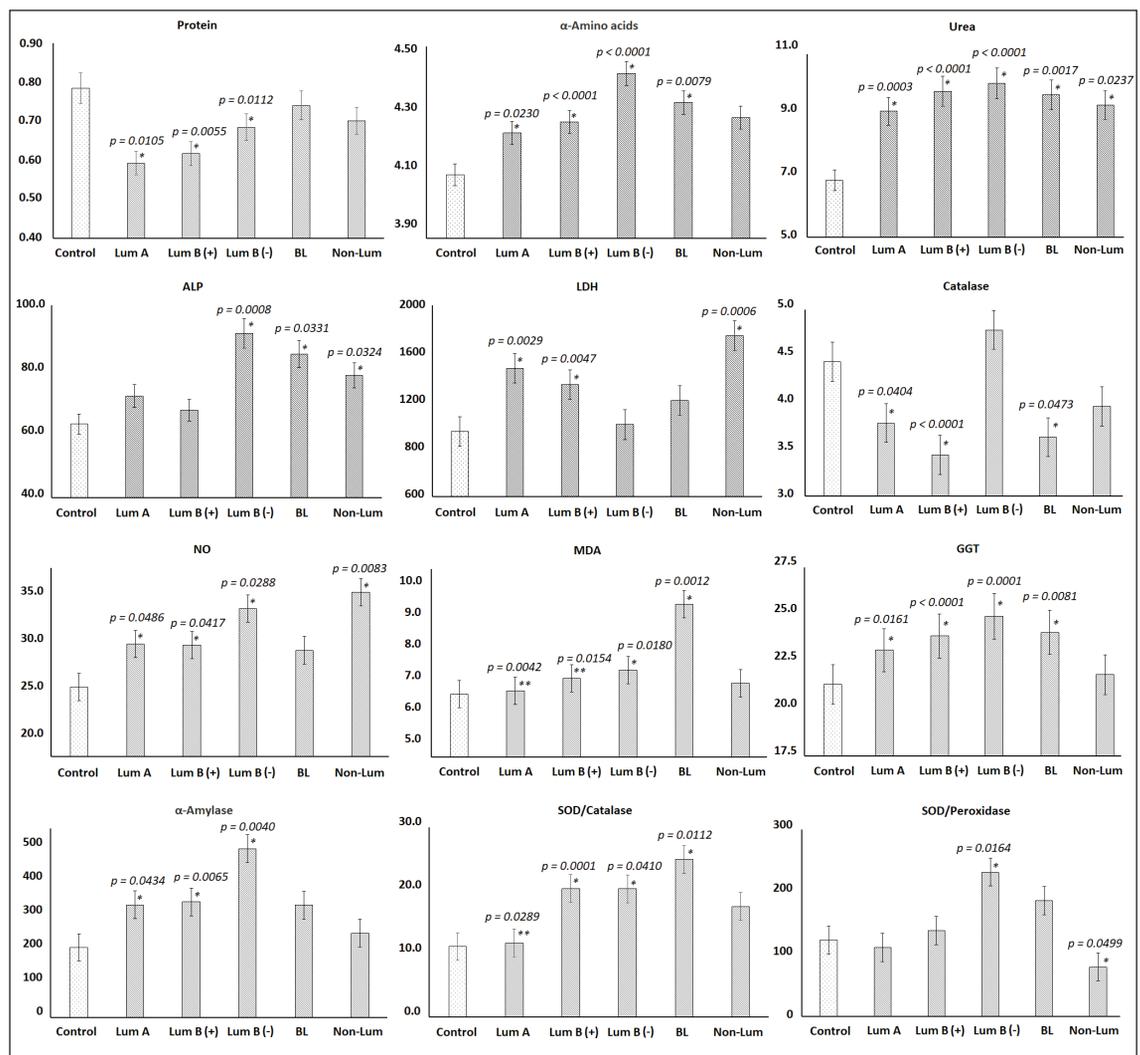


Рис.2. Значения биохимических показателей слюны для разных молекулярно-биологических подтипов РМЖ, * - различия с контрольной группой статистически значимы; ** - различия с базально подобным РМЖ (BL) статистически значимы

Активность ферментов меняется неоднозначно, так, по характеру изменения активности ферментов близки подгруппы люминального А и В (HER2-положительного) рака груди. Для этих подгрупп характерно незначительное увеличение активности ЩФ, рост активности ЛДГ и ГГТ, а также резкое снижение активности каталазы. Для люминального В (HER2-отрицательного) рака груди активности ЩФ и ГГТ достигают максимальных значений, тогда как активности ЛДГ и каталазы практически не меняются. Для всех люминальных подтипов рака груди показано статистически значимое увеличение активности α-амилазы. Для всех подгрупп кроме нелюминального рака груди установлено увеличение коэффициента СОД/Каталаза, тогда как для нелюминальной подгруппы статистически значимо снижение коэффициента СОД/Пероксидаза (рис.2). Для базально подобного рака отмечено максимально высокое содержание токсичных продуктов липопероксидации, в частности МДА, на фоне минимальной активности каталазы.

Выводы

Выявлены 12 биохимических показателей слюны, изменение которых может характеризовать метаболические особенности разных молекулярно-биологических подтипов РМЖ.

На следующем этапе исследования планируется сравнить биохимический состав слюны при разделении групп по уровню экспрессии HER2, рецепторов эстрогена и прогестерона, чтобы понять, какой из этих показателей обуславливает максимальное различие между группами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* 2021. Vol. 71. P. 209–249.
2. Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А., Комов Д.В., Карсладзе А.И., Ермилова В.Д., Вишневская Я.В. Гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое и прогностическое значение // *Злокачественные опухоли.* 2015. Т. 1. С. 31–40.
3. Кушлинский Н.Е., Красильников М.А. Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования. М.: Изд-во РАМН. 2017. 632 с.
4. Murata T., Yanagisawa T., Kurihara T., Kaneko M., Ota S., Enomoto A., Tomita M., Sugimoto M., Sunamura M., Hayashida T., Kitagawa Y., Jinno H. Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination // *Breast Cancer Res Treat.* 2019. Vol. 177, № 3. P. 591–601.
5. López-Jornet P., Aznar C., Ceron J., Asta T. Salivary biomarkers in breast cancer: a cross-sectional study // *Supportive Care in Cancer.* 2021. Vol. 29. P. 889–896.

ФОРМИРОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩЕННОЙ ДОЗЫ МЕДИЦИНСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ПУЧКА С ПОМОЩЬЮ МОДУЛЬНОГО КОЛЛИМАТОРА

Е.А. Бушмина¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹,
И.А. Милойчикова^{1,2}, Ю.М. Черепенников¹, С.Г. Стучебров¹

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

На сегодняшний день злокачественные образования слизистой оболочки полости носа и придаточных пазух составляют 3 % всех случаев опухолевых заболеваний головы и шеи. Проведение электронной лучевой терапии позволяет достичь хороших терапевтических результатов при лечении локально распространенных опухолей носа и носовых пазух. Для улучшения методики проведения электронной лучевой терапии необходимо использовать дополнительные средства формирования электронного пучка. В данной работе предлагается использовать метод трехмерной печати для изготовления таких устройств – коллиматоров. Трехмерная печать представляет собой процесс создания объемных изделий из цифровых моделей, что позволяет изготавливать объекты с высокой точностью и быстротой. В исследовании был разработан модульный коллиматор для электронной лучевой терапии полости носа и придаточных пазух. Коллиматор был изготовлен с помощью технологий трехмерной печати. В работе для изготовления модульного коллиматора был использован 3D-принтер FlashForge Creator 3. В качестве материала был выбран ХИПС-пластик. Модель коллиматора была разработана для часто встречающихся локализаций опухолей носа и придаточных пазух – в данной работе выделяется 4 локализации. Были получены распределения поглощенной дозы электронов, сформированные данным коллиматором. В качестве источника излучения использовался терапевтический линейный ускоритель Elekta Synergy, в качестве детектора излучения – матричный детектор MatriXX Evolution. Распределения поглощенной дозы были обработаны с помощью программного обеспечения MatLab. Разработанный модульный коллиматор позволяет сформировать поля облучения в четырех разных конфигурациях. Полученные распределения поглощенной дозы позволяют говорить о том, что сформированные поля облучения однородны и доза в области электронного поля, закрытого коллиматором, менее 5 %.

Ключевые слова: клинический ускоритель, электронная лучевая терапия, медицинский электронный пучок, коллиматор, трехмерная печать.

FORMATION OF THE ABSORBED DOSE DISTRIBUTION OF A MEDICAL ELECTRON BEAM USING A MODULAR COLLIMATOR

E.A. Bushmina¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹,
I.A. Miloichikova^{1,2}, Yu.M. Cherepennikov¹, S.G. Stuchebrov¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Abstract

To date, malignant formations of the mucous membrane of the nasal cavity and paranasal sinuses account for 3% of all cases of tumor diseases of the head and neck. Conducting electron beam therapy allows to achieve good therapeutic results in the treatment of locally advanced tumors of the nose and sinuses. To improve the technique of conducting electron beam therapy, it is necessary to use additional means of forming an electron beam. In this paper, it is proposed to use the 3D printing method for the manufacture of such devices - collimators. 3D printing is a process of creating three-dimensional products from digital models, which allows you to create products with high accuracy and speed. The study developed a modular collimator for electron beam therapy of the nasal cavity and paranasal sinuses. The collimator was made using 3D printing technologies. In the work, a FlashForge Creator 3 3D printer was used to manufacture a modular collimator. HIPS plastic was chosen as the material. The collimator model was developed for the frequently occurring sites of tumors of the nose and paranasal sinuses - 4 sites are distinguished in this work. The distributions of the absorbed dose of electrons formed by this collimator were obtained. An Elekta Synergy therapeutic linear accelerator was used as a radiation source, and a MatriXX Evolution matrix detector was used as a radiation detector. The absorbed dose distributions were processed using the MatLab software. The developed modular collimator makes it possible to form irradiation fields in four different configurations. The obtained distributions of the absorbed dose allow us to say that the generated irradiation fields are homogeneous and the dose in the region of the electron field covered by the collimator is less than 5%.

Key words: clinical accelerator, electron beam therapy, medical electron beam, collimator, 3D printing.

Актуальность. Рак слизистой оболочки полости носа и придаточных пазух составляет 3 % всех случаев опухолей головы и шеи. Проведение электронной лучевой терапии позволяет достичь хороших терапевтических результатов при лечении локально распространенных опухолей носа и носовых пазух [1,2].

Для улучшения методики проведения электронной лучевой терапии необходимо использовать дополнительные средства формирования электронного пучка. В данной работе предлагается использовать метод трехмерной печати для изготовления таких устройств. 3D-печать представляет собой процесс создания объемных изделий из цифровых моделей. С помощью трехмерного моделирования можно создать сложные или простые объекты с высокой точностью. Также быстрота изготовления изделий на 3D-принтерах является одним из ключевых качеств данного метода производства. Наиболее широкое применение 3D-печать нашла в медицине, данный метод широко используют в стоматологии и ортопедии [3,4]. Также этот подход эффективно применяется в лучевой терапии и планировании лучевой терапии [5,6].

Технологии трехмерной печати позволяют улучшить процесс планирования лучевой терапии, облегчить иммобилизацию пациентов, создать более точное поле облучения или компенсировать дозу облучения пациента. Особую роль уделяют коллиматорам, изготовленным посредством аддитивных технологий, которые затем используют для формирования дозных полей облучения при лучевой терапии. Существующие подходы к созданию металлических коллиматоров (резка и плавка) имеют ряд следующих ограничений: дорогостоящее оборудование, необходимость наличия специально обученного персонала и помещения [7].

Поэтому в данной работе для изготовления модульного коллиматора для лечения опухолей носа и носовых пазух был выбран метод трехмерной печати.

Целью исследования стало формирование распределений поглощенной дозы от медицинского электронного пучка при помощи модульного пластикового коллиматора.

Материал и методы

В работе для изготовления модульного коллиматора был использован 3D-принтер FlashForge Creator 3 (FlashForge, Китай) [8]. В качестве материала был выбран ХИПС-пластик (Bestfilament, Россия) [9], данный пластик обладает высокой степенью ударопрочности и влагоустойчивости.

В эксперименте осуществлялось формирование распределения поглощенной дозы от электронного пучка с помощью изготовленного модульного коллиматора. Облучение проводилось электронным пучком с энергией 9 МэВ, генерируемым линейным ускорителем Elekta Synergy (Elekta, Великобритания) [10] в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (г. Москва). В качестве детектора получаемой дозы был использован матричный детектор MatriXX Evolution (IBADosimetry, США) [11]. Измерения проводились на глубине водного максимума электронного пучка с энергией 9 МэВ в пластинчатом водозэквивалентном фантоме RW3 (PTW-Freiburg, Германия) [12]. Эксперимент проводился при стандартных условиях облучения, максимальная доза облучения составила 1 Гр. Расстояние между источником излучения и поверхностью фантома (РИП) равно 100 см. Толщина коллиматора равна 5 см. Такая толщина коллиматора полностью поглощает энергию пучка 9 МэВ [13].

Далее для каждого коллимационного отверстия было получено распределение поглощенной дозы с помощью программного обеспечения MatLab (The MathWorks, США) [14].

Результаты

На рис. 1 представлены цифровые модели разработанного модульного коллиматора и вставок. Модель коллиматора была разработана для часто встречающихся локализаций опухолей носа и придаточных пазух – в данной работе выделяется 4 локализации.



Рис. 1. Объемные цифровые модели коллиматора и вставок (слева) и варианты их размещения (справа)

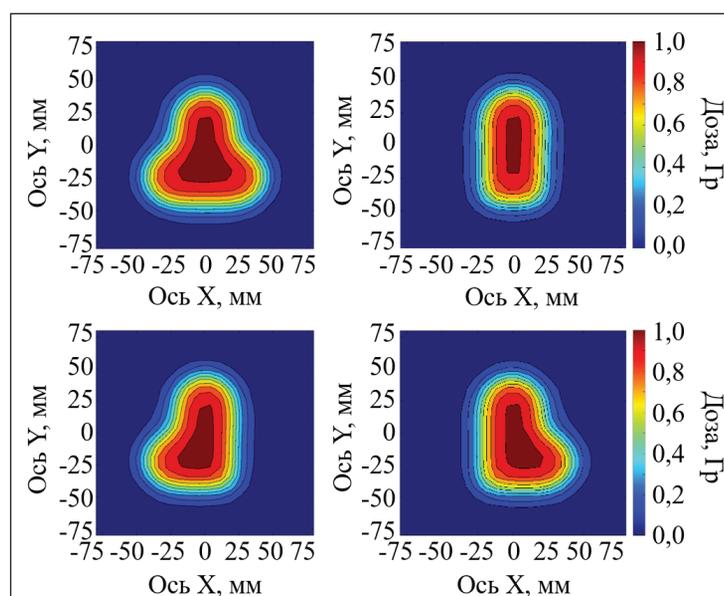


Рис. 2. Распределения поглощенной дозы, получаемые коллимационными отверстиями

На рис. 1 видно, что разработанный коллиматор позволяет сформировать 4 конфигурации электронного поля. Для обеспечения равномерности поля облучения необходимо нивелировать возможное рассеяние электронов в области соединения вставок и основы коллиматора. Для этого было принято решение по центру толщины коллиматора предусмотреть пазы (рис.1).

На рис. 2 представлены распределения поглощенной дозы, экспериментально полученные с помощью всех конфигураций разработанного коллиматора.

Исходя из полученных распределений поглощенной дозы (рис. 2), видно, что разработанный модульный коллиматор позволяет сформировать поля облучения в четырех разных конфигурациях. Сформированное поле облучения однородно. На границах стыков разных элементов коллиматора завышение дозы отсутствует. Рассеяние пучка на границах коллимационного отверстия незначительно. Доза в области поля закрытого коллиматором менее 5 %.

Выводы

В рамках исследования было показано, что разработанная конструкция коллиматора является универсальной и позволяет сформировать электронное поле облучения четырех разных конфигураций. Простота использования и изготовления пластикового коллиматора позволят ему стать востребованным средством в электронной лучевой терапии, в том числе для лечения опухолей носа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 19-79-10014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кропотов М.А. и др. Рак кожи носа. Возможности пластического замещения дефектов при хирургическом лечении // Опухоли головы и шеи. 2014. №. 1.
2. Hogstrom K. R., Almond P.R. Review of electron beam therapy physics // Physics in Medicine & Biology. 2006. Vol. 51, № 13. P. R455-79
3. The value of 3D Printing in Orthopaedics. Umesh Persad – Caribbean medical journal, November 2020 [Электронный ресурс]. – <https://www.caribbeanmedicaljournal.org/2020/11/03/the-value-of-3d-printing-in-orthopaedics>.
4. Bergmann C. et al. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses // Journal of the European Ceramic Society. 2010. Vol. 30, № 12. P. 2563–2567.
5. Tino R. et al. A systematic review on 3D-printed imaging and dosimetry phantoms in radiation therapy // Technology in cancer research & treatment. 2019. Vol. 18. P. 1533033819870208.
6. Crowe S. Personalized phantoms through 3D printing // Radiother Oncol. 2019. Vol. 133. №. S1. P. s362.
7. Милойчикова И.А., Гавриков Б.М., Булавская А.А., Черепеников Ю.М., Шевченко М.В., Стучебров С.Г. Сравнение эффективности формирования терапевтических пучков электронов металлическими коллиматорами и изделиями, изготовленными методом быстрого прототипирования // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2018. Т. 15, № 7 (219). С. 964–969.
8. Creator 3 – FlashForge [Электронный ресурс]. – <https://www.flashforge.com/product-detail/1>.
9. HIPS-пластик. Bestfilament [Электронный ресурс]. – <https://bestfilament.ru/hips-1-175-white-2>.
10. Linear accelerator Elekta Synergy [Электронный ресурс]. – <https://www.elekta.com/radiotherapy/treatment-delivery-systems/elekta-synergy>.
11. MatriXX Evolution [Электронный ресурс]. – <https://www.iba-dosimetry.com/product/matrixx-universal-detector-array>.
12. RW3 Slab Phantom [Электронный ресурс]. – <https://www.ptwdosimetry.com/en/products/rw3-slab-phantom>.
13. Stuchebrov S. G. et al. Influence of 3D-printed collimator thickness on near-the-edge scattering of high-energy electrons // Journal of Instrumentation. 2020. Vol. 15, №. 04. P. C04023
14. MATLAB [Электронный ресурс]. – <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>.

КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ ОДИНОЧНОГО МЕТАСТАЗА В ГРУДИНЕ ПАПИЛЛЯРНОЙ МИКРОКАРЦИНОМЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Э.Х. Гаджиева, Т.М. Гелиашвили, А.К. Валиев, И.С. Романов, Т.К. Харатишвили, А.Г. Сальков, А.И. Пронин, П.В. Кононец

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, Россия

Аннотация

Метастазирование в грудину, встречаясь крайне редко при дифференцированном раке щитовидной железы (ДРЩЖ), требует к лечению персонализированного мультидисциплинарного подхода. Представляем клинический случай одиночного метастаза (МТС) в грудине папиллярной микрокарциномы щитовидной железы у мужчины 55 лет. После тиреоидэктомии у пациента по данным ПЭТ/КТ с ¹⁸F-ФДГ был подтвержден одиночный характер костного метастазирования с крайне высоким поглощением ФДГ

метастазом в груди, что прогнозировало его радиоiodодрефрактерность (РЙР). В связи с тесным прилежанием к органам средостения и быстрым ростом МТС в груди был признан нерезектабельным. В последующие три месяца пациент получал таргетную терапию тирозинкиназным ингибитором (ТКИ) – препаратом Ленватиниб. Также была проведена радиоiodтерапия (РЙТ), по результатам которой подтверждена РЙР опухолевого процесса. На фоне проводимой системной терапии (таргетная терапия в сочетании с РЙТ и супрессивной гормонотерапией L-тироксина) был отмечен частичный ответ со значительным уменьшением размеров МТС, что позволило выполнить его хирургическое лечение – экстирпацию грудины с заменой её индивидуальным титановым имплантатом. При оценке ответа на проведенное лечение по данным ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ в области удаленного МТС в груди выявлены участки метаболизма ^{18}F -ФДГ послеоперационного характера. Также по ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ на ранней (метаболической) стадии обнаружены два новых костных МТС (в области L3 и правой подвздошной кости), на которые в последующем проведена дистанционная лучевая терапия (ДЛТ). В настоящее время пациент находится под динамическим наблюдением и в процессе супрессивной гормонотерапии L-тироксина. Таким образом, только благодаря раннему назначению таргетной терапии ТКИ удалось выполнить хирургическую резекцию МТС в груди, тем самым улучшить качество жизни пациента и сохранить возможность радикального лечения в случае прогрессирования с проявлениями олигометастатической болезни.

Ключевые слова. Дифференцированный рак щитовидной железы, метастаз в груди, радиоiodтерапия, радиоiodодрефрактерный рак, таргетная терапия, леватиниб.

COMBINED TREATMENT OF THE SOLITARY STERNAL METASTASIS OF PAPILLARY THYROID MICROCARCINOMA: A CLINICAL CASE.

E.H. Gadzhieva, T.M. Geliashvili, A.K. Valiev, I.S. Romanov, T.K. Kharatishvili, A.G. Salkov, A.I. Pronin, P.V. Kononets

N.N. Blokhin Scientific Research Center for Oncology, Moscow, Russia

Annotation

Sternal metastasis, while extremely rare in differentiated thyroid cancer (DTC), requires a personalized multidisciplinary approach to treatment. We present a clinical case of solitary sternal metastasis (MTS) of papillary thyroid microcarcinoma in a 55-year-old man. After thyroidectomy, the patient's ^{18}F -FDG PET/CT data confirmed the solitary nature of bone metastasis with extremely high FDG uptake by the sternal metastasis, which predicted its radioiodine-refractory (RIR). Due to close attachment to the mediastinum and rapid growth, MTS was considered unresectable. During the next three months the patient received targeted therapy with the tyrosine kinase inhibitor (TKI) Lenvatinib. Radioiodine therapy (RIT) was also performed, the results of which confirmed the RIR of the tumor process. As a result of systemic therapy (targeted therapy combined with RIT and suppressive hormone therapy with L-thyroxine), there was a partial response with a significant decrease in tumor size, which allowed performing surgical treatment of MTS - sternal extirpation with its replacement by an individual titanium implant. When assessing the response to the treatment, ^{18}F -FDG PET/CT revealed postoperative areas of ^{18}F -FDG metabolism in the removed sternal MTS. Also, ^{18}F -FDG PET/CT revealed two new bone MTS (in the area of L3 and right iliac bone) in the early (metabolic) stage, which were subsequently treated with external beam radiation therapy (EBRT). At present, the patient is under dynamic monitoring and in the process of suppressive hormone therapy with L-thyroxine. Thus, only due to the early prescription of targeted TKI therapy was it possible to perform surgical resection of the sternal MTS, thereby improve the patient's quality of life and preserve the possibility of radical treatment in case of oligometastatic disease progression.

Key words: Differentiated thyroid cancer, sternal metastasis, radioiodine therapy, radioiodine-refractory cancer, targeted therapy, lenvatinib.

Актуальность. При ДРЦЖ метастазы в костях развиваются в 2-13% всех случаев и являются второй по частоте локализацией (после легких) отдаленного метастазирования [1,2]. Костные МТС при ДРЦЖ ассоциируются с неблагоприятным прогнозом заболевания, поскольку плохо поддаются РЙТ и в сравнении с МТС других локализаций чаще и быстрее становятся РЙР [3]. Одиночные МТС в груди при ДРЦЖ встречаются крайне редко, около 0,4 % [4]. В клинических рекомендациях и по данным литературы отсутствует единый алгоритм лечения таких состояний, однако все специалисты сходятся во мнении,

что только удаление опухоли может обеспечить пациенту безрецидивную выживаемость с хорошим качеством жизни в 70% всех случаев [5,6]. При агрессивно растущих МТС в груди, которые быстро становятся нерезектабельными, особенно важен комплексный лечебно-диагностический подход.

Цель – проанализировать и оценить результаты диагностики и лечения редкого клинического случая одиночного МТС в груди папиллярной микрокарциномы щитовидной железы.

Материал и методы

Верификация диагнозов проводилась цитологическими исследованиями пунктатов с опухоли щитовидной железы и грудины, гистологическим и иммуногистохимическим исследованиями материала с открытой биопсии опухоли грудины, а также послеоперационным гистологическим исследованием после резекции опухоли грудины. Все ПЭТ/КТ исследования с ^{18}F -ФДГ проведены по стандартной методике. Первый курс РИТ проведен изотопом ^{131}I с активностью 6 ГБк и со стимуляцией тиреотропного гормона (ТТГ) человеческим рекомбинантным тиреотропным гормоном. Повторный курс РИТ проведен также с активностью ^{131}I 6 ГБк, но стандартной стимуляцией ТТГ – 4-недельной отменой L-тироксина. Таргетную терапию Ленватинибом пациент получал в стандартной дозировке 24 мг в сутки. Хирургическое удаление МТС в груди включало следующие этапы: выделение торакодorzального лоскута, резекция грудной стенки с экстирпацией грудины, резекция хрящевых отрезков 1–5 ребер, больших и малых грудных мышц, фиксация индивидуального титанового имплантата и закрытие дефекта грудной стенки доракодorzальным лоскутом.

Результаты

Пациент в январе 2020 г. отметил чувство жжения в области грудины, где впоследствии, в декабре 2020 г., обнаружил небольшое уплотнение. В декабре 2020 г. по данным цитологического исследования пунктата с новообразования грудины (2x3 см) выставлен диагноз – фибролипома. После пункционной биопсии был отмечен быстрый рост новообразования грудины, в связи с чем в марте 2021 г. выполнена открытая биопсия новообразования. По результатам гистологического исследования обнаружен папиллярный рак, который подтвержден иммуногистохимическим исследованием – экспрессией опухолевыми клетками тиреоглобулина, цитокератина и ТТГ-1. С апреля 2021 г. по настоящее время пациент проходит обследование и лечение в НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина. При поиске первичного очага по УЗИ в щитовидной железе было обнаружено образование 6 мм, при пункционной биопсии которого цитологически подтвержден папиллярный рак. В смыве с пункционной иглы пунктата из опухоли грудины уровень тиреоглобулина составил 339 нг/мл, что свидетельствовало о принадлежности МТС к папиллярному раку щитовидной железы. Первым этапом 28.04.2021 было проведено хирургическое лечение первичной опухоли в объеме тиреоидэктомии и центральной шейной лимфодиссекции, по результатам гистологического исследования подтвержден папиллярный рак щитовидной железы (узел размером 8 мм, без прорастания в капсулу и окружающую ткань железы, удаленные лимфатические узлы без признаков опухолевого роста). После тиреоидэктомии назначена гормонотерапия L-тироксином в дозе максимальной супрессии ТТГ. В мае 2021 г. выполнено ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ с целью уточнения распространенности метастатического процесса, степени дифференцировки МТС в груди, а также для прогнозирования чувствительности к планируемой РИТ и развития РИР. По данным ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ был подтвержден одиночный характер костного метастазирования, а крайне высокое поглощение ФДГ ($\text{SUV}_{\text{max}}=71,1$) метастазом в груди свидетельствовало о низкой дифференцировке опухоли и прогнозировало РИР (Рис.1).

В связи с тесным прилеганием к органам средостения и быстрым ростом, МТС в груди был признан нерезектабельным. Мультидисциплинарной командой было принято решение о срочном назначении таргетной терапии ТКИ Ленватиниба в качестве «неoadьюватной» терапии одиночного МТС в груди, с перспективой перевода нерезектабельной опухоли в резектабельную и выполнения максимально радикального лечения – хирургической резекции. С июля по октябрь 2021 г. пациент получал терапию Ленватинибом без значимых токсических реакций и редукции дозы. Также в августе 2021 г. была проведена РИТ, по результатам посттерапевтического сканирования подтверждена РИР опухолевого процесса. При оценке эффективности комбинированной системной терапии (ТКИ в сочетании с РИТ и супрессивной гормонотерапией L-тироксином) отмечен биохимический ответ (снижение уровня сывороточного тиреоглобулина с 50 000 нг/мл до 550 нг/мл); по данным ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ в 09.2021 г. наблюдался частичный ответ с уменьшением размеров опухоли (с 80x69x123 мм до 65x50x112 мм) и снижением накопления ФДГ (SUV_{max} с 71,1 до 63) (рис.2).



Рис.1. ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ 01.06.2021 г., аксиальный срез: массивное опухолевое образование тела грудины – 80x69x123 мм с $\text{SUV}_{\text{max}}=71$; разрушает тело грудины, распространяясь в мягкие ткани грудной стенки с их инфильтрацией и ретростернально, без вовлечения в опухолевый процесс органов средостения. В участке нарушения переднего кортикального слоя дистального отрезка первого ребра слева на уровне сочленения с грудиной с SUV_{max} до 5,27

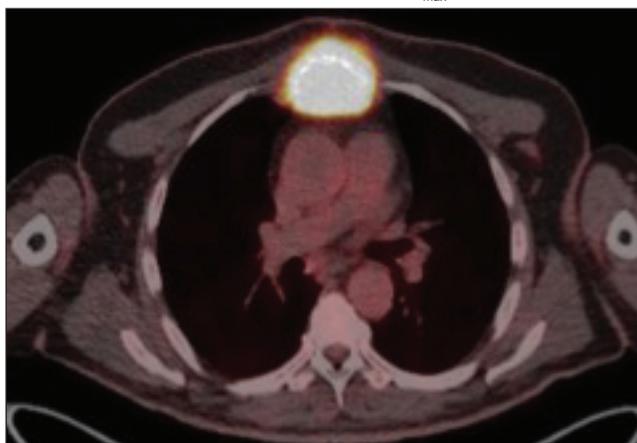


Рис. 2. ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ 17.09.2021 г., аксиальный срез: опухолевое образование тела грудины – 65x50x112 мм с $\text{SUV}_{\text{max}}=63$; разрушает тело грудины, распространяясь в мягкие ткани грудной стенки и ретростернально, без вовлечения в опухолевый процесс органов средостения

Благодаря такому ответу на проводимую терапию появилась возможность выполнить хирургическое лечение МТС в грудине, и 07.12.2021 была проведена экстирпация грудины с заменой её индивидуальным титановым имплантатом. Согласно гистологическому исследованию резецированного МТС грудины, он имел размеры 5x3x5 см, прорастал в кость, мышечную и жировую ткань; края резекции по мягким тканям и коже были без опухолевого роста (R0). По данным ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ в динамике от 31.01.2022 в области удаленной грудины были выявлены участки метаболизма ^{18}F -ФДГ (до $\text{SUV}_{\text{max}}=7,66$), которые расценены как послеоперационные изменения. Однако в режиме ПЭТ на ранней (метаболической) стадии были выявлены два новых костных МТС – в L3 (на фоне склеротических изменений с $\text{SUV}_{\text{max}}=17,32$) и в теле правой подвздошной кости (без явных очаговых изменений по КТ с $\text{SUV}_{\text{max}}=13,73$). На повторном курсе РИТ новые костные МТС, как и удаленный МТС в грудине, оказались радиододрефрактерными. При этом стимулированный уровень тиреоглобулина составил лишь 134 нг/мл. В феврале 2022 г. на вновь выявленные олигометастатические костные очаги была проведена ДЛТ с РОД 8 Гр до СОД 32 Гр. В настоящее время пациент продолжает получать супрессивную гормонотерапию L-тироксином и находится под динамическим наблюдением (запланировано проведение контрольной ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ).

Заключение

В нашей клинической ситуации таргетная терапия МТС в грудине ТКИ Ленватинибом позволила перевести нерезектабельный опухолевый процесс в резектабельный и выполнить его хирургическую резекцию. ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ позволяла своевременно и правильно оценивать распространенность метастатического процесса и ответ на проводимую терапию.

Таким образом, очевидно, что каждый подобный клинический случай требует персонализированного мультидисциплинарного подхода как к лечению, так и к диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nervo A., Ragni, A., Retta F. et al.* Bone metastases from differentiated thyroid carcinoma: current knowledge and open issues. *J Endocrinol Invest* 44, 403–419 (2021).
2. *Nicole M. Iñiguez-Ariza, Keith C. Bible, and Bart L. Clarke*//Bone metastases in thyroid cancer // *J Bone Oncol* // 2020.
3. *Hanqing Liu, Dan Yang Lingrui Li, Yi Tu.* Appraisal of radioiodine refractory thyroid cancer: advances and challenges // *Cancer Res* // 2020.
4. *Osorio M., Moubayed S.P., Su H., Urken M.L.* Systematic review of site distribution of bone metastases in differentiated thyroid cancer // *Head Neck* // p. 39 // 2017.
5. *A. Eroglu, N. Karaoglanoglu, H. Bilen, N. Gursan.* Follicular thyroid carcinoma: metastasis to the sternum, 13 years after total thyroidectomy, // the international journal of clinical practice, // 11 October 2006.
6. *R. Mssrouri · E. Mohammadine, S. Benamr.* Sternal metastasis from differentiated thyroid carcinoma: what management? // *Journal de Chirurgie* // 2009 Feb.

СПОСОБ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГИПЕРПЛАЗИИ И ОПУХОЛЕЙ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ, ВТОРИЧНЫМ И ТРЕТИЧНЫМ ГИПЕРПАРАТИРЕОЗОМ

И.З. Галиев, С.В. Зинченко

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия

Аннотация

Проблема вторичного и третичного гиперпаратиреоза до настоящего времени не утратила своей актуальности. Радикальное удаление трансформированных паращитовидных желез (ПЩЖ) с одномоментной свободной реплантацией неизменной части обеспечивает восстановление фосфорно-кальциевого обмена. Вопросы удаления с последующей аутологичной трансплантацией ПЩЖ связаны для специалистов с рядом затруднений: малый размер (менее чем 6x3x1,5 мм) и схожесть с окружающими тканями. В данной работе показана эффективность применения производных 5 АЛК для флуоресцентной визуализации гиперплазированных и аденоматозно трансформированных паращитовидных желез (ПЩЖ) у пациентки с третичным гиперпаратиреозом, визуализация паращитовидных желез до оперативного лечения не была проведена в полном объеме по причине тяжести состояния пациентки и наличия противопоказаний для проведения йодконтрастных исследований.

Ключевые слова: третичный гиперпаратиреоз, флуоресцентная диагностика, паращитовидная железа, паратиреоидэктомия.

METHOD OF INTRAOPERATIVE IDENTIFICATION OF HYPERPLASIA AND TUMORS OF THE PARATHYROID GLANDS IN PATIENTS WITH PRIMARY, SECONDARY AND TERTIARY HYPERPARATHYROIDISM

I.Z. Galiev, S.V.Zinchenko

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Annotation

The problem of secondary and tertiary hyperparathyroidism has not lost its relevance to date. Radical removal of transformed parathyroid glands with simultaneous free replantation of the unchanged part ensures the restoration of phosphorus -calcium metabolism. The issues of removal with subsequent autologous transplantation of the pancreas are associated with a number of difficulties for specialists: small size (less than 6x3x1.5 mm) and similarity with surrounding tissues. This paper shows the effectiveness of the use of 5 ALA derivatives for fluorescent imaging of hyperplaszied and adenomatous transformed parathyroid glands (PSG) in a patient with tertiary hyperparathyroidism, visualization of the parathyroid glands before surgical treatment was not carried out in full due to the severity of the patient's condition and the presence of contraindications for iodine contrast studies.

Key words: tertiary hyperparathyroidism, fluorescent diagnostics, parathyroid gland, parathyroidectomy.

Введение. Проблема вторичного и третичного гиперпаратиреоза до настоящего времени не утратила своей актуальности. Хроническая гиперфункция паращитовидных желез, обусловленная автономно функционирующими опухолями при первичном гиперпаратиреозе и викарной гиперплазией с последующей автономизацией и опухолевой трансформацией паращитовидных желез (ПЩЖ) при вторичном и третичном гиперпаратиреозе (ГПТ) у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, является одной из важнейших проблем клинической нефрологии и эндокринологии. Полное и радикальное удаление трансформированных паращитовидных желез с одномоментной свободной реплантацией неизменной части обеспечивает восстановление фосфорно-кальциевого обмена [1].

Существует множество способов дооперационной визуализации паращитовидных желез (ПЩЖ). Так, например, широко известны способы определения ПЩЖ путем проведения ультразвукового исследования. Однако, как отмечают Е.В. Эпштейн и С.И. Матяшук (2004), проблема визуализации паращитовидных желез при ультразвуковом исследовании заключается даже не в их малых размерах, а в том, что нет никакой разницы в эхогенности щитовидной железы и паращитовидных желез [2]. В Клиническом руководстве по ультразвуковой диагностике под ред. В.В. Митькова (2005) также указывается на невозможность визуализации нормальной околощитовидной железы даже высокочастотными датчиками в связи с малыми размерами и экоструктурой, не отличающейся от экоструктуры щитовидной железы [3].

Предложенный способ интраоперационного гамма-сканирования с радиофармпрепаратом технетрилом не позволяет визуализировать ПЩЖ в 29 % случаев при первичных операциях и в 56 % случаев при повторных вмешательствах [4].

Методика визуализации ПЩЖ с использованием внутривенной инфузии раствора метиленового синего в предоперационном периоде с развитием синего окрашивания ПЩЖ [5, 6], кроме того, известно, что его использование может приводить к развитию острых неврологических нарушений после операции [7, 8], вследствие чего этот метод также является недостаточно эффективным и небезопасным для интраоперационной визуализации паращитовидных желез.

Способ, описанный в изобретении РФ по патенту №2458689 (Чиссов В.И. с соавт., 2012 г.), предлагает интраоперационную идентификацию паращитовидных желез, включающую пероральное введение раствора 5-аминолевулиновой кислоты до начала операции и проведение операции при облучении операционного поля поляризованным синим светом, также не лишен ряда недостатков [9]. В нашем патенте «Способ интраоперационной идентификации гиперплазии и опухолей паращитовидных желез у пациентов с первичным, вторичным и третичным гиперпаратиреозом» указано, что для адекватной паратиреоидэктомии не требуются высокие дозы препарата, поскольку 5-аминолевулиновая кислота способна накапливаться в любых тканях с повышенным метаболизмом, коими являются гиперплазированные и аденоматозно трансформированные паращитовидные железы. Кроме того, точное соблюдение временного интервала в 120 мин после введения 5-аминолевулиновой кислоты в целях создания более яркого «свечения» тканей с повышенным метаболизмом и короткий интервал сохранения визуальной оптической концентрации не способствуют прецизионности проводимого хирургического вмешательства [10].

Материал и методы

Пациентка Д., 26 лет, является инвалидом детства по врожденной хондродисплазии, в сентябре 2008 г. диагностирована почечная недостаточность, начат гемодиализ. С первых сеансов отмечены высокие показатели уровня паратгормона (ПТГ) на уровне 1500–2000 пг/мл. Получала мимпару 80 мг длительно, в 2010 г. – пересадка донорской почки, в 2014 г. – отторжение гетеротрансплантата, с этого момента по настоящее время на программном гемодиализе. Показатели ПТГ до 2500–3000 пг/мл, от приема мимпары и аналогов воздерживается по причине выраженной тошноты и рвоты после приема препарата. Под наблюдением с Центра эндокринологии и эндокринной хирургии МСЧ КФУ с июня 2021 г. Все попытки визуализации ПЩЖ их ортотопической локализации либо дистопии не привели к однозначным результатам. Сцинтиграфия с технетрилом – данных за аденомы ПЩЖ нет, дистопии нет. УЗИ ПЩЖ – визуализируются по задней поверхности, схожи по структуре с ПЩЖ образования 8х5 мм слева и 5х6 мм справа. РКТ органов шеи, средостения и ОГК проведена без контрастирования из-за ХПН. В динамике уровень паратгормона не снижался. Учитывая сложившуюся ситуацию, после объяснения пациентке и с ее информированного согласия, было принято решение об оперативном лечении с применением аласенса (производное 5-АЛК) для интраоперационной визуализации ПЩЖ.

При обращении общее состояние относительно удовлетворительное, жалобы на слабость, утомляемость. Локальный статус: шея деформирована за счет выраженного кифосколиоза, дополнительные объемные образования не определяются. Введен аласенс из расчета 1,5 г per os, за 3,0 ч до операции.

Результаты

В условиях общей анестезии разрезом кожи по Кохеру послойно обнажена ЩЖ, мобилизована левая доля. В УФ свете длиной волны 395–400 нм выполнена визуализация предполагаемой локализации ПЩЖ, выявлено образование 10x8x6 мм алого цвета (накопленный в ПЩЖ аласенс в свете этой длины волны флуоресцирует алым светом), окружающие ткани темно-фиолетового цвета (рис. 2), последняя удалена, при срочной гистологии – аденома ПЩЖ, при дальнейшей ревизии в дневном и поляризованном свете структур, схожих с ПЩЖ, не выявлено. Аналогичные манипуляции выполнены справа, визуализирована 2-я ПЩЖ – 6x7x8 мм, удалена (рис. 3,4).

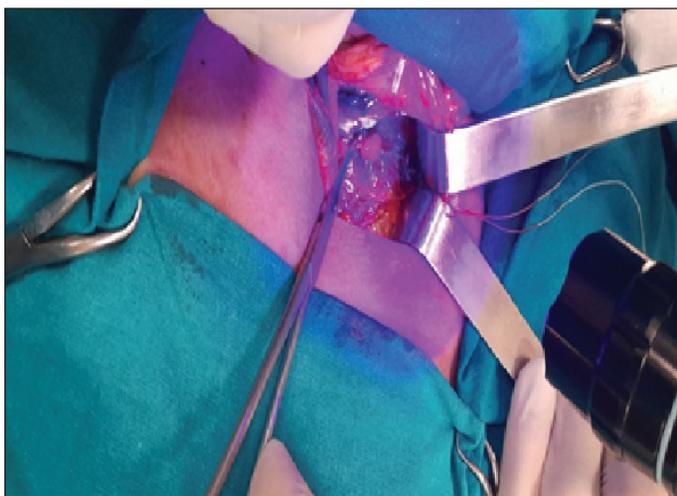


Рис. 1. Мобилизованная левая доля щитовидной железы с флуоресцирующей ПЩЖ

Мобилизована паратрахеальная клетчатка в проекции предполагаемой ортотопической локализации ПЩЖ – достоверных признаков не выявлено. Паратрахеальная клетчатка удалена отдельными блоками справа и слева, передана для планового гистологического исследования. Решено ограничиться выполненным объемом операции. Послеоперационный период протекал без особенностей, в период нахождения на койке получала гемодиализ в условиях МСЧ КФУ. На следующий день после операции показатели ионизированного кальция крови показали ожидаемую гипокальциемию, 0,9 ммоль/л, контроль ПТГ на 2-е сутки 2439 пг/мл. Гистологическое заключение № 1), 2) – аденомы ПЩЖ, 3), 4) в паратрахеальной клетчатке единичные лимфоузлы, жир, паратиреоидной ткани не обнаружено. На 4-е сутки пациентка выписана для амбулаторного лечения с рекомендациями контроля ПТГ через 2 нед.

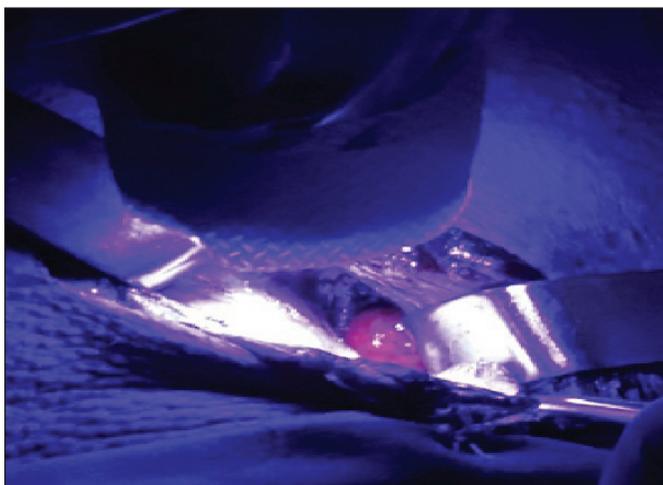


Рис. 2. Мобилизованная правая доля щитовидной железы с флуоресцирующей паращитовидной железой

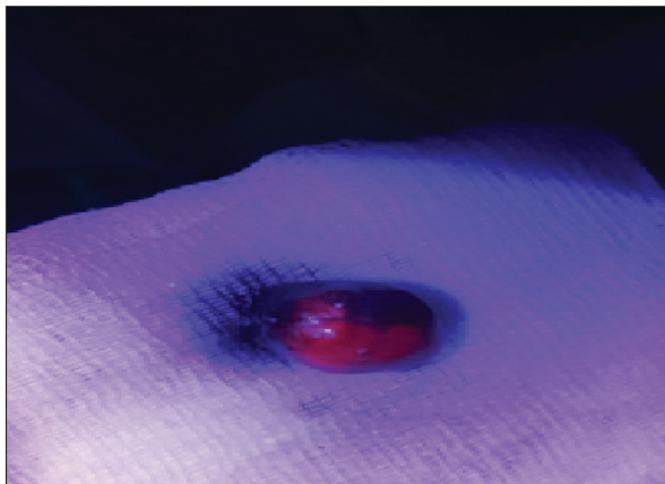


Рис. 3. Правая паращитовидная железа продолжает флуоресцировать после удаления

Заключение

Описанный клинический случай наглядно демонстрирует сложности, которые регулярно встречаются в клинической практике хирургов-эндокринологов, занимающихся проблемами вторичного и третичного ГПТ.

Учитывая вышеизложенное, следует заключить, что радикальные операции у пациентов с ВГПТ, ТГПТ следует выполнять при совершенно четком и согласованном представлении:

1. О характере консервативной терапии, ее эффективности и продолжительности;
2. О показателях уровня ПТГ, кальция и фосфора крови;
3. О локализации, как минимум, 4 ПЩЖ, подтвержденных СГ, УЗИ, РКТ при необходимости;
4. О локализации дистопированной ПЩЖ, определяющей оперативный доступ.

При наличии всей этой информации, имеющей однозначную трактовку, можно планировать оперативное лечение пациентов после совместного обсуждения с нефрологами и эндокринологами характера послеоперационного лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bilyalov A.I., Shanazarov N.A., Zinchenko S.V. Photodynamic Therapy as Alternative Method of Treatment of Metastatic Ovarian Cancer with Many Recurrence: Case Report. *BioNanoSci.* (2020). P.807-810. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00749-7>
2. Эпштейн Е.В., Матяцук С.И. Ультразвуковое исследование щитовидной железы. Атлас-руководство. Изд. 2-е. Киев, 2004. 382 с.
3. Митьков В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике. М., 2005. Т. 4. С. 120.
4. Norman J. Minimally Invasive Radioguided Parathyroidectomy: An Endocrine Surgeon's Perspective/ J. Norman . *J. Nucl. Med.* 1998. Vol. 39. P.15–24.
5. Kloppel P., Moe R.E. Demonstration of parathyroids during surgery in dog with preliminary reports of results in some clinical cases . *Surgery.* 1966. Vol. 59. P.1101.
6. Sweet G., Standiford S. Methylene-blue associated encephalopathy. *J. Am. Coll. Surg.* 2007. Vol. 204. N 3. P.454–458.
7. Kuriloff D.B., Sanbom K.V. Rapid intraoperative localization of parathyroid glands utilizing methylene blue infusion. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2004. V.131. № 5. P.616–622.
8. Bradley K.W. Cameron A.J.D., Bradley K.W. et al. Liang Rhea Serotonin syndrome following methylene blue infusion during parathyroidectomy: a case report and literature review. *Canadian J. Anest.* 2008. Vol. 55. P. 36–41.
9. Чиссов В.И., Решетов И.В., Голубцов А.К., Филоненко Е.В., Севрюков Ф.Е., Крехно О.П., Курпа Е.А. Способ интраоперационного определения паращитовидных желез. № 2458689, заявл. 28.03.2011; опубл. 20.08.2012, Бюл. № 21.
10. Зинченко С.В., Галеев И.З., Минабутдинов Р.М., Алиев И.Г., Билялов А.И., Вахитова Р.Ш. Способ интраоперационной идентификации гиперплазии и опухолей паращитовидных желез у пациентов с первичным, вторичным и третичным гиперпаратиреозом для адекватной паратиреоидэктомии. № 2019142608; заявл. 28.03.2011; опубл. 23.06.2020, Бюл. № 18.

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

К.А. Гаптулбарова^{1,2}, Е.А. Здерева^{1,2}, И.А. Цыденова^{1,2},
М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные по сравнению экспрессионного профиля пациенток с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) в процессе проведения предоперационного лечения. В представленной работе предполагалось провести полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе предоперационного лечения с учетом статуса гематогенного метастазирования. Всего в работу включено 60 больных РМЖ IIA–IIIB стадии люминального В подтипа, средний возраст 46,2±0,4 года. Все пациентки получали 4–8 курсов системной неоадъювантной (предоперационной) химиотерапии (НХТ). Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного и операционного материала для каждого из пациентов. Из биообразцов выделялась РНК, затем проводился полнотранскриптомный микроматричный анализ с последующей обработкой полученных результатов. В результате сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ было показано, что опухоли больных до лечения в зависимости от статуса гематогенного метастазирования различались по 24 дифференциально экспрессируемым генам (ДЭГ). После проведения НХТ опухоли больные с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ. При этом ДЭГ у пациенток с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену – *EHD2* (19q13.33). Таким образом, в ходе реализации данной работы было проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, полнотранскриптомный микроматричный анализ, гематогенное метастазирование.

WHOLE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF BREAST TUMOR DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY: ASSOCIATION WITH HEMATOGENOUS METASTASIS

К.А. Gaptulbarova^{1,2}, Е.А. Zdereva^{1,2}, I.A. Tsydenova^{1,2},
M.M. Tsyganov¹, M.K. Ibragimova^{1,2}

Scientific Research Institute of Oncology, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹,

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Annotation

To date, there are no data in the literature comparing the expression profile of patients diagnosed with breast cancer (BC) during preoperative treatment. In the presented work, it was supposed to conduct a full transcriptome analysis of a breast tumor during preoperative treatment, taking into account the status of hematogenous metastasis. A total of 60 patients with breast cancer stage IIA–IIIB of the luminal B subtype were included in the study, mean age 46.2±0.4 years. All patients received 4-8 courses of systemic neoadjuvant (preoperative) chemotherapy (NCT). The material for the study was paired samples of biopsy and surgical material for each of the patients. RNA was isolated from biosamples, then carried out. full transcriptome microarray analysis with subsequent processing of the obtained results. As a result, a comparison of the

expression profile of patients with breast cancer, depending on the status of hematogenous metastasis before and after NCT, showed that the tumors of patients before treatment, depending on the status of hematogenous metastasis, differed in 24 differentially expressed genes (DEGs). After NCT, the tumors of patients with and without hematogenous metastasis differed in 154 DEGs. At the same time, DEG in patients with the presence/absence of hematogenous metastasis before treatment and after NCT intersect at 1 gene – *EHD2* (19q13.33). Thus, during the implementation of this work, a comparison was made of the expression profile of patients with breast cancer, depending on the presence/absence of hematogenous metastasis before and after preoperative chemotherapy.

Key words: breast cancer, full transcriptome microarray analysis, hematogenous metastasis.

Актуальность. Важнейшим аспектом в современном подходе к лечению рака молочной железы является мировой тренд в направлении прецизионной медицины, в том числе и в отношении предоперационной химиотерапии. Для применяемой системной химиотерапии не существует общепринятых маркеров для персонализированного назначения химиопрепаратов. При этом на сегодняшний день в литературе крайне малочисленны данные по сравнению экспрессионного профиля пациенток с диагнозом рак молочной железы в процессе проведения предоперационного лечения. Как правило, исследования в данном направлении затрагивают именно молекулярное профилирование опухоли в процессе лечения. Так, работа по исследованию изменения генетического ландшафта трижды негативного РМЖ после неоадьювантной (предоперационной) химиотерапии (НХТ), где при оценке мутационных аллелей и СНА показано увеличение количества копий членов семейства *AKT* и *CCND* и генов *MYC* и *MCL1* [1]. Также в исследовании S. Loibl с использованием секвенирования нового поколения на большой выборке (851 пациентка с РМЖ) была оценена значимость геномных изменений при проведении предоперационного лечения. Были проанализированы мутации генов *AKT1*, *BRAF*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *SF3B1*, *TP53*, *HNF1A*, *PIK3CA*, *PTEN* и оценено изменение числа копий генов *CCND*, *ERBB2*, *FGFR1*, *PAK1*, *PIK3CA*, *TOP2A*, *TP53*, *ZNF703*. Выявлено, что наиболее часто в процессе НХТ наблюдались мутации генов *TP53* (38,4%) и *PIK3CA* (21,5%), а также присутствовали амплификации генов *TOP2A*, *ERBB2* и *ZNF703* – более чем в 30 % случаев, *TP53* и *PIK3CA* – более чем в 20 % случаев, *CCND1*, *PAK1* и *FGFR* – более чем в 12 % случаев [2].

Однако в литературных источниках отсутствуют результаты исследований по сравнению полного экспрессионного профиля больных РМЖ в процессе проведения предоперационного лечения.

Цель работы – проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

Материал и методы

В исследование включены 60 больных РМЖ T1–4 N0–2 M0 (IIA–IIIB стадии) люминального В подтипа, в возрасте 22–68 лет (46,2±0,4). Пациенты получали 4–8 курсов системной НХТ по схемам FAC, AC, CAH, CP, ACT и AT. Материалом служили парные образцы биопсийного (до лечения) и операционного материала (после НХТ) для каждой из пациенток. РНК из исследуемого материала выделялась набором RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0

Результаты

Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ. Было показано, что количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (рис. 1а, б).

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациенток с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену – *EHD2* (19q13.33). *EHD2* признан прогностическим параметром для плоскоклеточного рака пищевода – экспрессия данного гена вовлечена в его патогенез [3] и может рассматриваться в качестве фактора прогрессирования для пациенток с РМЖ – он является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках РМЖ [4].

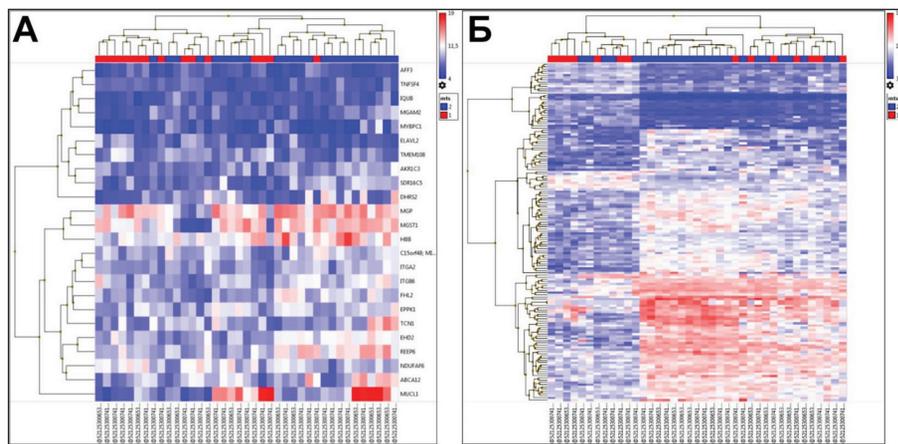


Рис. 1. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: а – до лечения с наличием (есть – 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет – 2); б – после НХТ с наличием (есть – 1) и отсутствием гематогенного метастазирования (нет – 2)

Заключение

Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Полученные результаты могут являться платформой для персонализированного подхода в диагностике и лечении отдаленного метастазирования при раке молочной железы.

Работа поддержана грантом РФФ 22-25-00499.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balko J.M., Giltmane J.M., Wang K. et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer discovery*. 2014. 4(2). P. 232–45.
2. Loibl S., Treue D., Budczies J. et al. Mutational diversity and therapy response in breast cancer—a sequencing analysis in the neoadjuvant GeparSepto trial. *Clinical Cancer Research*. 2019. 25(13). P. 3986–3995.
3. Li M., Yang X., Zhang J. et al. Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma. *Medical Oncology*. 2013. 30(1). P. 396.
4. Yang X., Ren H., Yao L. et al. Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells. *Tumor Biology*. 2015. 36(5). P. 3717–26.

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ
ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА СПОСОБНОСТЬ
ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ИНДУКЦИИ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
ДО СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ОБРАЗОВАНИЕМ МАММОСФЕР**

**Д.С. Долгашева^{1,2}, Е.А. Здерева^{1,2}, И.А. Цыденова^{1,2}, К.А. Гаптулбарова^{1,2},
М.К. Ибрагимова¹, М.М. Цыганов¹, Н.В. Литвяков^{1,2}**

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального
исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

Одной из основных причин смерти от опухолей различных локализаций является развитие метастатической болезни. Однако не все опухоли, даже в пределах одной локализации, обладают способностью к метастазированию, и до сих пор нет четкого понимания, почему одни опухоли метастазируют, а другие нет. Целью настоящего исследования явилось изучение способности дифференцированных опухолевых клеток к индукции дедифференцировки до стволовых клеток с образованием маммосфер в присутствии ингибиторов генов стволовости. В работе использовали стандартные клеточные линии рака молочной железы: BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 и T47D. Клетки культивировали в полных питательных средах RPMI-1640, IMDM и DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотика-антимикотика. Для исследования CNA-генетического ландшафта

использовали микроматрицы CytoScan HD Array, оценка транскриптома клеток осуществлялась на платформе Clarius S Assay. Субпопуляционный состав клеточных культур был изучен при помощи проточной цитометрии. Процедура негативного сортирования клеток, отрицательных по CD44, проводилась на приборе Sony SH800. Показано, что все клеточные культуры, кроме BT-549, содержат две и более амплификации генов стволовости. Опираясь на результаты анализа субпопуляционного состава, для экспериментов были отобраны линии MCF-7 и T47D. Показано, что клетки линии MCF-7 дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 уже на 14-е сут культивирования. Дифференцированные клетки MCF-7 образуют полноценные маммосферы на 14-е сут только в присутствии IL6. Установлено, что для дедифференцировки дифференцированных клеток MCF-7 необходима эктопическая экспрессия гена *KLF4*. Эксперимент с использованием ингибиторов проводился на клетках линии T47D. Установлено, что клетки линии T47D обладают способностью к спонтанной дедифференцировке и маммосферообразованию. Показано, что ингибирование генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до прогениторных и стволовых клеток. Химические ингибиторы, в комплексе, показали эффективную блокировку дедифференцировки опухолевых клеток линии T47D.

Ключевые слова. Рак молочной железы, маммосферы, ингибиторы генов, опухолевые стволовые клетки, метастазирование.

STUDY OF THE EFFECT OF CHEMICAL INHIBITORS OF STEMNESS GENES ON THE SUPPRESSION OF THE ABILITY OF DIFFERENTIATED BREAST CANCER CELLS TO INDUCE DEDIFFERENTIATION TO STEM CELLS WITH THE FORMATION OF MAMMOSPHERES

D.S. Dolgasheva^{1,2}, E.A. Zdereva^{1,2}, I.A. Tsydenova^{1,2}, K.A. Gaptulbarova^{1,2}, M.K. Ibragimova¹, M.M. Tsyganov¹, N.V. Litviakov^{1,2}

Cancer Research Institute Tomsk NRC, Tomsk, Russia¹
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Annotation

One of the main causes of death from tumors of various localizations is the development of metastatic disease. However, not all tumors, even within the same localization, have the ability to metastasize, and there is still no clear understanding why some tumors metastasize and others do not. The aim of this study was to study the ability of differentiated tumor cells to induce dedifferentiation to stem cells with the formation of mammospheres in the presence of stemness gene inhibitors. We used standard breast cancer cell lines: BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, and T47D. The cells were cultured in RPMI-1640, IMDM, and DMEM complete nutrient media supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine, and an antimycotic antibiotic. CytoScan HD Array microarrays were used to study the CNA genetic landscape; the cell transcriptome was assessed using the Clarius S Assay platform. The subpopulation composition of cell cultures was studied using flow cytometry. The negative sorting procedure for CD44 negative cells was performed on a Sony SH800 instrument. It was shown that all cell cultures, except for BT-549, contain two or more amplifications of stemness genes. Based on the results of the analysis of the subpopulation composition, the lines MCF-7 and T47D were selected for the experiments. It was shown that wild-type MCF-7 cells spontaneously form mammospheres without IL6 induction already on the 14th day of cultivation. Differentiated MCF-7 cells form complete mammospheres for 14 females only in the presence of IL6. It has been established that ectopic expression of the *KLF4* gene is required for dedifferentiation of differentiated MCF-7 cells. The experiment using inhibitors was carried out on the T47D cell line. It has been established that T47D cells are capable of spontaneous dedifferentiation and mammosphere formation. It has been shown that inhibition of stemness genes prevents dedifferentiation of non-stem tumor cells to progenitor and stem cells. Chemical inhibitors, in combination, showed an effective blocking of the dedifferentiation of tumor cells of the T47D line.

Key words. Breast cancer, mammospheres, gene inhibitors, tumor stem cells, metastasis.

Актуальность. Впервые опухолевые стволовые клетки (ОСК) были обнаружены в солидных опухолях, в частности при раке молочной железы, al-Hajj и его коллегами в 2003 г. [1]. Позже установили, что нормальные и опухолевые эпителиальные клетки могут и повторно входить в состояние стволовых клеток. Это открытие позволило по-новому взглянуть

на патогенез рака. Так, было выдвинуто предположение о том, что агрессивность карцином зависит не от наличия и количества опухолевых стволовых клеток, а от их склонности к образованию новых ОСК из нестволовых клеток. В 2013 г. Cristine Chaffer с коллегами предположила, что разные опухоли имеют различную способность к стволовой пластичности и этим будут определяться их злокачественный потенциал и способность к прогрессии [2]. Мы также предполагаем, что способность к стволовой пластичности у нестволовых клеток определяет злокачественность опухоли и способность к метастазированию. Отсутствие способности к стволовой пластичности объясняется неспособностью некоторых опухолей метастазировать. Ранее мы показали, что приобретение способности к стволовой пластичности является маркером готовности опухоли к прогрессированию. Данный процесс происходит при эктопической экспрессии генов стволовости (*MYC*, *SOX2*, *KLF4*, *OCT4*, *NODAL*, *NOTCH1*, *NANOG* и др) за счет амплификаций их локусов в разных хромосомах опухолевых клеток. Нами также были аннотированы плечи хромосом, в которых локализованы гены стволовости (3q(26.33; 34), 5p(15.33; 13.1), 6p(24.3; 22.3; 21.33; 21.32), 7q(11.23; 21.13; 31.2; 32.1), 8q(11.21; 24), 9p(21.2), 9q(34.3; 21.13; 31.2, 22.33), 10p(15.2; 13; 12.2; 11.22), 10q22.1, 12p(13.31) 13q(34; 32.3; 22.1; 13.3; 12.2), 16p(11.2; 13.3), 18q(21.1; 21.2) 19p(13.3; 13.2; 13.12)). На клиническом материале было показано, что при наличии двух и более амплификаций разных хромосом в остаточной резидуальной опухоли резко увеличивается частота метастазирования [3]. Тем не менее необходимо проведение экспериментов на клеточных моделях для получения фундаментальных данных.

Цель исследования – изучить способность дифференцированных клеток рака молочной железы к дедифференцировке до ОСК и образованию маммосфер в присутствии ингибиторов генов стволовости.

Материал и методы

В работе использовали стабильные клеточные линии рака молочной железы (BT-549, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 и T47D). Клетки культивировали в полных питательных средах RPMI-1640, IMDM и DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотика-антимикотика. Для исследования СНА-генетического ландшафта использовали микроматрицы CytoScan HD Array, транскриптомный анализ осуществлялся на платформе Clariom S Assay. Субпопуляционный состав клеточных культур был изучен с помощью проточной цитометрии. Процедура негативного сортирования клеток проводилась на приборе Sony SH800. В эксперименте по ингибированию дедифференцировки использовали ингибиторы генов *TERT*, *MYC*, *NOTCH1*: BIBR1532, 10058-F4 и FLI-06 соответственно.

Результаты

Был оценен СНА-генетический ландшафт выбранных клеточных линий. Показано, что все клеточные культуры, кроме BT-549, содержат две и более ампликации генов стволовости. На следующем этапе при помощи проточной цитометрии был изучен субпопуляционный состав клеточных культур с использованием моноклональных антител к поверхностным белкам CD44 и CD24. Результаты представлены в таблице.

Таблица

Количество клеток с маркерами ОСК CD44 и CD24 в культурах клеток рака молочной железы

Клеточная линия	CD44-/CD24-	CD44-/CD24+	CD44+/CD24-	CD44+/CD24+
MCF-7	1,96 %	13 %	1,25 %	83,8 %
SK-BR-3	47,4 %	3 %	13,6 %	36 %
BT-549	83,9 %	0,24 %	14,4 %	1,46 %
MDA-MB-231	0,52 %	0 %	87,2 %	12,2 %
T47D	7,5 %	21,7 %	50,5 %	20,3 %

У MCF-7 основную массу составляет популяция прогениторных опухолевых клеток (ПОК) CD44+/CD24+, которые способны к ограниченному делению, дифференцированные опухолевые клетки (ДОК) составляют 13 % популяции. Для SK-BR-3 и BT-549 основную массу составляют ДОК 2-го порядка (CD44-/CD24-), которые неспособны к размножению. Согласно нашему предположению, дифференцированные клетки будут дедифференцироваться под действием ИЛ6 с образованием сфероидов. Однако клетки BT-549 имеют только 1 амплификацию генов стволовости и в соответствии с нашими данными неспособны к дедифференцировке и образованию маммосфер. У линии клеток T47D общее количество ДОК 1 и 2-го поколения составляет 29 %.

Следующим этапом был предварительный эксперимент по отбору субпопуляций и отработка времени культивирования. Были выбраны линии MCF-7 и T47D. Линия MCF-7 несет недостаточное количество ДОК, поэтому с этими клетками проведены только эксперименты по индукции дедифференцировки и анализ транскриптома клеток в процессе дедифференцировки. Установлено, что клетки дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 уже на 14-е сут культивирования, но при добавлении IL6 на 14 и 21-е сут инкубации наблюдается большее количество более крупных маммосфер. ДОК MCF-7 без IL6 не образуют маммосферы на 14-е сут, лишь на 21-е сут. появляются мелкие сфероиды. При добавлении IL6 маммосферы образуются уже на 14-е сут. Маммосферы на 21-е сут инкубации в лунках CD44-/CD24+ с IL6 имеют более крупный размер. Далее сравнили экспрессию 43 генов стволовости в клетках MCF-7 на 3 и 21-е сут культивирования в следующих группах: Контроль (дикий тип), Контроль+IL6, ДОК и ДОК+IL6. Оценивали изменение уровня экспрессии в 2 и более раза $-2 > \text{Fold Change} > 2$. Первоначально, в группе ДОК+IL6, по сравнению с группой Контроль+IL6, снижается более чем в 2 раза экспрессия *VIM*, *TERT* и *LNMB2* и повышается экспрессия *KLF4*. На этапе маммосферообразования на 21-е сут в группе ДОК+IL6, по сравнению с контролем, резко усиливается экспрессия *LMNB2*, *SOX4*, *FZD1*, *MYC*, *BM11*, *KLF5*, *SMAD9*, *SMAD4*, *SMAD2*, *HIF3A* и снижается *DPPA4*, *SNAI2*, *SOX1*, *FLT3*. Снижение экспрессии *SNAI2* свидетельствует об ингибировании эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Остальные гены связаны с поддержанием плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток. Примечательно, что *KLF4* и *MYC* амплифицированы в клетках MCF-7. Экспрессия *MYC* активируется при маммосферообразовании во вторую фазу на 21-е сут, при этом многие повышено-экспрессируемые гены в группе ДОК+IL6 являются мишенью *MYC* как фактора транскрипции. Действие IL6 на клетки дикого типа и ДОК различно. У дикого типа на 3-и сут IL6 активирует экспрессию *SOX2*, *TERT* и ингибирует *PIM1*. *SOX2* запускает деление ОСК, что приводит к формированию маммосфер. В ДОК на 3-и сутки под действием IL6 падает экспрессия генов *LMNB2*, *VIM* и *SMAD9*. Снижение экспрессии *VIM* показывает снижение активности EMT, и это происходит именно под действием IL6. На 21-е сут IL6 в клетках дикого типа активирует экспрессию *DPPA4*, *SOX1*, *SMO*, *MOB3B*, *LAT* и ингибирует экспрессию *KLF5*, *KLF4*, *MYC*, *LNMB2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *BM11*. В ДОК IL6 на 21-е сут активирует экспрессию *SMAD9*, *SMAD2*, *KLF6*, *BM11*, *MYC* и ингибирует *FLT3*, *DPPA4*, *SNAI2*.

Основной эксперимент с использованием ингибиторов генов стволовости был проведен на клетках линии T47D 6 пассажа, при конfluентности менее 50 %. Было сформировано 12 групп: Дикий тип, Дикий тип+IL6, Дикий тип+IL6+VIBR1532, Дикий тип+IL6+10058-F4, Дикий тип+IL6+FLI-06, Дикий тип+IL6+все ингибиторы, ДОК, ДОК+IL6, ДОК+IL6+VIBR1532, ДОК+IL6+10058-F4, ДОК+IL6+FLI-06, ДОК+IL6+все ингибиторы. Установлено, что линия T47D способна к спонтанной дедифференцировке и маммосферообразованию без стимуляции IL6. В группе ДОК сфероиды образуются без IL6 уже на 3-и сут роста, на 7-е сут наблюдаются полноценные маммосферы. За счет продукции эстрадиола и амплификаций локусов генов *SOX2*, *TERT*, *FZD9*, *SNAI2*, *MYC*, *KLF4*, *NOTCH1*, *KLF6*, *VIM* клетки T47D способны спонтанно дедифференцироваться. На 21-е сут эксперимента количество маммосфер в группе с ДОК меньше, чем в контроле. Однако клеточная масса в контрольной группе ДОК больше, а значит, не все клетки дедифференцировались до ОСК и часть клеток дедифференцировалась до ПОК. Ингибиторы VIBR1532 и 10058-F4 практически полностью блокируют дедифференцировку ДОК T47D до ОСК, маммосферы даже на 21-е сут практически не образуются. VIBR1532 и 10058-F4 блокируют активность ОСК в клетках дикого типа, маммофер в них не образуется, при этом не купируется дедифференцировка до ПОК. FLI-06 снижает дедифференцировку ДОК до ОСК, но не отменяет ее. На 14 и 21-е сут роста в группе ДОК+FLI-06 наблюдалось некоторое количество сфероидов. Маммосфер на 21-е сут в этой группе меньше, чем в группе ДОК без IL6 и группе ДОК+IL6. FLI-06 также снижает активность ОСК в культурах дикого типа и блокирует пролиферативную активность и дедифференцировку до ПОК. При этом не блокируется пролиферация ПОК. Добавление всех ингибиторов не купирует пролиферацию имеющихся в культуре дикого типа ПОК и полностью отменяет активность имеющихся ОСК. Добавление всех трех ингибиторов к ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК и ПОК, о чем свидетельствуют отсутствие маммосфер и низкая клеточная масса на 21-е сут роста. Таким образом, ингибирование 3 из 9 амплифицированных в T47D генов стволовости предотвращает дедифференцировку ДОК до стволовых и прогениторных. Далее проведен транскриптомный анализ клеток всех 12 групп на 3-и сут и проанализирована экспрессия 43 генов стволовости. В соответствии с нашим представлением ингибитор VIBR1532 предот-

вращает дедифференцировку ДОК T47D и ПОК в ОСК. При этом, по сравнению с группой ДОК+IL6, VIBR1532 ингибирует экспрессию 11 генов стволовости (*MYC, FZD9, NANOG, SMAD2, SMAD4, FZD1, SMO, MOB3B, ITGB1, BMI1, TGFBR1*), из них два амплифицированы у T47D (*MYC* и *FZD9*). Активна экспрессия генов *KLF6* и *LAT*. Ингибитор 10058-F4 ингибирует экспрессию *MYC, NANOG, FZD9, MOB3B, TGFBR1* и *PIM1*. Общими для 10058-F4 и VIBR1532 ингибируемыми генами являются *MYC, NANOG, FZD9, MOB3B, TGFBR1*. Кроме этого, 10058-F4 повышает активность 11 генов (*SOX2, KLF4, KLF6, KLF1, SMAD2, SMAD9, LIFR, LNMB2, ZEB1, BMP6, HIF3A*). FLI-06 снижает в 2 и более раза экспрессию *VIM, DPPA4* и *FZD9*. При исследовании экспрессионного профиля MCF-7 было показано, что снижение активности *VIM* и *DPPA4* способствует дедифференцировке ДОК MCF-7 до стволовых. FLI-06 не препятствует дедифференцировке ДОК. Этому также способствует повышенная экспрессия в группе FLI-06 других генов стволовости (*SOX2, KLF6, SOX4, INSR, HIF3A, NOTCH4, KLF4, ZIC2, KLF1, LAT*). За счет ингибирования экспрессии *VIM, DPPA4* и *FZD9* не происходит только дедифференцировки ДОК до ПОК. Все три ингибитора, по сравнению с группой ДОК+IL6, подавляют более чем в 2 раза экспрессию 12 генов стволовости (*NANOG, LNMB2, LIFR, MYC, ZIC2, KLF6, MOB3B, TGFBR1, FZD9, BMI1, SMAD4, ITGB1*). Примечательно, что ингибиторы стимулируют ЕМТ, усиливая экспрессию гена *SNAI2*. Как уже отмечалось выше, в клетках MCF-7 подавление ЕМТ, ассоциировано с маммосферообразованием.

Заключение

Таким образом, показано, что ингибирование генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до прогениторных и стволовых. Химические ингибиторы, в комплексе, показали эффективную блокировку дедифференцировки опухолевых клеток линии T47D.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00243

ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Hajj M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. V.100. №. 7. P. 3983–3988.
2. Chaffer C. L. et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity // cell. 2013. V.154. №. 1. P. 61–74.
3. Litviakov N. Vol. et al. Somatic-stem transition of tumor cells is a key link in the metastasis. Annals of Oncology. 2018. V.29. P. VIII682.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ И ЦИКЛИНА D1 У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Чердынцева

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Рецепторный комплекс, который образуют протеинкиназы TGFβRI и TGFβRII, обеспечивает передачу TGFβ1-опосредованного внутриклеточного сигнала, приводящего к активации экспрессии генов-мишеней, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи экспрессии TGFβRI, TGFβRII и циклина D1 с прогрессированием на фоне тамоксифена и прогнозом заболевания у пациенток с эстроген-позитивным раком молочной железы. В исследование включено 65 больных с первичным эстроген-позитивным раком молочной железы (T1–3N0–3M0), получавших тамоксифен в адъювантном режиме 20 мг/сут. Уровень экспрессии TGFβRI, TGFβRII и CCND1 оценивался с помощью ПЦР в режиме реального времени. Фенотипирование клеток, экспрессирующих TGFβRI, TGFβRII и циклин D1, проведено с использованием проточной цитофлуориметрии. Анализ безметастатической выживаемости проведен с помощью метода Каплана–Мейера. Полученные результаты указывают на то, что рецепторные протеинкиназы TGFβRI, TGFβRII и циклин D1 вовлечены в реализацию ответа на гормональную терапию тамоксифеном.

Ключевые слова. Эстроген-позитивный рак молочной железы, адъювантная гормонотерапия, тамоксифен, рецепторы трансформирующего фактора роста I и II типа, циклин D1.

PROGNOSTIC VALUE OF THE EXPRESSION PROFILE OF RECEPTOR PROTEIN KINASES AND CYCLIN D1 IN ESTROGEN-POSITIVE BREAST CANCER PATIENTS

T.A. Dronova, N.N. Babyshkina, N.V. Cherdyntseva

Cancer Research Institute Tomsk NRC, Tomsk, Russia

Annotation

The receptor complex, which is formed by the protein kinases $TGF\beta$ RI and $TGF\beta$ RII, provide the $TGF\beta$ 1-mediated transduction, leading to the activation of the expression of target genes involved in the regulation of the cell cycle. The aim of the study was to examine the relationship between the expression of $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII and cyclin D1 with the progression on the tamoxifen admission and the prognosis in estrogen-positive breast cancer patients. The study included 65 patients with primary estrogen-positive breast cancer (T1-3N0-3M0) who received adjuvant tamoxifen 20 mg/day. The expression of $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII and $CCND1$ was assessed using real-time PCR. Cells phenotype expressing $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII and cyclin D1 was performed by flow cytometry. The metastasis-free survival was calculated using the Kaplan-Meier method. These results indicate that the receptor protein kinases $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII, and cyclin D1 are involved in the response to hormone therapy with tamoxifen.

Key words. Hormone receptor-positive breast cancer, adjuvant hormone therapy, tamoxifen, transforming growth factor receptor types I and II, cyclin D1.

Актуальность. Поиск маркеров прогноза и ответа на терапию эстроген-позитивного рака молочной железы (РМЖ) является на сегодняшний день актуальной задачей современной онкологии. К их числу относят рецепторный комплекс трансмембранных протеинкиназ типа I и типа II ($TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII), который обеспечивает $TGF\beta$ 1-опосредованную регуляцию процессов клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, адгезии, миграции и выживаемости клеток [1]. Изменение активности $TGF\beta$ 1 сигналинга может приводить к интенсивной пролиферации клеток, в том числе за счет увеличения продукции регуляторных молекул клеточного цикла, таких как циклин D1, что, в свою очередь, может способствовать развитию гормональной резистентности [2].

Цель исследования – изучить взаимосвязь экспрессии $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII и циклина D1 с прогрессированием на фоне тамоксифена и прогнозом заболевания у пациенток с эстроген-позитивным раком молочной железы.

Материал и методы

В исследование включена опухолевая и прилежащая нормальная ткань 65 пациенток с первичным эстроген-положительным РМЖ, T1–4N0–3M0. Все больным выполнено хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия – согласно показаниям. Неоадьювантное лечение не проводилось. В качестве адьювантной гормонотерапии больные принимали тамоксифен (5 лет, 20 мг/сут). Пациентки, у которых выявлено гематогенное метастазирование либо рецидив заболевания во время терапии тамоксифеном, вошли в тамоксифен-резистентную группу; пациентки без признаков прогрессирования составили тамоксифен-чувствительную группу. С использованием набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия) получена тотальная РНК. Уровень экспрессии генов $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII и $CCND1$ оценен методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией по технологии TaqMan. Количество клеток, экспрессирующих $TGF\beta$ RI, $TGF\beta$ RII, циклин D1, а также комбинации $TGF\beta$ RI⁺/ $TGF\beta$ RII⁺, $TGF\beta$ RI⁺/ $TGF\beta$ RII⁻, $TGF\beta$ RI⁻/ $TGF\beta$ RII⁺, $TGF\beta$ RI⁻/ $TGF\beta$ RII⁻, D1⁺/ $TGF\beta$ RII⁺, D1⁺/ $TGF\beta$ RII⁻, D1⁻/ $TGF\beta$ RII⁺, D1⁻/ $TGF\beta$ RII⁻ определены методом точечной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Безметастатическая выживаемость больных проанализирована с помощью кривых Каплана–Мейера и теста логарифма рангов. Для анализа связи между исследуемыми маркерами использован корреляционный анализ Спирмена. Статистическая обработка проведена при помощи пакета программ “STATISTICA 8.0”. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы проведен анализ экспрессии генов трансмембранных протеинкиназ $TGF\beta$ RI и $TGF\beta$ RII, а также экспрессии гена $CCND1$ в зависимости от исхода заболевания у больных эстроген-позитивным подтипом РМЖ. Уровень экспрессии гена

TGFβRII был выше среди пациенток тамоксифен-чувствительной группы ($2,76 \pm 1,31$) по сравнению с группой, резистентной к проводимому лечению ($0,16 \pm 0,12$; $p = 0,003$). Оценка связи уровня экспрессии генов *TGFβRI* и *CCND1* с эффективностью адъювантной терапии не установила статистически значимых различий ($p = 0,232$, $p = 0,785$ соответственно). На следующем этапе работы проанализирован процент экспрессии исследуемых белков в опухолевой ткани молочной железы. Так, установлено, что высокий уровень экспрессии *TGFβRI* и *TGFβRII* ассоциирован с благоприятным течением заболевания ($p=0,030$, $p=0,073$ соответственно). Анализ содержания субпопуляций клеток, экспрессирующих комбинации исследуемых маркеров, показал высокий процент *D1*⁺/*TGFβRII*⁺ клеток в опухолях, чувствительных к проводимой терапии ($p=0,009$). Для оценки потенциальной связи между исследуемыми маркерами проведен корреляционный анализ Спирмена. Показана корреляционная зависимость между уровнем экспрессии генов *TGFβRI* и *TGFβRII* ($r = 0,393$, $p = 0,006$). Кроме того, подобная направленность выявлена для уровня белковой экспрессии *TGFβRII* и циклина *D1* ($r=0,549$; $p=0,000$). Анализ безметастатической выживаемости показал значимое увеличение времени до прогрессирования заболевания среди больных, имеющих высокий уровень экспрессии *TGFβRII* в опухолевой ткани молочной железы (log rank $p = 0,011$, рис. 1А). Низкие показатели безметастатической выживаемости связаны с высоким уровнем экспрессии внутриклеточного белка циклина *D1*, однако результаты не достигали статистической значимости (log rank $p = 0,078$, рис. 1Б).

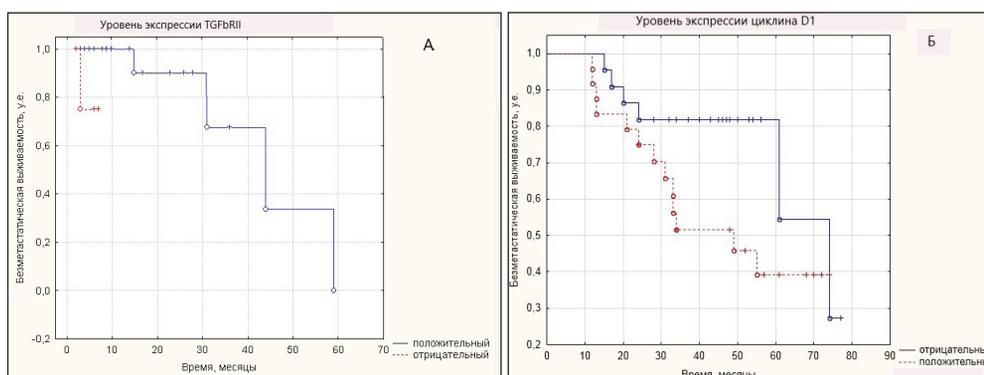


Рис. 1. Показатели безметастатической выживаемости у больных эстроген-позитивным РМЖ в зависимости от: А) уровня экспрессии *TGFβRII* (log rank $p = 0,011$); Б) уровня экспрессии циклин *D1* (log rank $p = 0,078$)

Заключение

Полученные результаты указывают на то, что рецепторные протеинкиназы *TGFβRI*, *TGFβRII* наряду с регуляторным белком циклин *D1* вовлечены в механизмы гормональной чувствительности/резистентности опухолей молочной железы к тамоксифену.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hinck A.P., Mueller T.D., Springer T.A.* Structural biology and evolution of the TGF-β family // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016. Vol. 8. P. a022103
2. *Akhurst R.J.* TGF beta signaling in health and disease // *Nat Genet.* 2004. Vol. 36. P. 790 – 792.

ДОЗИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ИЗДЕЛИЙ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИЙ ТРЕХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ

**А.С. Ермакова¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹,
И.А. Милойчикова^{1,2}, С.Г. Стучебров¹**

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г.Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

В работе были рассчитаны и экспериментально получены значения поглощенной дозы фотонов за пластиковыми образцами, изготовленными с помощью аддитивных технологий. Эксперимент проводился с помощью реального терапевтического линейного ускорителя ELEKTA SYNERGY для трех значений энергий фотонного пучка и клинической ионизационной камеры Waterproof PTW Farmer Chamber. Было проведено сравнение данных, полученных с помощью планирующей системы Monaco и экспериментальным путем. Из полученных результатов можно сделать вывод, что увеличение примеси металла в пластиках не оказывает влияния на значение поглощенной дозы. При изменении состава исследуемых образцов данные остаются неизменными.

Ключевые слова: лучевая терапия, клинический линейный ускоритель, технология трехмерной печати, фантомы, клиническая дозиметрия.

DOSIMETRIC STUDIES OF POLYMER PRODUCTS MANUFACTURED USING 3D PRINTING TECHNOLOGIES

A.S. Ermakova¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹, I.A. Miloichikova^{1,2},
S.G. Stuchebrov¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Annotation

In the work, the values of the absorbed dose of photons behind plastic samples made using additive technologies were calculated and experimentally obtained. The experiment was carried out using a real therapeutic linear accelerator ELEKTA SYNERGY for three photon beam energies and a clinical ionization chamber Waterproof PTW Farmer Chamber. A comparison was made between the data obtained using the planning system Monaco and experimentally. From the results obtained, it can be concluded that an increase in the metal impurity in plastics does not affect the value of the absorbed dose. The data remain unchanged, when the composition of the studied samples changes.

Key words: radiation therapy, clinical linear accelerator, 3D printing technology, phantoms, clinical dosimetry.

Актуальность. При проведении лучевой терапии необходимо с высокой точностью облучить опухолевые клетки, минимизируя при этом дозу на здоровые клетки. Для этих целей проводится дозиметрическое планирование облучения. Современные клинические ускорители являются источниками как фотонного, так и электронного излучения [1]. Подобные установки оснащаются дополнительной системой рентгеновской визуализации, что позволяет повысить точность облучения за счет улучшения качества позиционирования пациента. Одной из важных составляющих лучевой терапии является клиническая дозиметрия ионизирующего излучения, основной задачей которой являются выбор и обоснование средств облучения для обеспечения детального описания пространственно-временных распределений поглощенной энергии излучения и количественного описания полученного распределения.

Для приложений лучевой терапии активно используются аддитивные технологии, благодаря возможности быстро и качественно создавать объекты сложной формы. Основное использование аддитивных технологий в лучевой терапии направлено на разработку дозиметрических фантомов, предназначенных для клинической дозиметрии.

Фантомы представляют собой объекты с упрощенной геометрией, имитирующие органы и ткани человека, что облегчает возможность качественного планирования лучевой терапии. Фантомы – неотъемлемая часть системы управления качеством измерительного оборудования. На сегодняшний день существует огромное разнообразие фантомов.

Фантомы изготавливают из тканезквивалентных материалов, которые обладают различными радиологическими свойствами. Их подбирают в соответствии с радиологическими свойствами реальных тканей и органов пациента. Наибольшее распространение получили фантомы, изготовленные из воды и близких к ней по химическому и физическому составу материалов [2].

Целью исследования было проведение дозиметрических испытаний полимерных изделий, изготовленных с помощью технологий трехмерной печати.

Материал и методы

В работе исследуемые образцы из PLA-пластика (Bestfilament, Россия) [3] изготавливались на 3D-принтере Prusa i3 MK3S (Prusa Research, Чехия) [4], который работает по методу послойного наплавления. Трехмерные модели при таком методе создаются за счет последовательного нанесения слоев друг на друга. Катушка с термопластиком подает нить материала к экструдеру, он оснащен нагревательным элементом и соплом. Нагревательный элемент нагревает сопло, которое, в свою очередь, плавит материал и подает его на рабочую поверхность. Экструдер передвигается по рабочей поверхности в горизонтальном направлении при нанесении слоя, после чего начинает подниматься в вертикальном направлении на заданную толщину.

PLA-пластик является распространенным материалом для 3D-печати [5], благодаря простоте использования и ряду физических свойств. Это биоразлагаемый термопластик, который создается из возобновляемых ресурсов: сахарного тростника и кукурузы. Он экологичный и не выделяет токсичный запах при использовании, что делает его безопасным для печати в помещении. Для придания пластику определенных свойств в него можно добавить мелкодисперсную примесь, например металлическую. В работе исследовались образцы из PLA-пластика без примеси (PLA+0Cu) с коэффициентом заполнения (k) 90 % и 100 % и с примесью меди в концентрации 10, 20 и 30 % (PLA+10Cu, PLA+20Cu, PLA+30Cu) с коэффициентом заполнения (k) 100 %. На рис. 1 представлен внешний вид тестовых образцов.

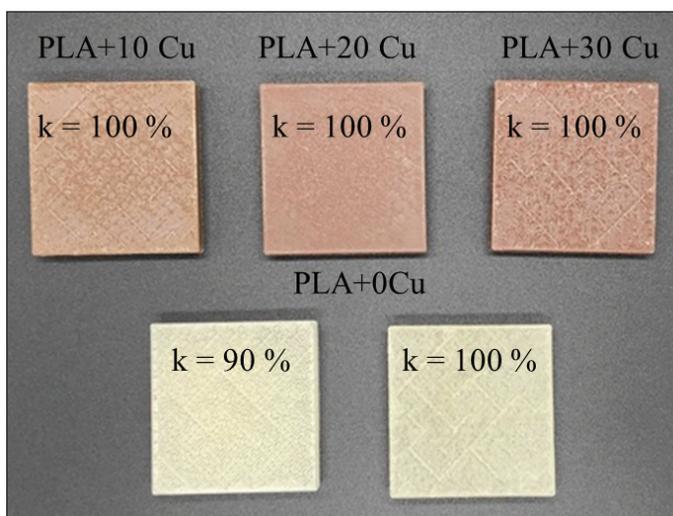


Рис. 1. Внешний вид тестовых образцов из PLA-пластика

На томографе GE LightSpeed 16 [6] были получены данные тестовых образцов, расположенных на глубине 4 см в водозквивалентном пластинчатом фантоме RW3 (PTW-Freiburg, Германия) [7]. За тестовым объектом располагалась ионизационная камера Waterproof PTW Farmer Chamber [8]. Результаты томографии представлены на рис. 2.

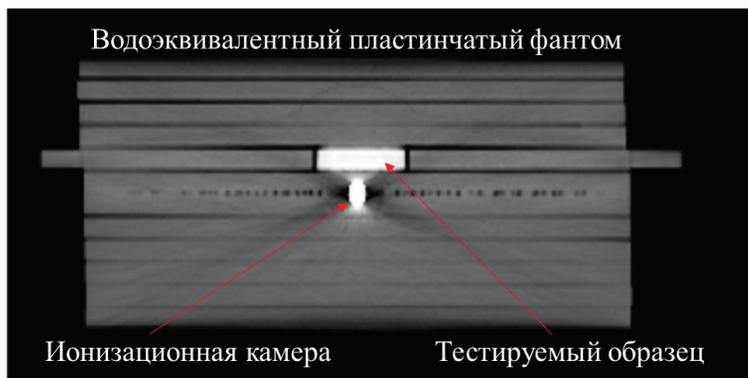


Рис. 2. Компьютерная томография эксперимента

С помощью полученных томографических данных было проведено планирование облучения тестовых объектов с помощью планирующей системы Monaco [9]. При планировании были выбраны следующие параметры: однополюсное облучение, размер поля – 10×10 см², фотонный пучок, нормальное падение пучка на поверхность фантома, предписанная доза в ионизационной камере – 2 Гр.

В эксперименте были получены значения поглощенной дозы от фотонного пучка в фантоме. Облучение проводилось фотонным пучком с энергией 6, 10 и 15 МэВ на линейном ускорителе ELEKTA SYNERGY (Elekta, Великобритания) [10], поглощенная доза регистрировалась ионизационной камерой Waterproof PTW Farmer Chamber [8]. Эксперимент проводился в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (г. Москва) [11].

Результаты

Были созданы планы облучения каждого тестового объекта и в соответствии с планами проводилось их облучение. Таким образом, были получены расчетные и экспериментальные значения доз в ионизационной камере за каждым тестовым объектом. На рис.3 представлен график зависимости разницы расчетной и экспериментальной поглощенной дозы (ΔD , %) от материала для трех значений энергий фотонного пучка.

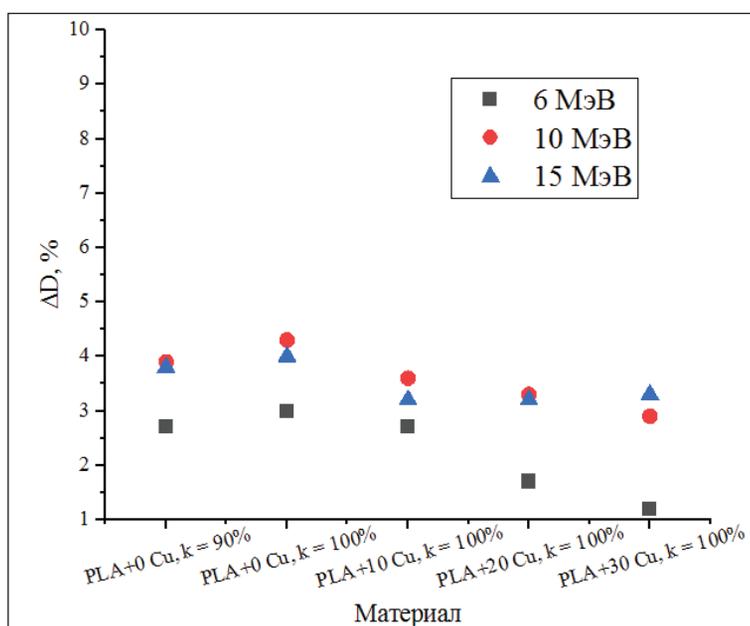


Рис. 3. Значения разницы расчетного и экспериментального значений поглощенной дозы (%) в разных материалах при энергиях 6, 10 и 15 МэВ фотонного пучка

Из полученных данных (рис. 3) видно, что увеличение количества медной примеси не влияет на характер экспериментального воспроизведения расчетных данных. Что позволяет сделать вывод о стабильности повторения результатов при изменении состава исследуемых объектов.

Выводы

Данная работа направлена на проведение дозиметрических испытаний образцов, изготовленных методом послойного наплавления из пластиковых материалов. Показано, что при увеличении металлической примеси в исследуемых образцах точность измерения дозы не меняется. Следовательно, данный подход может быть использован для создания гетерогенных дозиметрических фантомов методами трехмерной печати.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 19-79-10014

ЛИТЕРАТУРА

1. Черняев А.П., Колыванова М.А., Борщезовская П.Ю. Радиационные технологии в медицине. Часть 1: Медицинские ускорители // Вестник Московского университета. Серия 03. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. № 6. М.: 2015. С. 28–36.
2. Климанов В.А. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии. Часть 1: учеб. пособие для вузов. М.: НИЯУ МИФИ, 2011. 604 с. [Klimanov VA. Radiobiological and Dosimetric Planning in Radionuclide Therapy. Part 1: Student book. Moscow. 2011; 604. (in Russ.)].

3. *PLA-пластик* Bestfilament [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://bestfilament.ru/category/plastik-Bestfilament/?tipa_materiala
4. *3D ПРИНТЕР ORIGINAL PRUSA I3 MK3* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://3dradar.ru/post/47799/>
5. *Материалы для 3D-печати* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://3dprintstory.org/25-samih-populyarnih-materialov-dlya-3d-pechati>
6. *Томограф GE LightSpeed 16* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.medcom.ru/rbmed/ge/all.htm>
7. *Водозжвеляющий пластинчатый фантом RW3* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ptwdosimetry.com/en/products/rw3-slab-phantom/>
8. *Ионизационная камера Waterproof PTW Farmer Chamber* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.emf-japan.com/ptw/img/PDF/PTW30013.pdf>
9. *Планирующая система Монаса* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.elekta.com/dam/jcr:ed7bace5-ca6e-40be-9aca-21ec8bc36248/Monaco-Product-Brochure---Russian.pdf>
10. *Линейный ускоритель ELEKTA SYNERGE* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.elekta.com/radiotherapy/treatment-delivery-systems/elekta-synergy/>
11. *НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fnkc.ru/>

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ *IN SITU*

**Е.А. Здерева, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, О.В. Шpileва,
О.Н. Чуруксаева, Л.А. Коломиец, Н.В. Литвяков**

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Для населения России заболеваемость злокачественными новообразованиями (ЗНО) является острой медицинской и социальной проблемой. Злокачественные опухоли репродуктивной системы являются наиболее частыми в структуре онкологической заболеваемости женщин, среди которых рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее распространенных форм новообразований, занимая седьмое место в мире среди всех ЗНО, четвертое – среди всех ЗНО женского населения и второе – среди ЗНО женских репродуктивных органов после рака молочной железы. Этиологическим фактором для возникновения рака шейки матки более чем в 90 % случаев является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР). Результатом раннего выявления РШМ *in situ* является предотвращение дальнейшего прогрессирования злокачественного процесса. Таким образом, **целью работы** является выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. **Материал и методы.** Всего в исследование было включено 27 пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR Real Time (RotorGene 6000, «Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток. **Результаты.** В результате проведенного исследования было установлено, что инфицированность ВПЧ ВКР в изучаемой выборке составила 63,0 %. Генотипирование ВПЧ-позитивных образцов показало, что у 76,5 % пациенток наблюдалось преобладание ВПЧ 16 генотипа, на втором месте оказался ВПЧ 33 и 56 типов (по 17,7 %). Также было выявлено преобладание моноинфекции (70,5 %). При определении вирусной нагрузки было установлено, что в ВПЧ-позитивных образцах практически во всех случаях определена клинически значимая вирусная нагрузка. **Заключение.** Проведено выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. Показан высокий уровень инфицированности ВПЧ ВКР в исследуемой выборке пациенток, наличие высокого уровня клинически значимой нагрузки и преобладание ВПЧ 16 генотипа.

Ключевые слова. Рак шейки матки *in situ*, вирус папилломы человека.

HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL CANCER *IN SITU*

**E.A. Zdereva, M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov, O.V. Shpileva,
O.N. Churuksaeva, L.A. Kolomiets, N.V. Litvyakov**

Cancer Research Institute Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Annotation

For the population of Russia, the incidence of malignant neoplasms (MN) is an acute medical and social problem. Malignant tumors of the reproductive system are the most common in the structure of oncological morbidity in women, among which cervical cancer (CC) remains one of the most common forms of neoplasms, ranking seventh in the world among all MNs, fourth among all MNs in the female population and second among MNs female reproductive organs after breast cancer. The etiological factor for the occurrence of cervical cancer (CC) in more than 90% of cases is infection with the human papillomavirus (HPV) of high carcinogenic risk (HRC). The result of early detection of cervical cancer *in situ* is the prevention of further progression of the malignant process. Thus, **the aim** of the work is to identify, type and determine the viral load of HRC HPV in patients diagnosed with cervical cancer *in situ*. **Material and methods.** A total of 27 patients diagnosed with cervical cancer *in situ* were included in the study. The diagnosis was verified histologically, and the tumors were characterized according to the FIGO classification. The material for the study was scrapings of the epithelium of the cervical canal and the outer part of the cervix. Detection and genotyping of HPV DNA was performed by PCR Real Time (RotorGene 6000, Corbett Research, Australia) using reagent kits from Amplisens® (Moscow, Russia). The value of the viral load was calculated in HPV DNA genomic equivalents/10⁵ cells. **Results.** As a result of the study, it was found that HCV HPV infection in the study sample was 63.0%. Genotyping of HPV-positive samples showed that in 76.5% of patients the prevalence of HPV 16 genotype was observed, in second place was HPV types 33 and 56 (17.7% each). It was also revealed the predominance of mono-infection (70.5%). When determining the viral load, it was found that clinically significant viral load was determined in almost all cases in HPV-positive samples. **Conclusion.** Detection, typing and determination of HCV HPV viral load in patients diagnosed with cervical cancer *in situ* was carried out. A high level of HCV HPV infection in the studied sample of patients, a high level of clinically significant load, and the prevalence of HPV genotype 16 were shown.

Key words. Cervical cancer *in situ*, human papillomavirus.

Актуальность. Актуальность проблемы своевременного выявления и лечения нулевой стадии РШМ обусловлена, с одной стороны, развитием этого заболевания у женщин молодого возраста, а с другой – недостаточной эффективностью существующих методов лечения. Результатом раннего выявления РШМ *in situ* является предотвращение дальнейшего прогрессирования злокачественного процесса.

Цель исследования – выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*.

Материал и методы

В исследование включено 27 пациенток в возрасте от 24 до 79 лет с диагнозом РШМ *in situ*. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR Real Time (RotorGene 6000, «Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток.

Результаты

Наличие ВПЧ-положительного РШМ *in situ*, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, было обнаружено у 17 пациенток (63,0 %) и у 10 больных (37,0 %) ВПЧ в опухоли не был выявлен. Стоит отметить, что в одном из ранее проводимых исследований частота ВПЧ-положительных пациенток с РШМ I–IV стадий составила 86 % [1]. Однако в других исследованиях частота ВПЧ-положительных пациенток составила уже 72,4 %, у 27,6 % пациенток ВПЧ в опухоли выявлен не был [2].

Генотипирование вирус-положительных образцов показало превалирование ВПЧ 16 типа (76,5 случаев), что согласуется с литературными данными и полученными ранее результатами (49,0 % и 67,8%) [1, 2]. На втором месте по частоте встречаемости находятся ВПЧ 33 и 56 (по 17,7 %). Согласно предыдущим исследованиям, в группе больных РШМ I–IV второе место занимал ВПЧ 31 типа (16,0%) [1]. В то время как в другом исследовании в данной группе больных второе место занимал только ВПЧ 33 (22,6 %) [2]. Для пациенток с РШМ *in situ* в 5,9 % случаев детектировали ВПЧ 39, 45, 51, 52 типов (рис. 1).

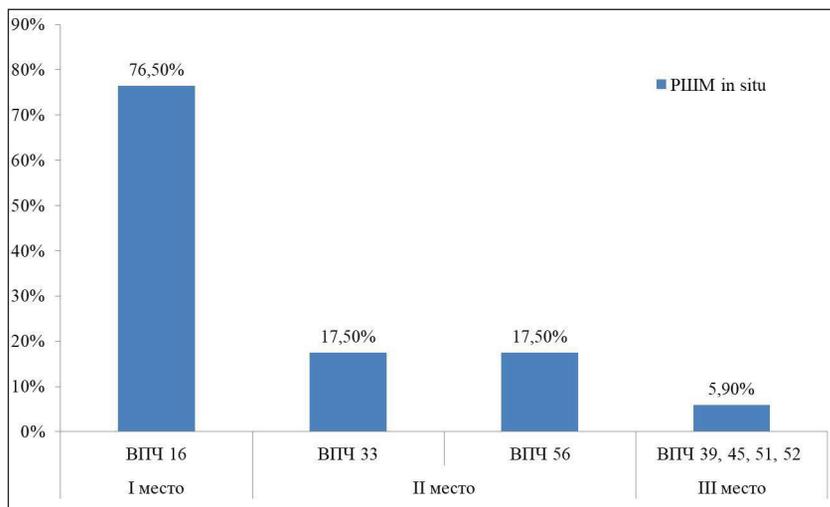


Рис. 1. Распределение частот встречаемости генотипов ВПЧ ВКР в группе пациенток с раком шейки матки *in situ*

В результате исследования распространенности моно- и микстинфицирования было выявлено преобладание моноинфицирования (70,5 %), а частота встречаемости 2 и более генотипов вируса одновременно составила 29,5 %. При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки (<3lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток) в исследуемой группе пациенток составило 29,4 %, при этом показатель высокой (клинически значимой) вирусной нагрузки (>3lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток) составил 70,6 %. Согласно предыдущим результатам, в группе женщин с РШМ I–IV был выявлен показатель малозначимой вирусной нагрузки, равный 22,6 %, а то время как показатель клинически значимой вирусной нагрузки составил 77,4 % [2].

Заключение

Проведено выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. Показан высокий уровень инфицированности ВПЧ ВКР в исследуемой выборке пациенток, наличие высокого уровня клинически значимой нагрузки и превалирование ВПЧ 16 генотипа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева Е.В., Токарская О.А., Баирова Т.А. Особенности распространения папилломавирусной инфекции в различных регионах Российской Федерации (обзор литературы) // Acta Biomedica Scientifica. 2018. Т. 3. №. 3.
 2. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В. Анализ выживаемости больных ВПЧ-ассоциированным и ВПЧ-негативным раком шейки матки // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9. №. 3-4.

**ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ
 ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ
 НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ:
 СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
 медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

На сегодняшний день в литературе очень мало данных, сравнивающих профиль экспрессии у пациенток с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) во время предоперационного лечения. Как правило, исследования в этом направлении касаются именно молекулярного профилирования опухоли в процессе лечения. Более того, не было обнаружено публикаций, в которых обсуждался бы вопрос об изменении профиля экспрессии у больных РМЖ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования при проведении неoadъювантной химиотерапии (НХТ). В связи с этим представляется актуальным

проведение транскриптомных анализов опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, CNA, гематогенное метастазирование

WHOLE TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF BREAST TUMOR DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY: CORRELATION TO HEMATOGENOUS METASTASIS

M.K. Ibragimova, M.M. Tsyganov, N.V. Litviakov

Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Annotation

To date, there are very few data in the literature comparing the expression profile of patients diagnosed with breast cancer (BC) during preoperative treatment. As a rule, research in this direction concerns precisely the molecular profiling of the tumor during treatment. Moreover, no publications were found in which the issue of changing the expression profile of patients with breast cancer, depending on the status of hematogenous metastasis during neoadjuvant chemotherapy (NAC), would be discussed. In this regard, it seems relevant to carry out a transcriptome analyses of a breast tumor in the process of NAC, depending on the presence/absence of hematogenous metastasis.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, CNA, hematogenous metastasis

Актуальность. В настоящее время в литературных источниках крайне малочисленны данные по сравнению экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в процессе проведения НХТ. Однако представлены данные по молекулярному профилированию опухоли в процессе лечения. Например, в работе по исследованию изменения генетического ландшафта трижды негативного РМЖ после предоперационной химиотерапии при оценке мутационных аллелей и CNA показано увеличение количества копий членов семейства *AKT* и *CCND* и генов *MYC* и *MCL1* [1]. Также в исследовании S. Loibl с использованием секвенирования нового поколения на большой выборке (851 пациентка с РМЖ) была оценена значимость геномных изменений при проведении предоперационного лечения. Были проанализированы мутации генов *AKT1*, *BRAF*, *CDH1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ESR1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *SF3B1*, *TP53*, *HNFI1A*, *PIK3CA*, *PTEN* и оценено изменение числа копий генов *CCND*, *ERBB2*, *FGFR1*, *PAK1*, *PIK3CA*, *TOP2A*, *TP53*, *ZNF703*. Выявлено, что наиболее часто в процессе НХТ наблюдались мутации генов *TP53* (38,4%) и *PIK3CA* (21,5%), а также присутствовали амплификации генов *TOP2A*, *ERBB2* и *ZNF703* - более чем в 30% случаев, *TP53* и *PIK3CA* - более чем в 20% случаев, *CCND1*, *PAK1* и *FGFR* - более чем в 12% случаев [2].

При этом в литературе крайне малочисленны данные по сравнению полного экспрессионного профиля больных РМЖ в процессе проведения предоперационного лечения. В этой связи, **целью исследования** явилось проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от статуса отдаленного (гематогенного) метастазирования.

Материал и методы

Когорта исследования представлена 60 больными РМЖ люминального В подтипа, T1–4N0–2M0, средний возраст – 46,2±0,4 года. Пациенткам назначалось 4–8 курсов системной НХТ (схемы FAC, AC, CAx, CP, ACT, AT). В качестве материала для проведения исследования использованы парные биопсийные и операционные образцы, до и после проведения НХТ соответственно. Из вышеуказанных образцов выделялась РНК при помощи набора реагентов RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Далее с использованием платформы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0 был проведен анализ полученных данных.

Результаты

Оценено изменение экспрессионного профиля больных РМЖ в зависимости от статуса отдаленного метастазирования (наличия или отсутствия) до и после проведения неoadъю-

вантной химиотерапии. Было обнаружено, что количество ДЭГ (дифференциально экспрессируемых генов) в опухоли пациенток до лечения с различным статусом гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 генов группы Up-regulated, 5 генов группы Down-regulated). После проведения предоперационной химиотерапии в опухоли этих же пациенток с различным статусом отдаленного метастазирования были идентифицированы более существенные различия – 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (рис. 1а, б).

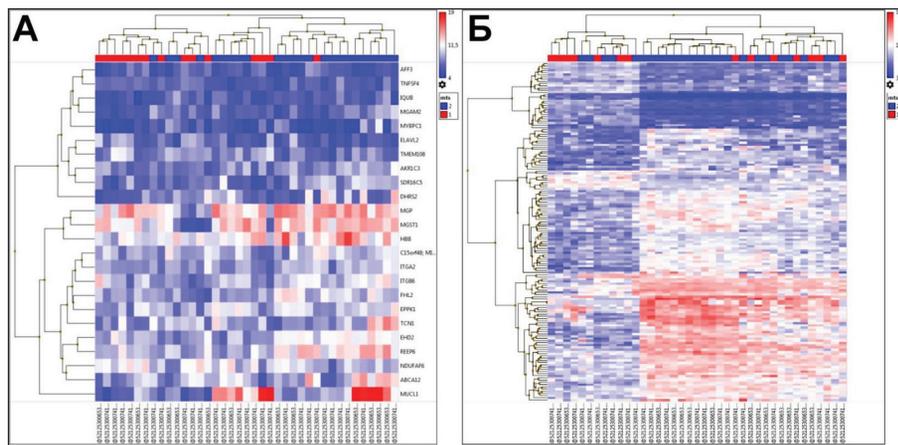


Рис. 1. Тепловая карта дифференциально экспрессируемых генов в опухоли пациенток с диагнозом РМЖ: а - до проведения лечения, б - после проведения предоперационной химиотерапии, с различным статусом отдаленного метастазирования (в каждом случае: есть гематогенное метастазирование – 1, нет – 2)

Согласно данным диаграммы Венна, для пациенток с РМЖ с различным статусом гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ определено пересечение ДЭГ по 1 гену, расположенному в 19 хромосоме, *EHD2* (19q13.33) (рис. 2).

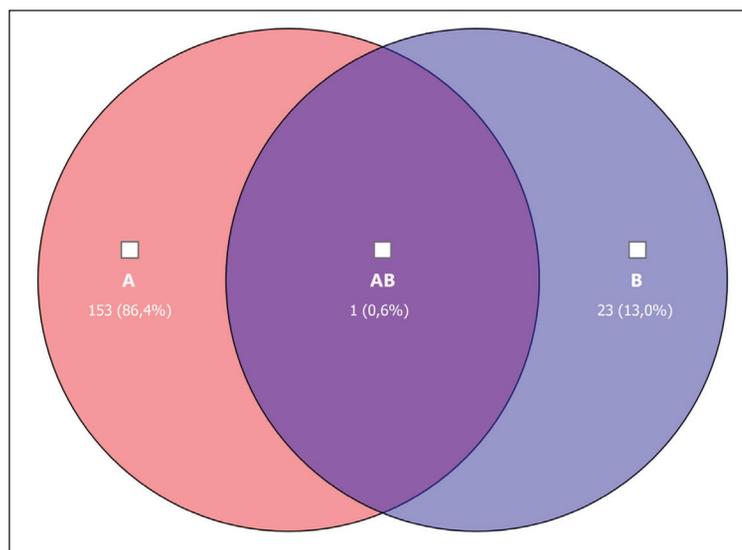


Рис. 2. Диаграмма Венна по пересечению дифференциально экспрессируемых генов у больных РМЖ с различным статусом гематогенного метастазирования до и после проведения неoadъювантной химиотерапии

Согласно литературным данным, для вышеуказанного гена *EHD2* в образцах серозного рака яичников наблюдается повышение экспрессии по сравнению с нормальным эпителием [3]. Также экспрессия данного гена вовлечена в патогенез плоскоклеточного рака пищевода, что позволяет определять *EHD2* как прогностический фактор для данного типа рака [4]. Более того, *EHD2* является негативным регулятором инвазии и миграции в клетках РМЖ и в перспективе может быть рассмотрен как фактор прогрессирования для таких больных [5].

Выводы

Оценено изменение экспрессионного профиля больных с диагнозом рак молочной железы в зависимости от статуса отдаленного метастазирования (наличия или отсутствия) до и после проведения предоперационной химиотерапии.

Работа выполнена в рамках конкурса 2021–2023 гг. на получение стипендии Президента РФ молодыми учеными и аспирантами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balko J.M., Giltane J.M., Wang K., et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets// *Cancer discovery*. 2014. Vol. 4, № 2. P. 232–45.
2. Loibl S., Treue D., Budczies J., et al. Mutational diversity and therapy response in breast cancer—a sequencing analysis in the neoadjuvant GeparSepto trial// *Clinical Cancer Research*. 2019. Vol. 25, № 13. P. 3986–3995.
3. Bignotti E., Tassi R.A., Calza S., et al. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy// *Gynecologic oncology*. 2006. Vol. 103, № 2. P. 405–16.
4. Li M., Yang X., Zhang J., et al. Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma// *Medical Oncology*. 2013. Vol. 30, № 1. P. 396.
5. Yang X., Ren H., Yao L., et al. Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells// *Tumor Biology*. 2015. Vol. 36, № 5. P. 3717–26.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ В ОТНОШЕНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

А.И. Касатова^{1,2}, С.Ю. Таскаев^{1,2}

Институт ядерной физики СО РАН, г. Новосибирск, Россия¹
Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) может быть перспективным методом лечения колоректальной аденокарциномы. Выполненные ранее на ускорительном источнике нейтронов *in vitro* эксперименты показывают эффективность в отношении клеток линии SW-620. В данном исследовании было проведено облучение мышей с подкожным ксенографтом SW-620. Борфенилаланин, боркапнат и липосомы с боркапнатом использовали как препараты доставки бора и вводили внутривенно. Наблюдение после БНЗТ проводилось в течение 60 дней: измеряли линейные размеры опухолей, вычисляли объем и индекс прироста опухоли (ИПО). Удовлетворительное состояние животных сохранялось в течение всего периода наблюдения, летальности не наблюдалось. Наилучший результат был достигнут в группе БНЗТ с борфенилаланином: первые достоверные отличия в объемах опухолей по сравнению с контролем были отмечены на 9-е сут после БНЗТ, в конце наблюдения наименьший средний объем ксенографта был также отмечен в этой группе, ИПО в первом периоде наблюдения был равен $5,23 \pm 2,32$, во втором периоде — $21,46 \pm 13,87$. Объемы в группах БНЗТ с боркапнатом и с липосомальным боркапнатом также имели достоверные отличия от контрольной группы: ИПО за первый период составил $5,42 \pm 0,87$ и $8,91 \pm 7,87$; за второй период — $19,47 \pm 10,18$ и $31,00 \pm 22,69$ соответственно. В группе облучения без препаратов также наблюдали уменьшение объемов ксенографтов по сравнению с контрольной группой, что может быть обусловлено присутствием доз от быстрых нейтронов, гамма облучения и азотной дозы. Более выраженный эффект замедления роста опухолей в группах БНЗТ наблюдался в первый месяц после проведения БНЗТ, что может быть следствием недостаточного накопления изотопа ^{10}B в опухоли. Так как во всех группах БНЗТ прогрессирование роста ксенографтов SW-620 было достоверно меньше, чем в контрольной, БНЗТ можно считать потенциально применимой методикой лечения колоректального рака. Дополнительные исследования необходимы, чтобы создать оптимальную концентрацию ^{10}B в опухоли и, соответственно, увеличить получаемую ею дозу.

Ключевые слова. Бор-нейтронозахватная терапия, колоректальная аденокарцинома человека SW-620, ускорительный источник эпителиальных нейтронов, препараты доставки бора.

EFFICACY OF BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY ON HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA: EXPERIMENTAL STUDY IN THE MOUSE MODEL

A.I. Kasatova^{1,2}, S.Yu. Taskaev^{1,2}

Budker Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk, Russia¹
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia²

Annotation

Boron neutron capture therapy (BNCT) may be a promising method for the treatment of colorectal adenocarcinoma. Previous *in vitro* experiments at accelerator based neutron source show effectiveness on SW-620 cells. In current study, mice with subcutaneous xenograft SW-620 were irradiated. Boron delivery drugs: boronphenylalanine, sodium borocaptate and liposomes with borocaptate were administered intravenously. Follow-up period after BNCT lasted for 60 days: linear sizes of tumors were measured, volume and tumor growth index were calculated using formulas. Satisfactory condition of the animals was maintained throughout the observation period; no lethality was observed. The best result was achieved in BNCT with boronphenylalanine group: the first significant differences in tumor volume compared to the control were noted on the 9th day after BNCT; at the end of the observation, the smallest average xenograft volume was also noted in this group; tumor growth index was 23 ± 2.32 , in the second period it was 21.46 ± 13.87 . The volumes in BNCT groups with borocaptate and liposomes with borocaptate also had significant differences from the control group, tumor growth index for the first period was 5.42 ± 0.87 and 8.91 ± 7.87 ; for the second period - 19.47 ± 10.18 and 31.00 ± 22.69 , respectively. In the irradiation group, a decrease in xenograft volumes was also noticed compared to the control group, which may be due to the presence of fast, thermal neutrons and gamma irradiation in the epithermal neutron beam. A more pronounced effect of tumor growth inhibition in all BNCT groups was observed during the first month after BNCT, which may be due to insufficient concentration of ^{10}B isotope in the tumor. Since the progression of SW-620 xenograft in all BNCT groups was significantly slower than in the control group, BNCT can be considered a potentially applicable method for the treatment of colorectal cancer. Additional studies will increase the concentration of ^{10}B in the tumor and the dose it receives.

Key words. Boron neutron capture therapy, human colorectal adenocarcinoma SW-620, accelerator based epithermal neutron source, boron delivery drugs.

Актуальность. Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является перспективным методом лечения многих онкологических заболеваний. Имеется клинический опыт проведения терапии пациентам с глиомами высокой степени злокачественности [1], меланомой [2], раком головы и шеи [3], метастазами печени [4], раком легкого [5], злокачественной мезотелиомой [6] и прочими нозологиями. Она основана на взаимодействии накопленного в опухолевой ткани изотопа ^{10}B и теплового нейтрона, в результате чего образуются α -частица и ядро лития, длина пробега которых не превышает размера клетки, что позволяет избирательно уничтожать клетки злокачественных опухолей [7].

Колоректальный рак является одним из лидеров по распространенности и причинам смертности среди онкопатологий [8]. Перспективным методом лечения этой злокачественной опухоли может стать бор-нейтронозахватная терапия при условии селективного уничтожения опухолевых клеток и интактности здоровых тканей. Ранее уже была доказана эффективность БНЗТ *in vitro* на клеточной линии колоректальной аденокарциномы SW-620 на источнике нейтронов ускорительного типа. Доля выживших клеток по данным клоногенного анализа в группах, облученных с борфенилаланином и с липосомами, содержащими боркаптант, составила 14 %, с боркаптантом – 11 % [9].

Цель исследования – определить эффективность бор-нейтронозахватной терапии, используя различные препараты доставки бора на модели подкожного ксенографта колоректальной аденокарциномы человека.

Материал и методы

Исследование выполнено на площадке ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН на иммунодефицитных самцах мышей SCID (*SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}*) SPF-статуса в возрасте 8–10 нед. Все эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive 86/609 EEC).

В работе использовали клеточную культуру колоректальной аденокарциномы человека (SW-620), полученную из криобанка ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН. Клетки культивировали на среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки. Для получения солидных опухолей каждому животному подкожно вводили 100 мкл суспензии, содержащей 10 млн клеток в область правого бедра. Эксперимент начинали через 3 нед после инокуляции опухолевых клеток при достижении объемов ксенографтов 20–90 мм³. Линейные размеры образований измеряли штангенциркулем трехкратно, объем рассчитывали по формуле: (длина средняя × ширина средняя²) × 0,52. Для вычисления индекса прироста опухоли использовали формулу: объем ксенографта в определенный день исследования / объем ксенографта в день начала эксперимента [10].

Контрольной группе (n=6) не вводили препараты, содержащие бор, и не облучали; 2-ю группу (n=4) облучали без введения борсодержащих препаратов; 3-й группе (n=4) вводили борфенилаланин (ВРА) в дозе 350 мг/кг за 2 ч до БНЗТ; 4-й группе (n=4) вводили боркапнат натрия (BSH) в дозе 100 мг/кг также за 2 ч до БНЗТ; 5-й группе (n=5) вводили PEG-липосомы, содержащие BSH, в дозе 100 мг/кг за 24 ч до БНЗТ. Все препараты вводили внутривенно в ретроорбитальный синус. Анестезию проводили внутрибрюшинным введением домитора 0,1 % и золетила 99,9 %. Облучение проводили на источнике нейтронов ускорительного типа в ИЯФ СО РАН [11] в течение 90 мин, расчётная доза в опухоли для БНЗТ с ВРА составила $14,7 \pm 5,9$ Гр-экв, для БНЗТ с BSH – $6,6 \pm 0,5$ Гр-экв, для БНЗТ с липосомами – $8,8 \pm 3,5$ Гр-экв. Укладку мышей осуществляли по описанной ранее методике [12].

Наблюдение проводили в течение 60 дней после БНЗТ. Запланированную эвтаназию проводили передозировкой CO_2 , сопровождаемой цервикальной дислокацией.

Количественные данные выражали как среднее \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы STATISTICA 8.0, используя непараметрический U критерий Манна–Уитни при уровне достоверности 95 %.

Результаты

Достоверные различия в замедлении роста опухолей у животных из группы БНЗТ с ВРА относительно контрольной впервые отметили на 9-е сут ($p=0,019$), из группы БНЗТ с BSH – на 28-е сут ($p=0,033$), из группы БНЗТ с липосомами, содержащими BSH, – на 23-и сут ($p=0,028$) (рис. 1). Достоверность различий между объемами ксенографтов в группах БНЗТ и контрольной группе сохранялась в течение всего периода наблюдения. Наиболее заметная динамика роста опухолей была выявлена в контрольной группе, и, по этическим соображениям, животных с объемом ксенографта более 4 мм^3 вывели из эксперимента на 30-е сут после БНЗТ.

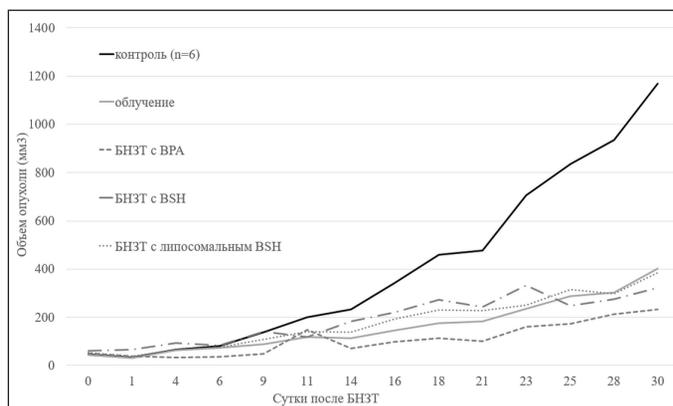


Рис. 1. Динамика роста подкожных опухолей SW-620 в разных группах в первый период наблюдения. Ось абсцисс – сутки после БНЗТ; ось ординат – объем опухоли (мм^3)

Таким образом, период наблюдения разделили на 2: первые 30 сут, 31–60 сут после БНЗТ. Во втором периоде наблюдения замедление роста опухолей в опытных группах было менее выражено в сравнении с контролем (рис. 2).

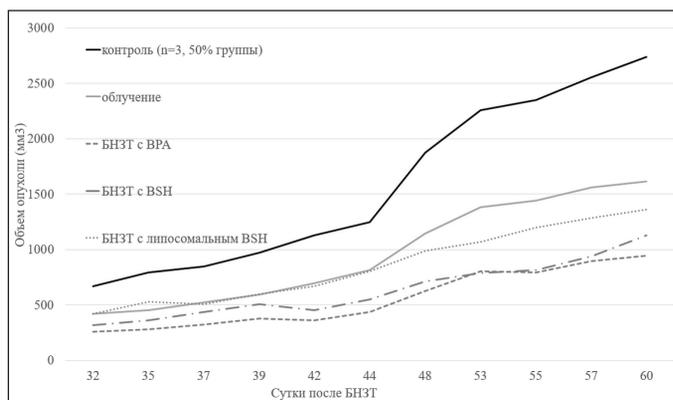


Рис. 2. Динамика роста подкожных опухолей SW-620 в разных группах во второй период наблюдения. Ось абсцисс – сутки после БНЗТ; ось ординат – объем опухоли (мм^3)

ИПО увеличился с 5 до 20 в группах БНЗТ с борфенилаланином и боркапнатом за второй период наблюдения. Быстрее прогрессировали новообразования в группе БНЗТ с липосомальным BSH: ИПО составил $31 \pm 22,7$. В группе облучения индекс прироста опухоли также увеличился в 4 раза по сравнению с первым периодом наблюдения и был равным $44,39 \pm 24,9$. В группе облучения также наблюдалось уменьшение объемов опухолей по сравнению с контрольной группой. Это можно объяснить присутствием быстрых, тепловых нейтронов и гамма-облучения в пучке эпитепловых нейтронов. Благодаря укладке животных в специальный контейнер из литиевого полиэтилена общая доза, полученная телом мыши, была снижена. Состояние в течение всего периода наблюдения было удовлетворительным, двигательная активность и аппетит сохранялись, никаких серьезных осложнений отмечено не было.

Заключение

Прогрессирование объёмов ксенографтов SW-620 в группах БНЗТ достоверно отличалось от скорости роста опухолей в контрольной группе в течение всего периода наблюдения, что говорит о перспективности использования методики БНЗТ для лечения колоректального рака. Более выраженный эффект, однако, был отмечен в первый месяц после проведения БНЗТ. Причиной этого может быть недостаточная концентрация изотопа ^{10}B в опухоли, вследствие чего доза, полученная ксенографтом, могла быть недостаточной для полного контроля над опухолью. Требуется проведение дополнительных исследований по повышению дозировок борсодержащих препаратов и выбору пути их введения.

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 19-72-30005) с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Авторы выражают благодарность А.Н. Макарову, Д.А. Касатову, И.М. Щудло, Я.А. Колесникову, Е.О. Соколовой, А.М. Кошкареву, Т.А. Быкову, С.С. Савинову за обеспечение генерации нейтронов, Т.В. Сычевой за проведение дозиметрических расчетов, В.В. Каныгину, Е.Л. Завьялову, И.А. Разумову, А.И. Кичигину за помощь в организации биологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamamoto T., Nakai K., Tsurubuchi T., Matsuda M., Shirakawa M., Zaboronok A., Endo K., Matsumura A. Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma: a pilot study in Tsukuba // *Appl Radiat Isot.* 2009. Vol. 67, N 7-8 P 25-6.
2. Hiratsuka J., Kamitani N., Tanaka R., Tokiya R., Yoden E., Sakurai Y., Suzuki M. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT) // *J Radiat Res.* 2020. Vol. 61, N 6. P. 945-951.
3. Koivumoro H., Kankaanranta L., Seppälä T., Haapaniemi A., Mäkitie A., Joensuu H. Boron neutron capture therapy for locally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: An analysis of dose response and survival // *Radiotherapy and Oncology.* 2019. V. 137. P. 153-158.
4. Zonta A., Pinelli T., Prati U., Roveda L., Ferrari C., Clerici A.M., Zonta C., Mazzini G., Dionigi P., Altieri S., Bortolussi S., Bruschi P., Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned // *Applied Radiation and Isotopes.* 2009. Vol. 67 N 7-8. P. 67-75.
5. Suzuki M. Reirradiation for locally recurrent lung cancer in the chest wall with boron neutron capture therapy (BNCT): A case report // In: Presented at the 15th international congress on neutron capture therapy. Tsukuba, Japan. 2012
6. Alberti D., Deagostino A., Toppino A., Protti N., Bortolussi S., Altieri S., et al. An innovative therapeutic approach for malignant mesothelioma treatment based on the use of Gd/boron multimodal probes for MRI guided BNCT // *J Control Release.* 2018. Vol. 280. P. 31-8.
7. Таскаев С.Ю. Бор-нейтронозахватная терапия злокачественных опухолей: основы, история и текущее состояние // *Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия.* 2019. Т. 2, № 2. С. 66-83.
8. ВОЗ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
9. Каныгин В.В., Касатова А.И., Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Кичигин А.И., Мухамадияров Р.А., Таскаев С.Ю. Оценка эффективности воздействия бор-нейтронозахватной терапии на различные опухолевые и нормальную клеточные культуры // *Сибирский онкологический журнал.* 2021. Т. 20, № 3. С. 56–66.
10. Соловьева О.И., Завьялов Е.Л., Теплякова Т.В., Лебедев Л.Р., Разумов И.А. Эффект экстракта мицелия *duddingtonia flagrans* на подкожные ксенографты клеток с33а карциномы шейки матки человека // *Сибирский онкологический журнал.* 2020. Т. 19, № 6. С.93-98.
11. Taskaev S., Berendeev E., Bikchurina M., Bykov T., Kasatov D., Kolesnikov I., Koshkarev A., Makarov A., Ostreinov G., Porosev V., Savinov S., Shchudlo I., Sokolova E., Sorokin I., Sycheva T., Verkhovod G. Neutron Source Based on Vacuum Insulated Tandem Accelerator and Lithium Target // *Biology.* 2021. Vol. 10, “350”.
12. Zavjalov E., Zaboronok A., Kanygin V., Kasatova A., Kichigin A., Mukhamadiyarov R., Razumov I., Sycheva T., Mathis B.J., Maezono S.E.B., Matsumura A., Taskaev S. Accelerator based boron neutron capture therapy for malignant glioma: a pilot neutron irradiation study using boron phenylalanine, sodium borocaptate and liposomal borocaptate with a heterotopic U87 glioblastoma model in SCID mice // *Int. J. Radiat. Biol.* 2020. Vol. 96, N 7. P. 868-878.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ВЫЯВЛЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ШЕЙКИ МАТКИ

Е.В. Каюкова¹, Л.Е. Ашрафян², Т.Е. Белокриницкая¹, В.А. Мудров¹

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»

Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия¹,

ФГБОУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва, Россия²

Аннотация

Высшие жирные кислоты (ВЖК) с нечетным числом атомов углерода не характерны для здоровых тканей, однако являются компонентами биологических мембран клеток в локусах неоплазий, на участках гиперпролиферации. Цель исследования – установить информативность использования определения локальных величин ВЖК с нечетным числом атомов углерода в качестве диагностических биохимических критериев наличия онкологической патологии шейки матки. Материал и методы. Проведен ретроспективный анализ ранее полученных результатов исследования по изучению спектра ВЖК у больных с предраком и раком шейки матки. Результаты. Диагностическим значением для выявления онкологической патологии шейки матки обладали локальные величины $C_{17:0}$, $C_{19:0}$, $C_{17:1}$. Заключение. Наилучшим биохимическим диагностическим маркером, позволяющим выявить онкологическую патологию шейки матки, является пороговая локальная величина $C_{17:1}$, менее или равная 2,12 %/клетка ($Se=0,9$; $Sp=1,0$; $Ac=0,88$; $AUC=0,91$).

Ключевые слова: предрак, рак шейки матки, высшие жирные кислоты.
Diagnostic potential of fatty acids in the cervical oncopathology detection

E.V. Kayukova¹, L.A. Ashrafyan², T.E. Belokrinitskaya¹, V.A. Mudrov¹

Chita State Medical Academy, Chita, Russia¹

Kulakov V.I. Obstetrics, Gynecology and Perinatology National Medical Research Center, Moscow, Russia²

Annotation

Fatty acids (FA) with an odd number of carbon atoms are not typical for healthy tissues, however, they are components of biological cell membranes in neoplasia, areas of hyperproliferation. Aim of the study: to establish the diagnostic value of local FA with an odd number of carbon atoms as biochemical criteria for the oncological pathology of the cervix. Material and research methods. A retrospective analysis of previously obtained results was carried out. Research results. The local values $C_{17:0}$, $C_{19:0}$, $C_{17:1}$ had a diagnostic value for the detection of oncological pathology of the cervix. Conclusion. $C_{17:1}$ value $\leq 2.12\%/cell$ ($Se=0.9$; $Sp=1.0$; $Ac=0.88$; $AUC=0.91$) was the best diagnostic marker for oncological pathology of the cervix ($Se=0.9$; $Sp=1.0$; $Ac=0.88$; $AUC=0.91$).

Key words: precancer, cervical cancer, fatty acids.

Введение. Атипичный метаболизм липидов является одной из особенностей опухолевых клеток [1]. Ранее нами были установлены особенности спектра высших жирных кислот (ВЖК) в процессе цервикального канцерогенеза: избыток насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, дефицит полиеновых аналогов, увеличение числа ВЖК с нечетным числом атомов углерода, что определяет не только иное строение биологической мембраны опухолевой клетки, но и изменение ее характеристик, активацию ряда проонкогенных путей, способствующих потенцированию опухоли [2].

Цель исследования – оценить возможность использования ВЖК с нечетным числом атомов углерода в качестве молекулярных диагностических критериев онкологической патологии шейки матки.

Материал и методы

Выполнено ретроспективное исследование ранее полученных данных по изучению спектра ВЖК среди здоровых лиц ($n=30$), а также женщин с наличием онкологической патологии шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени $n=53$, рак

шейки матки I стадии n=45). Материал для исследования – биоптат шейки матки. Метод исследования – газожидкостная хроматография.

На первом этапе для каждого показателя рассчитывалось пороговое значение путем проведения ROC-анализа.

Качество исследуемых диагностических маркеров оценивалось путем расчета чувствительности (Se), специфичности (Sp) и точности (Ac).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, license No. Z125-3301-14, США) [3].

Результаты

Среди представителей насыщенных жирных кислот с нечетным числом атомов углерода диагностической значимостью для выявления онкологической патологии шейки матки обладали локальные величины: C_{17:0} – менее или равная 2,53% клетка (Se=0,56; Sp=0,90; Ac=0,54; AUC=0,81), C_{19:0} – более или равная 1,17%/клетка (Se=0,47; Sp=1,0; Ac=0,6; AUC=0,73). Следует отметить, что чувствительность обоих маркеров была крайне низкой (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристика диагностических маркеров на основании изучения спектра ВЖК в биоптатах шейки матки для выявления онкопатологии шейки матки

Параметр	Пороговое значение, %/клетка	Исследуемые группы		Тестовая статистика, df=1	Сила связи	Относительный риск	Se	Sp	Ac	AUC	95% ДИ для AUC	Значимость
		Контроль	Онкопатология									
C _{15:0}	≤2,38	93,3% (28/30)	73,5% (72/98)	χ ² =5,3, p=0,02	V=0,2	0,29 (95% ДИ 0,04-0,89)	0,27	0,93	0,58	0,42	0,33-0,51	p=0,18
C _{15:1}	≤1,67	3,33% (1/30)	28,6% (28/98)	χ ² =8,35, p=0,004	V=0,26	1,6 (95% ДИ 1,51-89,3)	0,56	0,90	0,45	0,62	0,52-0,71	p=0,06
C _{17:0}	≤2,53	0% (0/30)	40% (39/98)	χ ² =33,6, p<0,001	V=0,51	2,51 (95% ДИ 1,91-13,1)	0,6	1,0	0,54	0,87	0,74-0,88	p=0,01
C _{17:1}	≤2,12	20% (6/30)	89,8% (88/98)	χ ² =57,4, p<0,001	V=0,67	0,03 (95% ДИ 0,01-0,09)	0,9	0,8	0,88	0,9	0,86-0,96	p<0,001
C _{19:0}	≥1,17	0% (0/30)	45,9% (45/98)	χ ² =21,2, p<0,001	V=0,41	1,85 (95% ДИ 1,54-2,22)	0,46	1,0	0,6	0,73	0,64-0,82	p<0,001

Из мононенасыщенных аналогов с нечетным числом атомов углерода диагностической значимостью обладала величина C_{17:1}, менее или равная 2,12 %/клетка (Se=0,9; Sp=1,0; Ac=0,88; AUC=0,91).

Выполнив ROC-анализ (рис. 1) среди полученных диагностических критериев (C_{17:0}, C_{19:0}, C_{17:1}), установлено, что наилучшим маркером, позволяющим диагностировать онкологическую патологию шейки матки, являлась пороговая локальная величина C_{17:1}, менее или равная 2,12 %/клетка, что было характерно для 89,8 % патологических образцов.

Полученные результаты являются обоснованными, учитывая ранее полученные данные о повышении вклада ВЖК с нечетным числом атомов углерода, в т.ч. и мононенасыщенных кислот, в биоптатах предрака шейки матки. Кроме того, известно, что для гиперпролиферативных и опухолевых тканей характерно повышение их содержания [1, 2].

Заключение

В здоровых тканях организма жирнокислотный состав липидов мембран клеток представлен аналогами с четным числом атомов углерода. Наличие ВЖК с нечетным числом атомов углерода характерно для высокопролиферативных тканей (очаги обострения псориаза, рубцовая ткань), а также в локусах неоплазий (рак легкого, рак шейки матки) [3, 4–6].

Наилучшим биохимическим диагностическим маркером, позволяющим выявить онкологическую патологию шейки матки, является пороговая локальная величина C_{17:1}, менее или равная 2,12 %/клетка (Se=0,9; Sp=1,0; Ac=0,88; AUC=0,91).

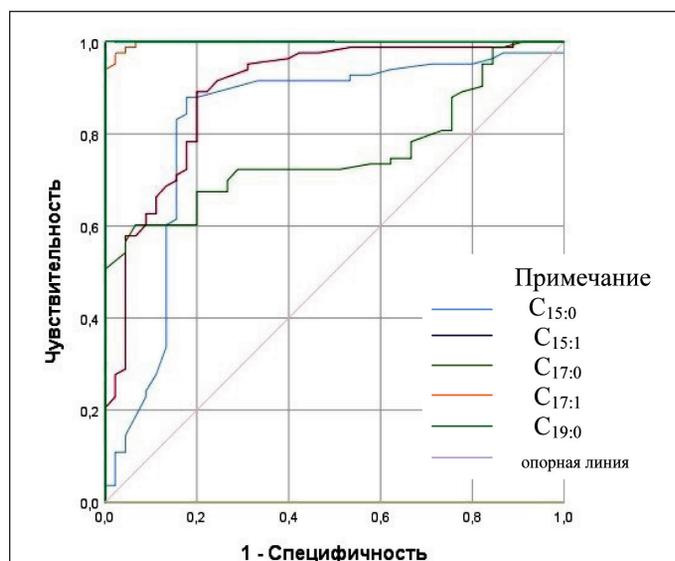


Рис. 1. ROC-анализ диагностических маркеров среди ВЖК с нечетным числом атомов углерода

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6143.2018.7 (соглашение №075-02-2018-547).

ЛИТЕРАТУРА

1. Koundouros N., Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. Br J Cancer. 2020; 122 (1) :4-22. doi: 10.1038/s41416-019-0650-z.
2. Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., Терешков П.П., Шолохов Л.Ф. Статус высших жирных кислот клеток экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации. Фундаментальная и клиническая медицина. 2018; 3 (3): С. 35-44. - DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-3-35-44.
3. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. 2011. Available from: <http://www.icmje.org>.
4. Хышиктуев Б.С. Липиды биологических объектов: их роль в патогенезе и диагностике заболеваний системы органов дыхания: специальность 14.00.16 «Патологическая физиология»: дис. ... д-ра медицинских наук. Иркутск, 1995. 222 с.
5. Караваяева Т.М., Фалько Е.В., Медведев К.К. Взаимоотношения между уровнем высших жирных кислот в крови и эпидермисе при псориазе // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию Читинской государственной медицинской академии, г. Чита, 1-2 октября 2008 г. Чита : ИИЦ ЧГМА, 2008. С. 181–182.
6. Асанова Ю.Р. Закономерности изменения тканевого фосфолипидного и жирнокислотного статуса при раке легкого: специальность 14.00.16 «Патологическая физиология»: дис. ... канд. мед. наук. Чита, 2000. 148 с.

ВОЗМОЖНОСТЬ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВЫСОКОГО РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ

А.А. Кельн^{1,2}

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России; г. Тюмень, Россия¹
Государственное автономное учреждение здравоохранения Тюменской области Многопрофильный клинический медицинский центр «Медицинский город»; г. Тюмень, Россия²

Аннотация

Введение. Местнораспространенный РПЖ выявляется более чем в 30 % случаев. Группа высокого риска отличается достоверно меньшими показателями безрецидивной, опухольспецифической и общей по сравнению с группами низкого и промежуточного рисков. Хирургическое лечение данной категории пациентов до недавнего времени применялось редко. РПЭ и сейчас остается спорным методом в лечении больных РПЖ когорты высокого риска прогрессирования. **Материал и методы.** Ретроспективный анализ результатов лечения 213 пациентов группы высокого риска прогрессирования. Критерии отбора пациентов по стратификации EAU 2021: T_{3a}, Глисон 8–10, ПСА >20 нг/мл. Всем пациентам выполнена радикальная простатэктомия. **Результаты.** Критерий pT₂ у 41 (19,3 %) пациента, pT_{3a} – у 130 (61,0 %), pT_{3b} – у 42 (19,7 %). Послеоперационный индекс Глисона 6 (3+3) у 27 (12,7 %) пациентов, 7 (3+4) – у 103 (48,4 %), 7(4+3) – у 46 (21,6%), у 8 (4+4 или 3+5, или 5+3) – у 32 (15,0%), 9

или 10 – у 5 (2,3 %). Критерий pN_0 диагностирован у 184 (86,4%) пациентов, pN_1 - 29 (13,6%) пациентов. Лучевая терапия проведена 103 (48,6 %) пациентам в СОД 73 (70–76) Гр, гормональная депривация алГРГ – 29 (13,6 %). Общая выживаемость составила 98,4 %, раково-специфическая – 100 %, безрецидивная выживаемость – 71,3 %, медиана времени до развития ПСА-рецидива – $21,5 \pm 6,4$ (6–37) мес. Проведенный монофакторный анализ показал независимые предикторы развития ПСА-рецидива: критерий pT_{3a} и pN_1 . **Выводы.** Хирургическое лечение в объеме радикальной простатэктомии у пациентов с высоким риском прогрессирования в составе комбинированного и комплексного лечения позволяет улучшить прогноз.

Ключевые слова: рак предстательной железы, радикальная простатэктомия, лучевая терапия, гормональная терапия, безрецидивная выживаемость, опухольспецифическая выживаемость, общая выживаемость.

THE POSSIBILITY OF SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH PROSTATE CANCER AT HIGH RISK OF PROGRESSION

A.A.Keln

Tyumen State Medical University of the Russia Ministry of Health, Tyumen, Russia¹
MCMC "Medical City"; Tyumen, Russia²

Annotation

Background. Locally advanced prostate cancer is detected in more than 30% of cases. The high-risk group has significantly lower rates of relapse-free, tumor-specific and general compared to the low- and intermediate-risk groups. Surgical treatment of this category of patients was rarely used until recently. RPE still remains a controversial method in the treatment of patients with prostate cancer of a cohort at high risk of progression. **Material and Methods.** Retrospective analysis of the results of treatment of 213 patients at high risk of progression. Criteria for the selection of patients according to the EAU 2021 stratification: T3a, Gleason 8-10, PSA >20 ng/ml. All patients underwent radical prostatectomy. **Results.** pT_2 in 41 (19.3%) patients, pT_{3a} 130 (61.0%), pT_{3b} 42 (19.7%). Postoperative GS 6 (3+3) 27 (12,7%), 7 (3+4) – 103 (48,4%), 7(4+3) – 46 (21,6%), 8 (4+4 or 3+5 or 5+3) – 32 (15,0%), 9 or 10 - 5 (2.3%). pN_0 was diagnosed 184 (86.4%), pN_1 - 29 (13.6%). Radiation therapy was performed 103 (48.6%) SOD 73 (70-76) Gr, hormonal deprivation 29 (13.6%). The overall survival rate is 98.4%, cancer-specific 100%, relapse-free survival is 71.3%, the median time before the development of a biochemical relapse is 21.5 ± 6.4 (6-37) months. Monofactor analysis showed independent predictors of the development of biochemical relapse: the criterion of pT_{3b} and pN_1 . **Conclusion.** Surgical treatment in the scope of radical prostatectomy in patients with a high risk of progression as part of combined and complex treatment can improve the prognosis.

Key words: prostate cancer, radical prostatectomy, radiation therapy, hormone therapy, relapse-free survival, tumor-specific survival, overall survival.

Введение. Радикальная простатэктомия является одним из основных методов лечения рака предстательной железы (РПЖ) в течение последних 150 лет. Местнораспространенный РПЖ выявляется более чем в 30 % случаев [1–3]. Группа высокого риска отличается достоверно меньшими показателями безрецидивной (БРВ), опухольспецифической (ОСВ) и общей (ОВ) по сравнению с группами низкого и промежуточного рисков. Хирургическое лечение данной категории пациентов до недавнего времени применялось редко. РПЭ и сейчас остается спорным методом в лечении больных РПЖ когорты высокого риска прогрессирования [4]. Основной проблемой лечения больных РПЖ высокого риска, а также пациентов с наличием лимфогенных метастазов остается высокая вероятность дальнейшего прогрессирования заболевания после применения методов радикального лечения [5]. Некоторые исследования продемонстрировали крайнюю неоднородность групп больных высокого риска прогрессирования [6–8], что свидетельствует о необходимости систематизации и обобщения информации.

Цель исследования – оценить ближайшие и отдаленные результаты лечения пациентов с РПЖ в группе высокого риска прогрессирования после робот-ассистированной радикальной простатэктомии (РАРПЭ).

Материал и методы

Проведен ретроспективный анализ результатов лечения пациентов, находящихся на диспансерном наблюдении в ГАУЗ ТО «МКМК «Медицинский город»», с диагнозом РПЖ с 2014 по 2020 г. В исследовании анализировалась первичная документация

213 пациентов группы высокого риска прогрессирования. Критерии отбора пациентов определены по предложенной стратификации рекомендации ЕАУ за 2021: Т_{3а}, Глисон 8–10, ПСА >20 нг/мл. Всем пациентам выполнена радикальная простатэктомия, без сохранения сосудисто-нервных структур с расширенной тазовой лимфаденэктомией. Медиана времени наблюдения составила 36±10,3 мес. Средний возраст пациентов – 59±4,8 (42–76) года, уровень ПСА – 32,6±7,9 (8,7–56,5) нг/мл. Индекс Глисона по результатам дооперационного морфологического заключения 6 (3+3) зарегистрирован у 33 (15,6%) пациентов, 7 (3+4) – у 84 (39,4%), 7 (4+3) – у 45 (21,1%), 8 (4+4 или 3+5, или 5+3) – у 45 (21,1%), 9 или 10 – у 6 (2,8%).

Результаты

Среднее время операции составило 190±21,5 (120–260) мин, средний объем кровопотери – 375±86,9 (50–700) мл. Критерий рТ₂ диагностирован у 41 (19,3%) пациента, рТ_{3а} – у 130 (61,0%), рТ_{3б} – у 42 (19,7%). Послеоперационный индекс Глисона 6 (3+3) у 27 (12,7%) пациентов, 7 (3+4) – у 103 (48,4%), 7(4+3) – 46 (21,6%), 8 (4+4 или 3+5, или 5+3) – у 32 (15,0%), 9 или 10 – у 5 (2,3%). Критерий рN₀ диагностирован у 184 (86,4%) пациентов, рN₁ – у 29 (13,6%) пациентов. Лучевая терапия проведена 103 (48,6%) пациентам в СОД 73 (70–76) Гр, гормональная депривация аЛГРГ – 29 (13,6%). Общая выживаемость составила 98,4%, раково-специфическая – 100%, безрецидивная выживаемость – 71,3%, медиана времени до развития ПСА-рецидива – 21,5±6,4 (6–37) мес. Проведенный монофакторный анализ показал независимые предикторы развития ПСА-рецидива: критерий рТ_{3в} и рN₁.

Выводы

Применение хирургического лечения в объеме радикальной простатэктомии у пациентов с высоким риском прогрессирования в составе комбинированного и комплексного лечения позволяет улучшить прогноз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. // Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М., 2021. С. 21
2. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований в Тюменской области в 2008–2018 гг. / под редакцией Фёдорова Н.М., Зотова П.Б. Тюмень, 2021. С. 122-127
3. Простатит и заболевания-имитаторы. Клинические разборы / ред. Коган М.И., Ибишев Х.С., Белоусов И.И., Набока Ю.Л. М., 2019. С. 24-27
4. Зырянов А.В., Суриков А.С., Кельн А.А., Пономарев А.В., Собенин В.Г. Значение оперативного доступа при проведении простатэктомии у пациентов с аномальной анатомией предстательной железы // Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(6). С. 32–40.
5. Sundi D., Wang V.M., Pierorazio P.M. et al. Very high risk localized prostate cancer: definition and outcomes. Prostate Cancer Prostatic Dis 2014; 17. С. 57–63
6. Cooperberg M.R. et al. Combined value of validated clinical and genomic risk stratification tools for predicting prostate cancer mortality in a high-risk prostatectomy cohort // European urology. 2015. Т. 67, №. 2. С. 326-333
7. Gabriele D., Jerezek-Fossa B.A., Krengli M., et al. Beyond D'Amico risk classes for predicting recurrence after external beam radiotherapy for prostate cancer: the Candiolo classifier. Radiat Oncol. 2016 Feb 24;11:23.
8. Zumsteg Z.S., Zelefsky M.J., Woo K.M., et al. Unification of favourable intermediate, unfavourable intermediate, and very high risk stratification criteria for prostate cancer. BJU Int. 2017 Nov;120(5B):E87-E95.

ЗНАЧЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РИСКА БИОХИМИЧЕСКОГО РЕЦИДИВА У БОЛЬНЫХ ЛОКАЛИЗОВАННЫМ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПЕРЕНЁСШИХ РАДИКАЛЬНУЮ ПРОСТАТЭКТОМИЮ

А.Ю. Кнеев, М.И. Школьник, О.А. Богомолов, Г.М. Жаринов

ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Актуальность. Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний в России среди мужчин старше 60 лет. Большинство злокачественных новообразований предстательной железы на момент выявления носит локализованный характер. Радикальная простатэктомия (РПЭ) является одним из наиболее эффективных инструментов опухолевого контроля среди мужчин, ожидаемая продолжительность жизни которых превышает 10 лет. Примерно 35% из них рискуют столкнуться с рецидивом РПЖ в течение 10 лет после РПЭ. **Целью исследования**

являлась оценка значимости плотности простат-специфического антигена (пПСА) в качестве предиктора безрецидивной выживаемости у больных локализованным РПЖ, перенесших РПЭ в качестве основного этапа лечения. **Материал и методы.** Ретроспективно изучены и проанализированы результаты лечения 147 пациентов с локализованным РПЖ, перенесших РПЭ в ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» Минздрава РФ в период с февраля 2001 по август 2015 г. **Результаты.** Рецидив опухоли зафиксирован у 53 (36,05%) пациентов. По результатам однофакторного анализа пПСА, индекс Глисона, послеоперационная стадия Т, выход опухоли за пределы капсулы распространение опухоли на семенные пузырьки и изменение стадии продемонстрировали корреляцию ($p < 0,05$) с возникновением рецидива опухоли. При помощи ROC-анализа ($AUC=0,635$, $p=0,005$) определено пороговое значение признака пПСА ($>0,309$ нг/мл/см³), превышение которого сопровождалось статистически значимым увеличением риска возникновения рецидива. По результатам многофакторного анализа установлено, что пПСА, послеоперационный индекс Глисона и распространение опухоли на семенные пузырьки оказывали независимое влияние на риск возникновения рецидива.

Ключевые слова: рак предстательной железы, радикальная простатэктомия, плотность простатспецифического антигена, безрецидивная выживаемость.

THE VALUE OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN DENSITY IN PREDICTING THE RISK OF BIOCHEMICAL RECURRENCE IN PATIENTS WITH LOCALIZED PROSTATE CANCER WHO HAVE UNDERGONE RADICAL PROSTATECTOMY

A. Kneev, M. Shkol'nik, O. Bogomolov, G. Zharinov.

«Russian scientific center of radiology and surgical technologies named after A.M. Granov», Saint-Petersburg, Russia.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is amongst one of the most prevalent malignant tumors in men over 60 years old in Russia. At the moment of diagnosis, the majority of PCa present as localized forms of the disease. Radical prostatectomy (RP) is one of the most effective tools of tumor control in men whose life expectancy exceeds 10 years. Approximately 35% of them are at risk of PCa relapse within 10 years following RP. **Study objectives.** To assess the significance of prostate-specific antigen density (PSAD) as a predictor of recurrence-free survival in patients with localized PCa who underwent RP as the main treatment modality. **Material and methods.** We retrospectively studied and analyzed outcomes of 147 patients who have undergone RP between February 2001 and August 2015 in Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies named after A.M. Granov. **Results.** Biochemical recurrence (BR) was observed in 53 (36.05%) patients. On the basis of univariate analysis PSAD, Gleason score, pathologic T stage, extracapsular extension, seminal vesicle invasion and tumor upstaging were found to statistically significantly ($p < 0,05$) correlate with the risk of BR. According to the results of ROC-analysis ($AUC=0.635$, $p=0.005$) we have determined PSAD threshold ($>0,309$ ng/mL/cc) which, if exceeded was associated with an increased probability of BR. The results of multivariate analysis revealed that PSAD, postoperative Gleason score, and seminal vesicle invasion were independently associated with the risk of recurrence.

Key words: prostate cancer, radical prostatectomy, prostate-specific antigen density, recurrence-free survival.

Актуальность. На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) занимает второе место в структуре заболеваемости мужского населения злокачественными новообразованиями в России, а среди мужчин старше 60 лет – первое [1]. Большинство злокачественных новообразований предстательной железы на момент выявления носят локализованный характер [2]. Радикальная простатэктомия (РПЭ) и комбинированная гормонотерапевтическая – стандарты радикального лечения больных локализованным РПЖ [3]. Среди мужчин, ожидаемая продолжительность жизни которых превышает 10 лет, наиболее эффективным методом лечения локализованного РПЖ является РПЭ [3]. Безрецидивная выживаемость (БРВ) используется в качестве основной конечной точки оценки результатов лечения, а наступление биохимического рецидива (БР), как правило, служит основанием для начала следующего этапа лечения. Текущие алгоритмы прогнозирования риска возникновения БР после РПЭ в основном опираются на значения исходной концентрации ПСА, индекса

Глисона и распространённость первичной опухоли [3]. Несмотря на широкое применение указанных инструментов прогнозирования, примерно 35 % мужчин рискуют столкнуться с наступлением БР в течение 10 лет после РПЭ [4]. Плотность ПСА играет важную роль в области определения показаний к выполнению биопсии предстательной железы [5], однако значение данного фактора в качестве предиктора наступления БР после РПЭ, до сих пор четко не определено.

Цель исследования – оценка значимости плотности ПСА в качестве предиктора БРВ среди больных локализованным РПЖ, перенесших РПЭ в качестве основного этапа лечения.

Материал и методы

Ретроспективно изучены и проанализированы результаты лечения 147 пациентов с локализованным РПЖ, перенесших РПЭ в ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» Минздрава РФ в период с февраля 2001 по август 2015 г. Плотность ПСА выражалась отношением исходной концентрации сывороточного ПСА (нг/мл) к объему предстательной железы (см³), установленным предоперационно. Диагноз устанавливался на основании данных пальцевого ректального исследования, трансректального ультразвукового исследования предстательной железы или магнитно-резонансной томографии органов малого таза с внутривенным контрастированием, а также гистологической оценки биоптатов предстательной железы. Хирургические вмешательства выполнялись командой из двух опытных хирургов по методике, предусматривавшей удаление единым блоком семенных пузырьков и предстательной железы, а также двухстороннюю тазовую лимфаденэктомию. БР устанавливался в случае превышения уровня сывороточного ПСА > 0,2 нг/мл на основании двух последовательных измерений с интервалом в 2 нед. Статистический анализ проводился на основании методологических требований Международного конгресса по гармонизации GGP «Статистические принципы для клинических исследований»

Результаты

За время наблюдения рецидив опухоли зафиксирован у 53 (36,05%) пациентов. По результатам однофакторного анализа плотность ПСА ($p=0,006$), индекс Глисона ($p=0,0006$), послеоперационная стадия Т ($p=0,0002$), распространение опухоли за пределы капсулы ($p=0,019$) и на семенные пузырьки ($p=0,001$), а также изменение стадии ($p=0,0007$) оказывали статистически достоверное влияние на риск возникновения рецидива РПЖ после РПЭ. При помощи ROC-анализа ($AUC=0,635$, $p=0,005$) нами установлено пороговое значение признака пПСА, превышение которого было связано с высоким риском наступления БР. Согласно полученным данным, оптимальное значение признака, при котором исследуемый показатель соответствовал 0,309 нг/мл/см³ находилось на уровне чувствительности и специфичности в 54,72 и 71,28 % соответственно. В дальнейшем мы использовали данное значение признака для разделения пациентов на группы с «высокой» и «низкой» пПСА. При помощи метода множительных оценок Каплана–Мейера проведено сравнение показателей БРВ в группах с «низкой» и «высокой» пПСА (рис. 1). Пятилетняя БРВ в группе с «высокой» и «низкой» пПСА составили 52,2±6,8% и 76,7±4,6 % соответственно. Относительный риск возникновения БР у больных с «низкой» плотностью ПСА был в 2,4 раза меньше, чем у больных из группы с «высокой» пПСА. Результаты носили статистически значимый характер ($p \log\text{-rank} = 0,0024$).

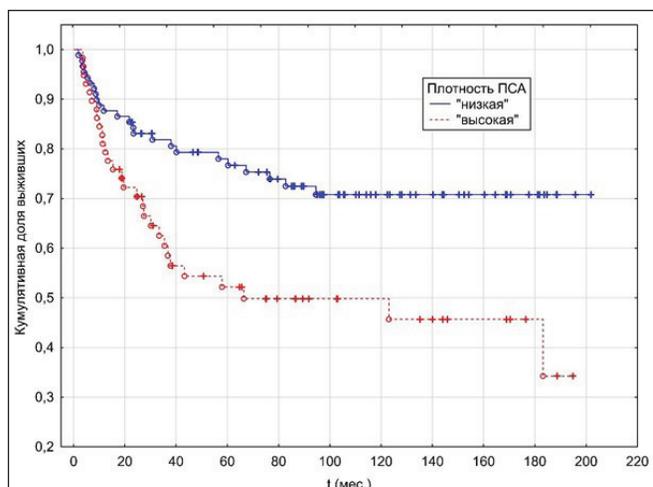


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость в зависимости от показателя плотности ПСА ($p \log\text{-rank} = 0,0024$)

На следующем этапе мы провели анализ БРВ при помощи модели пропорциональных рисков Кокса. В качестве переменных прогноза учитывались только данные, оказывавшие статистически значимое влияние на показатели БРВ. По результатам многофакторного анализа было установлено, что только высокая плотность ПСА, послеоперационный индекс Глисона и вовлечение семенных пузырьков в опухолевый процесс оказывали независимое влияние на риск возникновения БР после РПЭ. Риск возникновения БР у больных с «высокой» плотностью ПСА был в 1,8 раза выше, чем у больных с «низкой» пПСА. Результаты носили статистически значимый характер ($p=0,034$).

Выводы

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали, что пПСА является надежным предиктором показателей БРВ среди больных локализованным РПЖ, перенесших РПЭ. С учетом того, что наступление БР оказывает значимое негативное влияние на прогноз и качество жизни, оценка статуса больного с повышенным риском подобного исхода приобретает важное клиническое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М., 2019. 250 с.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с.
3. Носов Д.А., Волкова О.А., Гладков М.И., Карабина Е.В., Крылов В. ., Матвеев В.Б., Митин Т., Попов А.М. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака предстательной железы. *Злокачественные опухоли* 10, no. 3s2-1 (2021): 556-572.
4. Mottrie Alexander, Geert De Naeyer, Giacomo Novara, and Vincenzo Ficarra. Robotic radical prostatectomy: a critical analysis of the impact on cancer control. *Current Opinion in Urology* 21, no. 3 (2011): 179-184.
5. Benson Mitchell C., Ihn Seong Whang, Allan Pantuck, Kenneth Ring, Steven A. Kaplan, Carl A. Olsson, and William H. Cooner. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *The Journal of urology* 147, no. 3 (1992): 815-816.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТОВ АКТ/МТОР СИГНАЛЬНОГО ПУТИ И БЕЛКА LC3В ПРИ ПАПИЛЛЯРНОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.В. Ковалева^{1,2}, Л.В. Спирина^{1,2}, С.Ю. Чижевская¹

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

Папиллярная карцинома щитовидной железы (ПРЩЖ) – наиболее распространенный подтип рака щитовидной железы, представляющий собой актуальную медицинскую проблему. Тщательный мониторинг прогрессирования ПРЩЖ с помощью новых, чувствительных биологических маркеров поможет снизить число пациентов с ПРЩЖ, а также число рецидивов заболевания после хирургического лечения. В связи с этим необходимы новые предиктивные молекулярные и биологические маркеры, способные предсказать течение заболевания. Несмотря на глубокие исследования и прогресс в изучении рака щитовидной железы (РЩЖ), молекулярный механизм заболевания по-прежнему плохо изучен. В исследовании установлены молекулярные особенности папиллярного рака щитовидной железы, показана активация АКТ/мTOR сигнального пути, а также процессов аутофагии при прогрессировании. Для опухолей с признаками капсульной инвазии характерно увеличение количества мРНК 4E-ВР1, что подтверждает значимость влияния компонентов сигнального каскада АКТ/мTOR на особенности течения и прогрессирование заболевания. Выявлено увеличение содержания и экспрессии белка LC3В в ткани папиллярного рака щитовидной железы при увеличении размеров первичной опухоли, а также инвазии в капсулу щитовидной железы.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, сигнальный путь АКТ/мTOR, белок LC3В, клиничко-морфологические параметры опухоли.

EXPRESSION OF AKT/MTOR SIGNALING PATHWAY COMPONENTS AND LC3B PROTEIN IN PAPILLARY THYROID CANCER

I.V. Kovaleva^{1,2}, L.V. Spirina^{1,2}, S. Yu. Chizhevskaya¹

Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Annotation

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common subtype of thyroid cancer. Careful monitoring of PTC progression with new and sensitive biological markers may help to reduce the number of PTC patients not diagnosed before the aggressive form development, as well as the number of relapses after surgical treatment. In this regard, new predictive molecular and biological markers are needed in order to predict the progression of the disease. Despite recent researches and progress in this field of science, the molecular mechanism of the disease still requires careful study. This investigation revealed molecular features of papillary thyroid cancer, activation of the AKT/mTOR signaling pathway, as well as autophagy processes during progression. Tumors with capsular invasion are characterized by an increase in the amount of 4E-BP1 mRNA, which significantly reveals the components of the AKT/mTOR signaling cascade on the course and progression. Autophagy is a significant process of tumors development and progression in different types of cancer, including papillary thyroid cancer. The aim of the study was to investigate the LC3B, AKT/mTOR components expression and content in the tissues of patients with thyroid gland tumor pathology.

Key words. Papillary thyroid cancer, AKT/mTOR signaling pathway, LC3B protein, clinical and morphological parameters.

Введение. На рак щитовидной железы приходится более 90 % злокачественных новообразований эндокринной системы, и частота его растёт ежегодно [1]. Молекулярный патогенез папиллярного рака щитовидной железы включает в себя генетические нарушения, такие как протоонкогенные активирующие мутации RAS и BRAF, а также нарушения регуляции сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K)/АКТ [2]. Генетические нарушения, ведущие к изменениям в сигнальном пути PI3K/АКТ, включают мутации RAS, мутации и делеции фосфатазы PTEN – негативного регулятора пути АКТ/mTOR, мутации и амплификации PI3K и мутации АКТ1 [3]. Данные молекулярные факторы ответственны за активацию ангиогенеза, развитие иммунного воспаления и угнетение апоптоза в опухолевых клетках, что оказывает влияние на развитие и прогрессирование ПРЦЖ. Процессы аутофагии, одним из главных маркёров которых является белок LC3B, вносят большой вклад в развитие, прогрессирование опухолей различного происхождения, в том числе и при ПРЦЖ.

Цель исследования – изучить особенности экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути, экспрессию и содержание белка LC3B у пациентов с ПРЦЖ в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли.

Материал и методы

В исследование было включено 65 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы со стадированием T1–4N0–1M0, группа сравнения представлена 39 пациентами с доброкачественной патологией щитовидной железы. Пациенты со злокачественными новообразованиями щитовидной железы были распределены на группы в зависимости от размера первичной опухоли: стадия T1–2N0M0 выявлена у 32 больных, а T3–4N0–1M0 – у 33. Группы в зависимости от наличия регионарных метастазов: 16 пациентов имели регионарные метастазы, а 49 больных их не имели. Были сформированы группы в зависимости от наличия прорастания капсулы: у 28 больных отмечено прорастание, 37 пациентов не имели признаков инвазии опухоли. Протокол и процедуры исследования одобрены этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Материалом исследования являлись образцы ткани злокачественной и доброкачественной опухолей, полученные при проведении оперативного лечения, взятые на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей. Образцы после забора замораживались и хранились при температуре - 80С. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратной-транскрипционной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR).

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Проверку нормальности проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как Me (Q1; Q3). Значимость различий независимых параметров оценивали по критерию Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При исследовании особенностей экспрессии изучаемых параметров в зависимости от размера первичной опухоли отмечены статистически значимые изменения экспрессии показателей АКТ, 4E-BP1, GSK-3BETA. Полученные результаты представлены в таблице и свидетельствуют о максимальных уровнях экспрессии показателей при размере первичной опухоли, соответствующие T₂. Профиль экспрессии белка аутофагии LC3B показывает более высокие значения на стадиях T3–4, что в 1,6 раза больше, чем на стадиях T1–2 ($p < 0,01$). Увеличение содержания белка LC3B было согласовано с увеличением мРНК LC3B.

Таблица

Экспрессия компонентов сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR в зависимости от размера первичной опухоли

Показатель, усл. ед.	Стадирование по размеру первичной опухоли			
	T1 N = 46	T2 N = 12	T3 N = 44	T4 N = 12
Компоненты АКТ/mTOR сигнального пути				
4E-BP1	1,78 (0,19; 17,36)	3,51 (0,93; 8,00) *	0,29 (0,01; 1,56) **	0,17 (0,04; 0,25) ***
АКТ	0,50 (0,01; 4,00)	8,34 (7,46; 45,40) *	2,38 (0,21; 14,67) **	0,75 (0,35; 1,43) ***
GSK-3BETA	1,07 (0,55; 12,10)	1,31 (0,61; 7,46)	0,13 (0,01; 0,80)	0,54 (0,50; 0,80) ***

Примечание: в расчетах использовали Ct целевого гена (метод ΔΔCt); * различия достоверны по сравнению с тканями на стадии T1, $p < 0,05$; ** различия достоверны по сравнению с тканями стадии T2, $p < 0,05$; *** различия достоверны по сравнению с тканями стадии T3, $p < 0,05$.

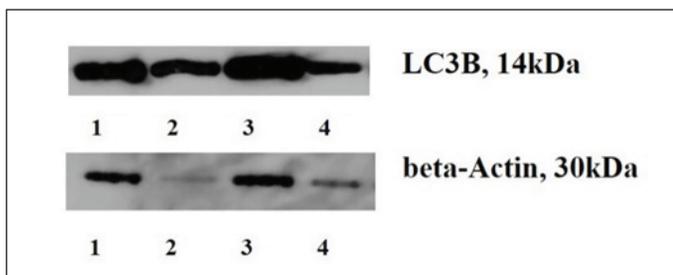


Рис. 1. Содержание белка LC3B в тканях папиллярного рака щитовидной железы. Примечание: 1, 3 – опухолевая ткань; 2, 4 – неизменная ткань

При изучении влияния инвазии на молекулярный портрет опухоли отмечено, что в тканях опухоли с капсулярной инвазией активирована экспрессия компонентов сигнального пути АКТ/mTOR, таких как 4E-BP1 и GSK-3BETA. Количество мРНК 4E-BP1 в 7,4 раза, а GSK-3BETA в 1,7 раза выше в тканях с прорастающей опухолью по сравнению с опухолью без экстратиреоидного распространения ($p < 0,01$). Экспрессия маркера аутофагии LC3B увеличивается в 24 раза в ткани инвазивной опухоли по сравнению с тканью опухоли без признаков экстратиреоидного распространения.

Заключение

В ходе проведённого исследования установлено, что активация компонентов сигнального пути АКТ/mTOR выявлена на стадии T2, где размер первичной опухоли соответствует максимальному размеру 4 см без признаков экстратиреоидного распространения. Гиперактивация сигнального пути АКТ/m-TOR – характерная черта большинства раковых клеток, она играет ключевую роль в механизмах трансформации и прогрессии опухолевых клеток. Увеличение экспрессии АКТ, 4E-BP1, GSK-3BETA связано с преобладанием анаболических процессов в папиллярных опухолях рака щитовидной железы на стадии T2. Такая тенденция изменений свидетельствует о том, что опухолевая клетка использует гиперактивацию этих показателей для подготовки к дальнейшему прогрессированию и переходу опухоли в стадию T3, для которой характерно экстратиреоидное распространение. Экспрессия и содержание белка LC3B демонстрируют высокие значения в тканях диссеминированной опухоли. По всей видимости,

процессы аутофагии имеют важное значение для распространения и метастазирования опухоли. Аутофагия – естественный механизм клетки, позволяющий ей избавляться от ненужных или аномальных белков, органелл. Ключевыми индукторами процессов аутофагии в клетках являются такие явления, как дефицит питательных веществ, повреждение внутриклеточных органелл и частичная денатурация белков. Содержание белка-маркера аутофагии LC3B и его экспрессия значительно выше в опухолях с капсулярной инвазией, а также в опухолях с метастазами в лимфатические узлы. Выявленный факт свидетельствует о значимости процессов аутофагии в прогрессировании папиллярного рака щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Araque K.A., Gubbi S., Klubo-Gwiedzinska J. Updates on the Management of Thyroid Cancer // Horm. Metab. Res. 2020. V. 52, №8. P. 562-577.
2. Lewiński A., Adamczewski Z. Papillary thyroid carcinoma: a cancer with an extremely diverse genetic background and prognosis // Pol Arch Intern. Med. 2017. Vol. 127, №6, 3.388-389.
3. Spirina L.V., Chizhevskaya S.Y., Kondakova I.V. Molecular Profiling of Follicular Variant of Papillary Thyroid Cancer// Bull Exp Biol Med. 2020. V.169, №1, P. 85-88.
4. Xu Q., Gao S., Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis// Gland Surg 2021. Vol. 10, №8, P. 2511-2527.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА РАКА ПОЛОСТИ РТА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ

Е.С. Колегова¹, Л.А. Кононова², И.К. Федорова¹, И.Ж. Жалсанова³,
А.А. Сивцев³, Н.А. Скрябин³, Е.В. Денисов¹

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ Российской академии наук, г. Томск, Россия³

Аннотация

Проблема омоложения злокачественных опухолей различных локализаций чрезвычайно актуальна, не исключение и плоскоклеточная карцинома полости рта (ПКПР). За последние десятилетия роль микробиома в поддержании здоровья человека и развитии различных заболеваний стала очевидной. **Целью** исследования было изучение профиля микробиомного сообщества ПКПР у пациентов молодого возраста (≤45 лет) в сравнении с больными старше 45 лет. **Материал и методы.** Материалом для исследования явилась опухолевая ткань больных ПКПР (n=10). Анализ микробиома проводился с помощью секвенирования 16S рРНК. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программы Statistica 10. **Результаты.** Выявлено, что в опухолевой ткани молодых пациентов с ПКПР статистически выше содержание бактерий рода *Bibersteinia*, *Haemophilus*, *Erysipelothrix*, *Rubrivivax* и вида *Haemophilus parainfluenzae*. В группе возрастных пациентов значимо выше содержание бактерий рода *Fusobacterium* и вида *Ruminococcus gnavus*. *Bibersteinia trehalosi* наблюдалась только в ткани ПКПР у пациентов моложе 45 лет. **Выводы.** ПКПР у пациентов молодого возраста характеризуется специфическим профилем микробиомного сообщества. Полученные данные могут стать основой для разработки новых методов мониторинга возникновения и прогрессирования ПКПР у молодых пациентов.

Ключевые слова. Плоскоклеточная карцинома полости рта; молодой возраст; микробиом; 16S секвенирование

THE FEATURES OF ORAL CANCER MICROBIOME IN YOUNG ADULTS

E.S. Kolegova¹, L.A. Kononova², I.K. Fedorova¹, I.Zh. Zhalsanova³,
A.A. Sivtsev³, N.A. Skryabin³, E.V. Denisov¹

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia¹

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia,

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia³

Annotation

The problem of malignant tumors rejuvenation of various localizations is extremely relevant, and oral squamous cell carcinomas (OSCC) are no exception. The last decades have shown that the role of the microbiome in human health and the development of various diseases is undoubted. The aim of the study was to estimate microbiome community profile of OSCC in young adults (≤ 45 years) in comparison with patients older than 45 years. **Material and methods:** The material for the study was the tumor tissue of patients with OSCC (N=10). Microbiome analysis was performed using 16S rRNA sequencing. Statistical analysis was carried out using the Statistica 10 software package. **Results:** At the genus level, *Bibersteinia*, *Haemophilus*, *Erysipelothrix*, *Rubrivivax* and at the species level, *Haemophilus parainfluenzae* were significantly enriched in tumor tissue of young adults with OSCC. *Fusobacterium* at the genus level and *Ruminococcus gnavus* at the species level were significantly increased in the tumor tissue of aged patients. *Bibersteinia trehalosi* has only been found in OSCC tissue of patients under 45 years of age. **Conclusions:** OSCC in young adults is characterized by a specific profile of microbiome community. The obtaining results may serve as a basis for the development of new approaches for the early detection and progression of OSCC in young adults.

Key words. Oral squamous cell carcinoma; young adults; microbiome; 16S sequencing

Актуальность. Заболеваемость плоскоклеточной карциномой полости рта (ПКПР) среди пациентов моложе 45 лет растет с каждым годом [1,2]. При этом для молодых пациентов с ПКПР характерно агрессивное течение заболевания, малоэффективное применение стандартных схем лечения, а также отсутствие классических этиологических факторов, характерных для больных опухолями головы и шеи старшего возраста: употребление табака, алкоголя и инфицирование вирусом папилломы человека [3,4]. Поэтому вопрос о причине и механизмах возникновения ПКПР у молодых остается открытым. Одной из возможных причин возникновения ПКПР может быть дисбиоз ротовой полости. Доказано, что патогенез онкологических заболеваний прямо или косвенно связан с ферментативной и биохимической активностью микрофлоры и ее влиянием на организм человека [5]. Обнаружены белки и метаболиты микробиомов, которые оказывают регуляторное действие на геном человека и изменяют протекание физиологически значимых процессов [6]. Исследования по оценке роли нарушений микробиоценоза человека в возникновении и прогрессировании ПКПР у молодых могут стать ключом в разработке новых методов диагностики, лечения и прогноза данного заболевания.

Цель исследования – изучить особенности микробиомного сообщества ПКПР у пациентов молодого возраста (≤ 45 лет) в сравнении с больными старше 45 лет.

Материал и методы

Исследование было выполнено на базе НИИ онкологии и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Сформированы две группы больных ПКПР стадии T2–3N0–2M0 в возрасте до (n=5) и старше 45 лет (n=5), не курящих и не получавших неoadъювантную химиотерапию. Материалом для исследования явилась опухолевая ткань. Из образцов опухолевой ткани была выделена ДНК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) для дальнейшей амплификации 16S рДНК с использованием пары праймеров 341F и 805R к гипервариабельной области V3-V4 и секвенированы в режиме 2x250 на платформе MiSeq (Illumina, США). Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием программы Statistica 10.

Результаты

Был проанализирован профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе и старше 45 лет. Количество бактерий рода *Bibersteinia*, *Haemophilus*, *Erysipelothrix* и *Rubrivivax* в ткани ПКПР в 3,0–5,7 раза выше у молодых пациентов по сравнению с пациентами старше 45 лет. У возрастных пациентов значимо выше – в 3,1 раза – содержание бактерий рода *Fusobacterium* по сравнению с молодыми больными (рис. 1А). На уровне вида у молодых больных с ПКПР в 4,2 раза выше количество *Haemophilus parainfluenzae*, а у возрастных больных в 4,8 раз увеличено содержание *Ruminococcus gnavus*. Вид *Bibersteinia trehalosi* встречался только у пациентов с ПКПР моложе 45 лет в 60 % случаев (рис. 1Б).

Заключение

Результаты работы демонстрируют специфический профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе 45 лет. Полученные данные могут послужить основой для разработки новых методов мониторинга возникновения и прогрессирования ПКПР у молодых пациентов.

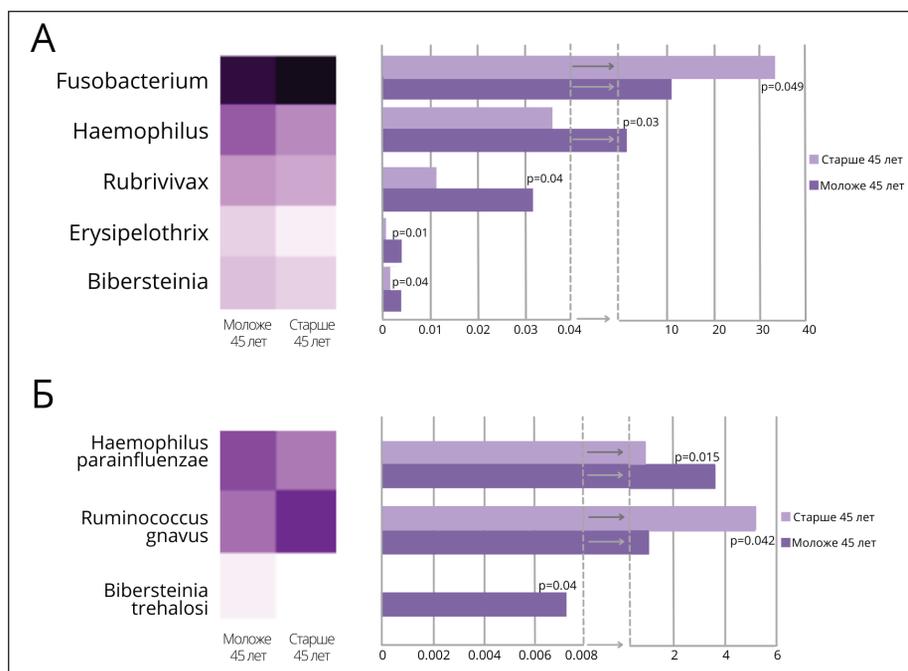


Рис. 1. Сравнительный анализ содержания бактерий на уровне рода (А) и на уровне вида (Б) у пациентов с ПКГР моложе и старше 45 лет.

Примечание. Тепловые карты показывают дифференциальное распределение таксонов у больных ПКГР моложе и старше 45 лет. В диаграммах представлено среднее относительное содержание таксонов в исследуемых группах

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ, № МК-1940.2022.3, и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

ЛИТЕРАТУРА

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2020. 252 с.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020 // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020. Vol. 70, № 1. P. 7-30.
- Ryu H.J., Kim E.K., Cho B.C., Yoon S.O. Characterization of head and neck squamous cell carcinoma arising in young patients: Particular focus on molecular alteration and tumor immunity // Head Neck. 2019. Vol. 41. P. 198-207.
- Toporcov T.N., Znaor A., Zhang Z.F., Yu G.P., Winn D.M., Wei Q., Vilensky M., Vaughan T., Thomson P., Talamini R., Szeszenia-Dabrowska N., Sturgis E.M., Smith E., Shangina O., Schwartz S.M., Schantz S., Rudnai P., Richiardi L., Ramroth H., Purdue M.P., Olshan A.F., Eluf-Neto J., Muscat J., Moyses R.A., Morgenstern H., Menezes A., McClean M., Matsuo K., Mates D., Macfarlane T.V., Lissowska J., Levi F., Lazarus P., La Vecchia C., Lagiou P., Koifman S., Kjaerheim K., Kelsey K., Holcatova I., Herrero R., Healy C., Hayes R.B., Franceschi S., Fernandez L., Fabianova E., Daudt A.W., Curioni O.A., Maso L.D., Curado M.P., Conway D.I., Chen C., Castellsague X., Canova C., Cadoni G., Brennan P., Boccia S., Antunes J.L., Ahrens W., Agudo A., Boffetta P., Hashibe M., Lee Y.C., Filho V.W. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium // Int. J. Epidemiol. 2015. Vol. 44, № 1. P. 169-185.
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: New Dimensions // Cancer Discov. 2022. Vol. 12, № 1. P. 31-46.
- Proal A.D., Lindseth I.A., Marshall T.G. Microbe-microbe and host-microbe interactions drive microbiome dysbiosis and inflammatory processes // Discov. Med. 2017. Vol. 23, № 124. P. 51-60.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТАПНОЙ РАДИОХИРУРГИИ И СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ В РЕЖИМЕ ГИПОФРАКЦИОНИРОВАНИЯ МЕТАСТАЗОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

В.В. Краснюк, П.И. Иванов, Д.А. Бутовская, К.О. Ставицкая, Р.А. Гончаров

ООО ОП ЛДЦ «МИБС», г. Новосибирск, Россия

Аннотация

Метастатические опухоли в головной мозг – собирательное понятие, объединяющее различные по происхождению, гистологической структуре, клиническому течению и результатам лечения злокаче-

ственные опухоли, первичной локализацией которых являются опухоли вне головного мозга (например, злокачественная опухоль молочной железы или желудка). Метастатическое поражение головного мозга – это IV стадия опухолевого процесса по классификации TNM – M1. Интракраниальные метастазы являются прогрессирующим течением опухолевого процесса, которые встречаются, по данным некоторых авторов, у онкологических пациентов в 20–40 % случаев. Метастатическое поражение головного мозга встречается в 10 раз чаще, чем первичные опухоли ЦНС. В России не ведется статистический анализ частоты поражения головного мозга метастазами рака, однако, анализируя статистику заболеваемости злокачественными новообразованиями и принимая во внимание усредненные данные кооперативных исследований о частоте интракраниального метастазирования, можно получить условную цифру 45,8 на 100 тыс. населения. Качество и продолжительность жизни пациентов во многом зависят от своевременности диагностики и лечения. Стандартом лечения до последнего времени являлись нейрохирургическое пособие и тотальное облучение всего объема головного мозга. Число пациентов с крупными метастазами в головном мозге, которые подлежат хирургическому вмешательству, однако, довольно ограничено из-за хирургической доступности очага, количества очагов и стадии онкологического процесса. Стереотаксическая радиохирургия (SRS) стала предпочтительным методом лечения метастазов в головном мозге [1]. Пациенты, как правило, считаются кандидатами на SRS, если объем очага менее 10 см³ (средний диаметр 3 см). Метастазы большого объема до сих пор не считались подходящими для SRS, поскольку размер опухоли коррелирует со снижением скорости реакции на облучение и повышенным риском нейротоксичности [2, 3]. Стереотаксическая лучевая терапия в режиме гипофракционирования (SRT) является альтернативным методом лечения в случае крупных очагов и улучшает соотношение локального контроля с развитием неблагоприятных лучевых реакций. Y. Higuchi et al. [4] описали удовлетворительные результаты лечения с применением этапной (стажированной) стереотаксической радиохирургии (GKS) на аппарате Gamma Knife, благодаря значительному уменьшению объема образований за счет временных интервалов между фракциями. Впоследствии авторы разработали альтернативный метод, включающий два сеанса GKS для больших метастазов в головном мозге, и настоящее исследование направлено на оценку эффективности и определения показаний к SRT и GKS.

Ключевые слова: стереотаксическая радиохирургия, стереотаксическая лучевая терапия в режиме гипофракционирования, этапная радиохирургия, гамма-нож.

TOPICAL ISSUES DURING SESSION RADIOSURGERY AND STEREOTACTIC RADIOTHERAPY IN THE MODE OF HYPOFRACTIONATION OF BRAIN METASTASES

V.V. Krasnyuk, P.I. Ivanov, D.A. Butovskaya, K.O. Stavitskaya, R.A. Goncharov

LDC "MIBS", Novosibirsk, Russia

Annotation

Brain metastases is a collective concept that unites malignant tumors that are different in origin, histological structure, clinical course and treatment results, the primary localization of which are tumors outside the brain (for example, a malignant tumor of the breast or stomach). Metastatic brain damage is the IV stage of the tumor process according to the classification of TNM - M1. Intracranial metastases are a progressive course of the tumor process, which, according to some authors, occur in cancer patients in 20–40% of cases. Metastatic brain damage is 10 times more common than primary CNS tumors. In Russia, there is no statistical analysis of the frequency of brain damage by cancer metastases, however, analyzing the statistics of the incidence of malignant neoplasms, and taking into account the average data of cooperative studies on the frequency of intracranial metastasis you can get a conditional figure of 45.8 per 100 thousand people. The quality and life expectancy of patients largely depends on the timeliness of diagnosis and treatment. The standard of treatment until recently was a neurosurgical manual and total irradiation of the entire volume of the brain. The number of patients with large brain metastases that are subject to surgical intervention, however, is quite limited due to the surgical accessibility of the focus, the number of foci and the stage of the oncological process. Stereotactic radiosurgery (SRS) has become a treatment option of choice for the management of brain metastases [1]. Patients are generally considered candidates for SRS if their tumors are less than 10 cc in volume (3 cm average diameter). Large-volume tumors have not hitherto been considered suitable for SRS because tumor size correlates with decreased response rate to radiation and increased risk of neurotoxicity [2, 3]. The number of patients with large brain metastases who are eligible for craniotomy is, however, fairly limited because of surgical accessibility of the tumor, the number of lesions, and the extent of systemic disease. Hypofractionated stereotactic radiation therapy (SRT) has been an alternative to improve the therapeutic

ratio between tumor control and adverse radiation effects for treating large brain metastases. Higuchi et al. [4] reported a new treatment method, where three-session stereotactic radiotherapy using Gamma Knife achieved excellent treatment results, presumably by virtue of significant tumor volume reduction during the inter-fraction intervals. The authors subsequently developed an alternative treatment paradigm comprising two-session GKS for large metastatic brain tumors, and the present study aims to evaluate the efficacy and indications of a treatment to SRT or GKS.

Key words: Stereotactic radiosurgery, hypofractionation, staged radiosurgery, gamma knife.

Актуальность. Качество и продолжительность жизни пациентов с вторичным поражением головного мозга во многом зависят от своевременности диагностики и лечения. Стандарт лечения до последнего времени включал нейрохирургическое пособие и тотальное облучение всего объема головного мозга. Применение стереотаксической лучевой терапии в режиме гипофракционирования и радиохирургии, в сочетании со стандартными методиками лечения имеют высокую эффективность и сокращают количество лучевых реакций, в том числе при радиорезистентном опухолевом процессе. Эффективность и безопасность радиохирургического лечения метастазов рака в головной мозг подтверждены многочисленными наблюдениями, что позволило включить данный метод во многие национальные стандарты лечения. Однако в случае метастазов большого объема применение радиохирургии, т.е. однократного высокодозного облучения, связано с повышенным риском возникновения осложнений. При отсутствии возможности хирургического удаления используются методики подведения дозы за несколько сеансов, с соблюдением принципов стереотаксического наведения. В этом случае облучение проводится в режиме гипофракционирования, с промежутками в 1–3 дня, либо этапной (стажированной) радиохирургии, обычно проводимой с 7–14-дневными перерывами, когда каждый последующий сеанс выполняется как самостоятельная процедура лечения. Выбор между этими двумя методиками остается дискуссионным.

Цель исследования – сравнение ближайших результатов лечения в режиме гипофракционирования и этапной радиохирургии, определение оптимального режима стереотаксического облучения метастатических опухолей в головном мозге.

Материал и методы

В данной работе проведен ретроспективный анализ результатов лечения 41 пациента с вторичным поражением головного мозга, которым были проведены гипофракционирование и этапная радиохирургия в ООО ОП ЛДЦ МИБС Новосибирска с января 2020 по январь 2022 г. Средний возраст пациентов был 53,3 (от 37 до 81) года, преобладали женщины – 65,9 %. По частоте встречаемости опухоли первичной локализации молочной железы составили 43,9 % случаев, меланомы кожи и сосудистой оболочки глаза – 12,2 %, желудочно-кишечного тракта – 12,2 %, легкого – 9,8 %, первично-множественные – 7,3 %, почек и мочевого пузыря – 4,9 %, матки и яичников – 4,9 %, бронхиогенный рак – 2,4 %, без первично-выявленной локализации – 2,4 %.

Всем пациентам проведено клиничко-неврологическое исследование с оценкой по шкале Карновского (KPS). При лечении использовались фиксирующие устройства (стереотаксическая рама Leksell G Frame или индивидуальная термопластическая маска). Магнитно-резонансная томография (МРТ) выполнялась на аппарате Magnetom Avanto (Siemens, Германия) 1,5 Т в режиме T2-взвешенные изображения с толщиной среза 2 мм, усиленные магневином/гадовисмом T1-взвешенные изображения с толщиной среза 1 мм. Полученные изображения импортировали в планирующую станцию Leksell Gamma Plan 11. 1, где производилось планирование лечения.

Лечение проводилось на аппарате Leksell Gamma Knife Icon (Elekta AB, Sweden) в режиме гипофракционирования или этапной радиохирургии. Режим лечения был выбран с учетом клинической симптоматики, наличия единичного и множественного метастатического поражения, близости очагов к критическим структурам головного мозга.

Группа наблюдений составила 54 очага объемами более 10 см³ с применением двух методик.

Гипофракционный метод лечения применен к 21 очагу в три и пять сеансов каждый день или через день. Краевая доза варьировалась в диапазоне от 5 Гр до 8 Гр. Суммарная очаговая доза (СОД) составила от 18 Гр до 25 Гр.

Методом этапной радиохирургии пролечено 33 очага в два и три этапа с временным интервалом от 1,5 до 4 нед. Краевая доза в первый сеанс лечения находилась в диапазоне от 8 до 12 Гр, во второй – 8–12 Гр, третий – 8–10 Гр. СОД варьировала от 16 Гр до 30 Гр.

Оценка локального контроля лечения проводилась на основе данных МР-томографии и волюметрического анализа очагов на всех этапах наблюдения и составила 18 месв.

Результаты

При проведении этапной радиохирургии средний объем очагов на момент лечения составил 15 см³ (диапазон 1,7 см³ – 39 см³). Очаги объемом более 10 см³ составили 62 %. Среднее значение краевой дозы на первом этапе стажирования составило 10 Гр (диапазон от 8 Гр до 12 Гр).

На момент второй фракции средний объем метастатических очагов составил 13 см³ (диапазон 0,5 см³ – 32 см³). Очаги объемом более 10 см³ составили 52 %. Среднее значение краевой дозы на втором этапе – 10 Гр (диапазон от 8 Гр до 12 Гр).

На момент подведения третьей фракции средний объем метастатических очагов равен 13 см³ (диапазон 3 см³ – 23 см³). Очаги объемом более 10 см³ составили 64 %, остальные – менее 10 см³. Среднее значение краевой дозы на третьем этапе – 91 Гр (диапазон от 8 Гр до 10 Гр).

По результатам контрольной интроскопии через 1 мес после лечения средний объем метастатических очагов уменьшился до 6 см³ (диапазон 0,2 см³ – 24 см³). Стоит отметить, что часть очагов вовсе регрессировали.

Медиана объема метастатических очагов на первом этапе лечения и контрольной МРТ через 1 месяц после лечения составили 14 см³ и 3,3 см³ соответственно. Уменьшение объема очагов через 1 месяц после подведения последней дозы произошло на 76 %.

При проведении гипофракционирования средний объем очагов составил 18 см³ (диапазон 1,7 см³ – 54 см³). Очаги объемом более 10 см³ составили 75%. Среднее значение краевой дозы – 24 Гр (диапазон от 18 Гр до 25 Гр).

Медиана объема метастатических очагов на момент лечения и через 1 мес после лечения составила 15 см³ и 5 см³ соответственно. Уменьшение объема очагов через 1 мес после подведения последней дозы произошло на 67 %.

Также при ретроспективном анализе развитие лучевых реакций в режиме гипофракционирования наблюдалось в 10 очагах (30,3 %) и соответствовало 1–3 степени по шкале RTOG в срок от 5 до 12 мес, с последующим регрессом через 14 мес от начала лечения, локальный продолженный рост (рецидив) в 1 очаге (3 %) через 17 мес после проведенного лечения. Лучевые реакции зарегистрированы в 3 очагах (14,2 %) 1–2 степени по шкале RTOG при этапной радиохирургии в сроки от 1 до 5 мес с последующим регрессом через 9 мес от начала лечения.

Заключение

Ближайшие результаты лечения метастазов большого объёма в головной мозг методом этапной радиохирургии и гипофракционирования сопоставимы. Стажированная радиохирургия обеспечивает удовлетворительные показатели локального контроля и сопоставима с гипофракционным методом лечения крупных интракраниальных метастазов при отсутствии возможности хирургического удаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Serizawa T., Saeki N., Higuchi Y., Ono J., Iuchi T., Nagano O., Yamaura A. (2005) Gamma knife surgery for brain metastases: indications for and limitations of a local treatment protocol. *Acta Neurochir (Wien)* 147:721–726 (discussion 726) 5.
2. Shiau C.Y., Sneed P.K., Shu H.K., Lamborn K.R., McDermott M.W., Chang S., Nowak P., Petti P.L., Smith V., Verhey L.J., Ho M., Park E., Wara W.M., Gutin P.H., Larson D.A. (1997) Radiosurgery for brain metastases: relationship of dose and pattern of enhancement to local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37:375–383.
3. Higuchi Y., Serizawa T., Nagano O., Matsuda S., Ono J., Sato M., Iwadata Y., Saeki N. (2009) Three-staged stereotactic radiotherapy without whole brain irradiation for large metastatic brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74:1543–1548.
4. Sneed P., Mendez J., Vemer-van den Hoek J.G.M. et al. Adverse radiation effect after stereotactic radiosurgery for brain metastases: incidence, time course, and risk factors. *J Neurosurg* 2015;123(2):373–86. DOI: 10.3171/2014.10.JNS141610.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

К.А. Кретова¹, А.С. Жингель¹, О.С. Назарко¹, С.В. Сидоров^{1,2},
С.П. Шевченко^{1,2}

Национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия¹
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Городская
клиническая больница №1», г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

В настоящее время цитологический метод исследования является золотым стандартом в диагностике злокачественных новообразований кожи, но достоверность данного анализа в ряде случаев вызывает сомнения. **Цель исследования** – определить эффективность цитологического исследования злокачественного поражения кожи в сравнении с данными послеоперационного гистологического исследования. **Материал и методы.** В исследование было включено 80 пациентов, из них 48 женщин, средний возраст $72 \pm 11,5$ лет, и 32 мужчины, средний возраст $70,8 \pm 12,9$ года, с подтвержденным цитологическим анализом базальноклеточный рак кожи. Всем пациентам было проведено хирургическое лечение. Материал отправлен на гистологическое заключение. **Результаты.** После интерпретации гистологического анализа, базальноклеточный рак кожи подтвердился у 55 пациентов (68,75 %), у 25 пациентов (31,25%) обнаружены другие образования кожи. **Выводы.** В диагностике злокачественных новообразований кожи цитологический метод исследования был недостоверен в 31,25 % случаев. В этом случае часть пациентов, у которых был подтвержден плоскоклеточный рак кожи, получили недостаточный объем предоперационной диагностики, так как частота метастазирования плоскоклеточного рака кожи значительно выше, чем при базальноклеточном раке кожи. В то же время пациенты с подтвержденным диагнозом доброкачественного образования кожи подверглись напрасной хирургической агрессии.

Ключевые слова: злокачественные новообразования кожи, цитологический метод исследования, базальноклеточный рак кожи, плоскоклеточный рак кожи.

THE EFFICIENCY OF CYTOLOGICAL EXAMINATION IN DIAGNOSTICS OF MALIGNANT SKIN NEOPLASMS

K.A. Kretova¹, A.S. Zhingel¹, O.S. Nazarko¹, S.V. Sidorov^{1,2}, S.P. Shevchenko^{1,2}

National Research State University, Novosibirsk, Russia¹
State budgetary health care institution of Novosibirsk region "City clinical hospital №1", Novosibirsk, Russia²

Abstract

At present, the cytological examination method is the gold standard in the diagnostics of malignant skin neoplasms, but the reliability of this analysis raises doubts in a number of cases. **Objective of the research** is to determine the efficiency of cytological examination of malignant skin lesions in comparison with the data of postoperative histological examination. **Material and Methods.** The study recruited 80 patients, of whom 48 were women with a mean age of 72 ± 11.5 years, and 32 men with a mean age of 70.8 ± 12.9 years, with a confirmed cytological analysis of basal cell skin cancer. All patients underwent surgical treatment. The material was sent for a histological report. **Results.** After interpretation of the histological analysis, basal cell skin cancer was confirmed for 55 patients (68.75%) and 25 patients (31.25%) had other skin formations. **Conclusions.** In the diagnostics of malignant skin neoplasms, the cytological examination method was unreliable in 31,25% of cases. In this case, a part of patients who had confirmed squamous cell skin cancer received insufficient preoperative diagnostics because the rate of skin squamous cell cancer metastasis is much higher than in basal cell skin cancer. At the same time, patients diagnosed with benign skin formations were subjected to unnecessary surgical aggression.

Key words: malignant skin neoplasms, cytological examination method, basal cell skin cancer, squamous cell skin cancer.

Введение. Проблема злокачественных образований кожи является актуальной как в России, так и во всем мире. В структуре онкологической заболеваемости в РФ опухоли кожи занимают первое место, составляя 12,5 % [1]. И наиболее часто данная патология затрагивает социально важную зону, локализуясь на лице. Так как основным лечением является хирургическая экцизия, несомненно важным является проведение адекватной предоперационной диагностики. В настоящее время цитологическое исследование с помощью соскоба или отпечатка является простым и быстрым методом диагностики, в основе которого лежит изучения клеток и внеклеточных структур [2,3]. По литературным данным, частота совпадения цитологического и гистологического анализа новообразований кожи составляет 91,2–92,7 % [4]. Этот метод широко вошел в онкологическую практику и зачастую является основополагающим в решении хирургического лечения.

Цель исследования – определить эффективность цитологического исследования злокачественного поражения кожи в сравнении с данными послеоперационного гистологического исследования.

Материал и методы

Во время исследования на базе городской клинической больницы №1, 6 онкологическом отделении, было включено 80 пациентов, из них 48 женщин, средний возраст 72±11,5 лет, и 32 мужчины, средний возраст 70,8±12,9 года, с подтвержденным цитологическим анализом базальноклеточный рак кожи. Всем пациентам было проведено оперативное лечение в объеме иссечения опухоли кожи с отступом 0,5 см, операционный материал отправлен на гистологическое исследование. После интерпретации полученных данных гистологического заключения базальноклеточный рак кожи подтвердился у 55 пациентов (68,75 %), у 25 пациентов (31,25 %) обнаружены другие образования кожи. В структуру других образований кожи вошли: плоскоклеточный рак кожи (12,5 %), доброкачественные образования кожи (18,75 %).

Выводы

Цитологическое исследование в диагностике злокачественных новообразований кожи в 31,25 % случаев является недостоверным методом исследования. 12,5 % пациентов получили недостаточный объем предоперационной диагностики, в то время как 18,75 % пациентов были прооперированы по поводу доброкачественных образований кожи, когда могли получить менее травматичный метод лечения. Так как данная патология затрагивает социально важную зону, локализуясь на лице, необходимо уменьшить хирургическую агрессию и расширить показания для проведения инцизионной биопсии. Факторы, влияющие на возможные ошибки в дифференциальной диагностике, можно разделить на 2 группы: 1. Правильность и адекватность забора материала специалистом для цитологического исследования – обязательное удаление корочки с образования при её наличии; исключить спиртовую обработку места забора материала; адекватный выбор области забора материала. 2. Дефекты цитологического исследования – погрешности в окраске; опыт врача, интерпретирующего анализ [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Модестов А.А. и др. Новые подходы к организации скрининга злокачественных новообразований кожи // Сибирский онкологический журнал. 2017. Т. 16, №. 2. С. 61-65.
2. Шапиро Н.А. Принципы цитологической диагностики злокачественных опухолей. Т.3: цв.атлас. М., 2008. С.11-16.
3. Лелевич С.В., Анисович Е.И. Цитологические исследования в медицине // Медицинские новости. 2018. №. 2 (281). С. 33-35.
4. Волченко Н.Н., Полонская Н.Ю. Цитологический метод в диагностике опухолей и опухолеподобных процессов // Новости клинической цитологии России. 2018. Т. 22, №. 1–2. С. 23-29.
5. Черняева В.М., Левина А.И., Углова Е.Е. Анализ результатов цитологического исследования новообразований кожи // Новости клинической цитологии России. 2012. Т. 16, №. 1–2.

КОНЦЕПЦИЯ СОЗДАНИЯ ДОЗИМЕТРИЧЕСКОГО ФАНТОМА ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

**В.А. Куйвалайнен¹, Ю.А. Зубкова¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹,
И.А. Милойчикова^{1,2}, С.Г. Стучебров¹**

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

В работе представлено обоснование применения искусственных моделей мелких лабораторных животных – фантомов, изготовленных при помощи аддитивных технологий, для исследования новых радиотерапевтических методик. Приведены результаты анализа томографических данных лабораторного животного (крысы) в программном обеспечении RadiAnt DICOM Viewer и определены отдельные анатомические структуры в соответствии с анатомическим атласом крысы. На основе томографических данных в программном пакете 3D Slicer была создана объемная модель всего тела и отдельных внутренних органов исследуемого животного с последующей постобработкой полученных 3D-моделей в CAD-системах.

Ключевые слова: дозиметрический фантом, лучевая терапия, DICOM, аддитивные технологии, метод послойного наплавления, САПР.

THE CONCEPT OF A DOSIMETRY PHANTOM CREATION FOR PRECLINICAL STUDIES

V.A. Kuivalainen¹, Yu.A. Zubkova¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹,
I.A. Miloichikova^{1,2}, S.G. Stuchebrov¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Abstract

The paper presents the reason for the use of artificial models of small laboratory animals – phantoms, that are being made using additive technologies, for the study of new radiotherapy techniques. The results of the analysis of tomographic data of a laboratory animal (rat) in the RadiAnt DICOM Viewer software are presented and individual anatomical structures are determined in accordance with the anatomical atlas of the rat. On the basis of tomographic data, a three-dimensional model of the whole body and individual internal organs of the studied animal was created in the 3D Slicer software package, followed by post-processing of the resulting 3D models in CAD systems.

Key words: dosimetry phantoms, radiotherapy, DICOM, additive manufacturing, fused deposition method, CAD

Актуальность. Одна из важнейших проблем человечества – онкологические заболевания, которые занимают второе место по числу причин смерти в России [1]. В связи с высокой распространенностью данного заболевания диагностика и терапевтическое лечение стали стремительно развиваться, что позволяет лечить и замедлять большинство злокачественных новообразований. Для лечения таких заболеваний в большинстве случаев используется лучевая терапия (ЛТ) [2]. Данное лечение основано на применении ионизирующего излучения (ИИ), которое при взаимодействии с клетками новообразования может привести их к гибели [3]. Но ИИ также может влиять и на здоровые клетки организма, поэтому необходимо проводить дозиметрическое планирование ЛТ. В последнее время все чаще вводятся новые методы ЛТ для борьбы с различными формами и типами опухолей. Внедрение нового метода терапевтической практики требует большого количества исследований с применением ионизирующего излучения. Такие исследования проводят на мелких лабораторных животных, таких как мыши и крысы [4]. Но использование животных в медицинских целях неразрывно связано с этическими проблемами [5,6]. Для того чтобы сократить использование животных в экспериментах, предлагается применять их искусственные модели – фантомы. Такие модели могут быть изготовлены с применением аддитивных технологий [7]. Данные технологии позволяют создать фантомы животных на основе томографических данных, также 3D-печать дает возможность имитировать ткани и органы животного в отношении их взаимодействия с ИИ путем использования разнообразных материалов, в том числе и сложных композитных с различными примесями, и варьирования параметров печати. Это позволяет добиться соответствия фантома свойствам человеческих органов и тканей с точки зрения взаимодействия их с ионизирующим излучением, что дает более точные результаты при планировании ЛТ.

Целью исследования стала разработка концепции создания дозиметрического фантома для доклинических испытаний.

Материал и методы

Создание фантома мелкого лабораторного животного проводилось в несколько этапов. На начальном этапе были проанализированы томографические данные мелкого лабораторного животного для анализа анатомической структуры животного. Данные визуализации анатомической структуры были получены в формате DICOM. Данный формат данных представляет собой набор изображений медицинского характера, а также включает в себя сопровождающую информацию [8]. Далее на основе полученных томографических данных была создана 3D-модель тела и некоторых внутренних органов крысы с помощью программного обеспечения (ПО) 3D Slicer. 3D Slicer – это программное обеспечение, пригодное для анализа медицинских изображений, обработки изображений и трехмерной визуализации [9]. На конечном этапе цифровая модель крысы была отредактирована в системе автоматизированного проектирования (САПР) Autodesk Meshmixer. Autodesk Meshmixer – это программное обеспечение, используемое для подготовки и улучшения 3D-моделей для 3D-печати [10]. Программа может работать с широким спектром форматов, в том числе пригодных для 3D-печати. Программа обладает большим количеством инструментов для анализа, скульптурирования и редактирования модели, при помощи которых можно подготовить модель для дальнейшей 3D-печати. В программе был использован инструмент сглаживания для придания ровной и гладкой структуры внешней оболочке тела мелкого лабораторного животного. Таким образом, после обработки моделей в системе автоматизированного проектирования Autodesk Meshmixer мы получаем полностью готовую и пригодную для печати 3D-модель. Дополнительно в Autodesk Meshmixer можно разделить модель на отдельные слои определенной толщины, чтобы в дальнейшем между ними располагать пленочные дозиметры. Также на этапе разработки модели могут быть созданы отверстия для термoluminesцентных дозиметров (ТЛД). Для заполнения данных отверстий создаются специальные стержни из тканеэквивалентного материала, в которые помещаются ТЛД. Стержни можно нарезать любой длины таким образом, чтобы их можно было разместить на необходимой глубине в каждой из секций. Для другого способа получения дозного распределения можно сделать отверстие под ионизационную камеру в необходимой зоне интереса, зная ее геометрические параметры.

Результаты

В данной работе проводилось создание трехмерной модели мелкого лабораторного животного на основе томографических данных (рис. 1).

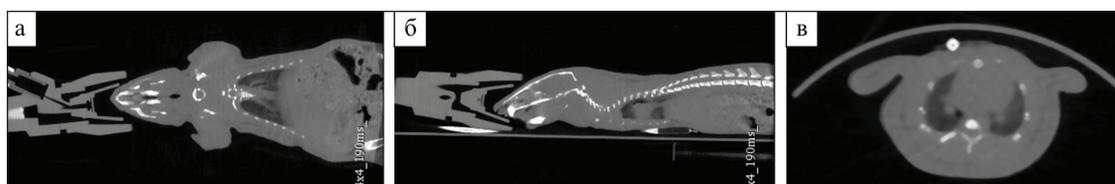


Рис. 1

Программное обеспечение 3D Slicer предоставляет возможность выбрать необходимую зону интереса, т.е. выделить отдельные органы и ткани исследуемого животного. На рис. 2 представлен пример выделения зон интереса в ПО 3D Slicer.

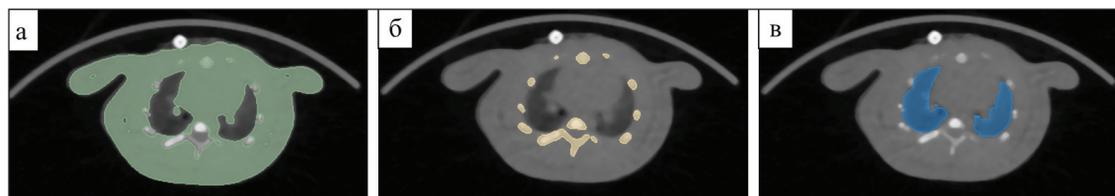


Рис. 2

После полного выделения интересующих биологических объемов при помощи инструмента MakeModelEffect с заданным параметром сглаживания методом мультипланарной реконструкции выделенные объемы переводятся в объемные модели. На рис. 3 представлены объемные модели мягкой, костной и легочной тканей.

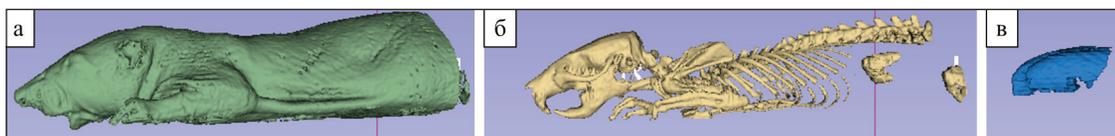


Рис. 3

На рис. 3 видны различные неровности моделей из-за погрешностей определения отдельных органов. Для корректировки модели файл экспортируется в компьютерную программу Autodesk Meshmixer. На рис. 4 представлены доработанные модели.



Рис. 4

В дальнейшем планируется подобрать материалы для трехмерной печати фантома лабораторного грызуна. На этапе разработки данная модель может быть разделена на отдельные слои определенной толщины, между которыми можно располагать пленочные дозиметры. Также в модели могут быть сделаны отверстия для термолюминесцентных дозиметров или ионизационных камер, с помощью которых можно получить дозное распределение в необходимой зоне интереса.

Выводы

В рамках данной работы была показана возможность создания трехмерной модели всего тела и отдельных органов мелкого лабораторного животного на основе томографических данных. Полученные результаты могут быть использованы для изготовления фантомов методом трехмерной печати с целью уменьшения количества сеансов облучения на живых лабораторных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения 075-15-2021-271 (проект № МК-3481.2021.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. 239 с.
2. Gerber D. E., Chan T.A. Recent advances in radiation therapy // American family physician. 2008. Vol. 78, №. 11. P. 1254-1262.
3. Storer J. B. et al. The relative biological effectiveness of various ionizing radiations in mammalian systems // Radiation Research. 1957. Vol. 6. №. 2. P. 188-288.
4. Кум О.И. и др. Гуманизированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор) // Биомедицина. 2019. Т. 15, №. 4. С. 67-81.
5. Para A. E. et al. Effects of genistein following fractionated lung irradiation in mice // Radiotherapy and Oncology. 2009. Т. 92, №. 3. С. 500-510.
6. Булдаков М. А. и др. Влияние импульсно-периодического рентгеновского излучения на клетки опухоли и костного мозга мышей // Сибирский онкологический журнал. 2014. №. 5. С. 34–38.
7. Soultanidis G. et al. Development of an anatomically correct mouse phantom for dosimetry measurement in small animal radiotherapy research // Physics in Medicine & Biology. 2019. V. 64, №. 12. P. 12NT02.
8. DICOM. Digital Imaging and Communication in Medicine. Режим доступа: (дата обращения: 11.02.2022)
9. 3D Slicer image computing platform. Режим доступа: <https://www.slicer.org/> (дата обращения: 11.02.2022)
10. Autodesk Meshmixer. Режим доступа: <http://www.meshmixer.com/> (дата обращения: 11.02.2022)

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С УЧЕТОМ ФЕНОМЕНА STAS И СОСТОЯНИЯ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ВНЕ ОПУХОЛИ

Д.М. Лоос¹, А.А. Дурова¹, Д.С. Письменный^{1,2}, Н.В. Крахмаль^{1,2}

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Томск, Россия¹

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

Рак легкого является самым распространенным онкологическим заболеванием в мире. Актуальным является поиск дополнительных параметров прогноза течения немелкоклеточного рака легкого. Исследовался операционный материал от 125 больных немелкоклеточным раком легкого T1–3N0–2M0. Изучалась ткань первичной опухоли, бронхов вне опухоли, региональных лимфоузлов. Применялся метод световой микроскопии. Оценивались наличие STAS, состояние эпителия бронхов вне опухоли, в котором выделяли базальноклеточную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию. В региональных лимфоузлах оценивали наличие метастатического поражения. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Показано, что частота лимфогенного и гематогенного метастазирования различается в зависимости от морфологических изменений бронхиального эпителия у пациентов с плоскоклеточной карциномой без НАХТ, а частота рецидивирования – у больных с аденокарциномой без НАХТ. Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования связана с наличием STAS с учетом морфологических изменений бронхиального эпителия у больных с аденокарциномой легкого без НАХТ.

Ключевые слова: рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома, STAS, лимфогенное метастазирование, гематогенное метастазирование, рецидивирование, прогноз.

THE POSSIBILITY OF PREDICTING THE COURSE OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER, TAKING INTO ACCOUNT STAS PHENOMENON AND THE STATE OF THE BRONCHIAL EPITHELIUM OUTSIDE THE TUMOR

D.M. Loos , A.A. Durova¹, D.S. Pismenny^{1,2}, N.V. Krakhmal^{1,2}

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia¹

Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia²

Annotation

Lung cancer is the most common cancer in the world. The search for additional parameters for the prognosis of the course of non-small cell lung cancer is topical. Surgical material from 125 patients with T1-3N0-2M0 non-small cell lung cancer was studied. The tissue of the primary tumor, bronchi outside the tumor, and regional lymph nodes were studied. The method of light microscopy was used. The presence of STAS was assessed, the condition of the bronchial epithelium outside the tumor, in which basal cell hyperplasia and squamous metaplasia were isolated. In regional lymph nodes, the presence of metastatic lesions was assessed. Statistical processing was carried out using the Statistica 10.0 for Windows software package. It has been shown that the frequency of lymphogenous and hematogenous metastasis differs depending on the morphological changes in the bronchial epithelium in patients with squamous cell carcinoma without NAC, and the frequency of recurrence in patients with adenocarcinoma without NAC. The frequency of lymphogenous and hematogenous metastasis is associated with the presence of STAS, taking into account morphological changes in the bronchial epithelium in patients with lung adenocarcinoma without NAC.

Key words. Lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, STAS, lymphogenous metastasis, hematogenous metastasis, recurrence, prognosis.

Актуальность. Рак легкого является самым распространенным онкологическим заболеванием в мире. Немелкоклеточный рак легкого составляет 80 % всех злокачественных новообразований легких и, в свою очередь, включает аденокарциному и плоскоклеточную карциному [1]. STAS (spread through air spaces) представляет собой особую форму прогрессирования рака легкого и может служить независимым фактором прогноза локорегионарного и отдаленного метастазирования [2]. В последнее время появились работы, демонстрирующие необходимость исследования состояния эпителия бронхов вне опухолевого узла у пациентов с раком легкого. Высокий риск гематогенного метастазирования при немелкоклеточном раке легкого связывают с присутствием в бронхах, отдаленных от опухоли, изолированной базальноклеточной гиперплазии, а риск рецидивирования – с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии [3]. Представляется перспективным изучение особенностей STAS в зависимости от состояния эпителия бронхов вне опухоли с целью разработки новых подходов к прогнозированию течения немелкоклеточного рака легкого.

Цель – изучить особенности STAS в зависимости от состояния эпителия бронхов вне опухоли для разработки новых подходов к прогнозированию течения немелкоклеточного рака легкого.

Материал и методы

В исследование включено 125 больных немелкоклеточным раком легкого T1–3N0–2M0, проходивших лечение в отделении торако-абдоминальной онкологии Томского НИИ онкологии в период с 2009 по 2017 г. Средний возраст составил $59,2 \pm 7,2$ года. Мужчин 110 (87%), женщин 16 (13%). 35 больных перед операцией получали по 2 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). 90 пациентов НАХТ не получали. Срок наблюдения составил 3 года. Анализировались амбулаторные карты и истории болезни пациентов. Исследовался операционный материал. Гистологические препараты изготавливались по стандартной методике, окрашивались гематоксилином и эозином. Изучалась ткань первичной опухоли, бронхов вне опухоли, региональных лимфоузлов. Применялся метод световой микроскопии. В исследование включались случаи с немелкоклеточным раком легкого (с аденокарциномой или плоскоклеточной карциномой). Оценивалось наличие феномена распространения опухоли по воздушным пространствам (STAS). Определялся ограниченный STAS (наличие опухолевых клеток на расстоянии до 3 альвеол от основного опухолевого узла) и обширный STAS (на расстоянии более 3 альвеол) (5). В бронхах, расположенных далее на 3–4 см от первичного опухолевого узла, изучали состояние эпителия, в котором выделяли базальноклеточную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию. В регионарных лимфоузлах оценивали наличие метастатического поражения. Сведения о развитии гематогенного метастазирования и рецидивирования получали на основании анализа амбулаторных карт и историй болезни пациентов. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Применялись методы описательной, непараметрической статистики, критерий χ^2 . Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты

У больных с плоскоклеточной карциномой легкого, не получавших НАХТ, лимфогенные метастазы обнаруживались чаще (67 %) в группе с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией в сравнении с группой без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (17 %; $p=0,01$) или с базальноклеточной гиперплазией без плоскоклеточной метаплазии (38 %; $p=0,03$). Гематогенные метастазы чаще (31 %) наблюдались в группе с базальноклеточной гиперплазией без плоскоклеточной метаплазии в сравнении с группой без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (0 %; $p=0,05$) или с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией (0 %; $p=0,004$). У больных с плоскоклеточной карциномой легкого, получавших НАХТ, гематогенные метастазы обнаруживались чаще (56 %) в группе с базальноклеточной гиперплазией без плоскоклеточной метаплазии в сравнении с группой с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией (17 %; $p=0,04$). У больных с аденокарциномой легкого, не получавших НАХТ, рецидивы обнаруживались чаще (30 %) в группе с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией в сравнении с группами без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (0 %; $p=0,02$) и с базальноклеточной гиперплазией без плоскоклеточной метаплазии (0 %; $p=0,005$). Достоверных различий в частоте встречаемости STAS в исследуемых группах не было обнаружено. У больных с аденокарциномой легкого без НАХТ массивный STAS чаще (100 %) встречался в группе больных с базальноклеточной гиперплазией без плоскоклеточной метаплазии (100 %) в сравнении с группами без базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии

(33 %; $p=0,0052$) и с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией (0 %; $p=0,0005$). У больных с аденокарциномой легкого без НАХТ при наличии в бронхиальном эпителии вне опухоли базальноклеточной гиперплазии без плоскоклеточной метаплазии в случаях с обнаружением феномена STAS чаще встречалось метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов (63%), в сравнении со случаями, когда лимфогенных метастазов не было (37 %; $\chi^2=3,9$; $p=0,04$), а также реже возникала гематогенная диссеминация (13 %), в сравнении со случаями, когда метастатического поражения отдаленных органов не было (87 %; $p=0,0015$). У больных с плоскоклеточной карциномой легкого без НАХТ в группе с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией в случаях с наличием STAS чаще выявлялось метастатическое поражение регионарных лимфоузлов (86 %) в сравнении со случаями, когда лимфогенного прогрессирования не было (14 %; $p=0,003$). Связи частоты рецидивирования с наличием и вариантом STAS не было обнаружено ни в одной из исследуемых групп.

Выводы

Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования различается в зависимости от морфологических изменений бронхиального эпителия у пациентов с плоскоклеточной карциномой без НАХТ, а частота рецидивирования – у больных с аденокарциномой без НАХТ. Частота лимфогенного и гематогенного метастазирования связана с наличием STAS с учетом морфологических изменений бронхиального эпителия у больных с аденокарциномой легкого без НАХТ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Гранта Президента НШ-2701.2020.7 «Разработка новых подходов к прогнозированию течения карцином молочной железы и легких с учетом морфологической и молекулярно-генетической гетерогенности опухоли».

ЛИТЕРАТУРА

1. William D., Travis M.D., Elisabeth Brambilla M.D., Andrew G., Nicholson M.D., Yasushi Yatabe M.D. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors // Journal of Thoracic Oncology, 2015. T.10.
2. Shaohua Lu, Kay See Tan, Kyuichi Kadota, Takashi Eguchi, Sarina Bains, Natasha Rekhman, Prasad S. Adusumilli, William D. Travis. Spread through Air Spaces (STAS) Is an Independent Predictor of Recurrence and Lung Cancer-Specific Death in Squamous Cell Carcinoma// Journal of Thoracic Oncology, 2017.
3. Панкова О.В., Перельмутер В.М., Тузиков С.А., Денисов Е.В. Пре- и неопластические изменения бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого// Бюллетень сибирской медицины. 2014. №3.

РАК ЖЕЛУДКА IV СТАДИИ (С КАРЦИНОМАТОЗОМ БРЮШИНЫ). РЕЗУЛЬТАТЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

**В.А. Маркович¹, С.А. Тузиков^{1,2}, Е.О. Родионов^{1,2}, Н.О. Попова¹,
М.М. Цыганов^{1,3}, С.В. Миллер¹, Д.В. Подолько¹, И.А. Цыденова^{1,3},
М.К. Ибрагимова^{1,3}**

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия²
НИ Томский государственный университет, Томск, Россия³

Аннотация

Рак желудка IV стадии по статистике выявляется у 39,8 % первичных пациентов. Примерно у 11 (43 %) пациентов с IV стадией рака желудка выявляется синхронный карциноматоз брюшины. При этом карциноматоз без других отдаленных метастазов встречается лишь в 18–20 % случаев от общей доли IV стадии. Перитонеальный карциноматоз (ПК) является одним из основных и наиболее неблагоприятных вариантов прогрессирования злокачественных опухолей различных локализаций, особенно при раке желудка. **Цель** – изучить отдалённые результаты применения персонализированной системной и интраперитонеальной химиотерапии в составе комбинированного лечения рака желудка, осложненного синхронным карциноматозом брюшины (циторедуктивное хирургическое лечение и персонализированное назначение послеоперационной системной и интраперитонеальной химиотерапии, подобранной на основании оценки уровней экспрессии генов монорезистентности в опухоли). **Материал и методы.** Проанализированы семилетние результаты лечения 70 пациентов с раком желудка IV стадии (с карциноматозом брюшины). Всем пациентам выполнялось циторедуктивное лечение, с последующими

курсами химиотерапии. В основной группе (n=35), после циторедуктивного оперативного лечения проведена персонализированная системная и интраперитонеальная химиотерапия на основании уровней экспрессии генов ABCC5, RRM1, TYMS, TOP1, TOP2 α , TUBB3, BRCA1 и ERCC1. В группе контроля проводилась стандартная послеоперационная химиотерапия по схеме FOLFOX, без перитонеального контроля. **Результаты.** В основной группе медиана времени до прогрессирования онкологического заболевания составила 14.9 с интерквартильным размахом (13.5–17.2) мес, а в группе контроля – 11.2 (10.3–11.6) мес. Медиана общей выживаемости в основной группе составила 17,9 с интерквартильным размахом (14.7–19.5) мес, в контрольной группе – 12,7 (11.3–13.1) мес (n=35) (p<0,001). **Заключение.** Разработанный способ циторедуктивного оперативного лечения с персонализированным назначением препаратов для системной и интраперитонеальной химиотерапии, при раке желудка IV стадии (с карциноматозом брюшины), на основании молекулярно-генетических характеристик опухоли позволяет улучшить показатели безрецидивной и общей выживаемости.

Ключевые слова: карциноматозом, персонализированная химиотерапия, циторедуктивная хирургия, индекс перитонеального карциноматоза, гены монорезистентности.

STAGE IV GASTRIC CANCER (WITH PERITONEAL CARCINOMATOSIS). THE RESULTS OF PERSONALIZED COMBINED TREATMENT

V.A. Markovich¹, S.A. Tuzikov^{1,2}, E.O. Rodionov^{1,2}, N.O. Popova¹,
M.M. Tsyganov^{1,3}, S.V. Miller¹, D.V. Podolko¹, I.A. Tsydenova^{1,3},
M.K. Ibragimova^{1,3}

Cancer Research Institute Tomsk NRC, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia³

Annotation

According to statistics, stage IV gastric cancer is detected in 39.8% of primary patients. Approximately 11-43% of patients with stage IV gastric cancer have synchronous peritoneal carcinomatosis. At the same time, carcinomatosis, without other distant metastases, occurs only in 18-20% of cases of the total proportion of stage IV. Peritoneal carcinomatosis (PC) is one of the main and most unfavorable variants of the progression of malignant tumors of various localizations, especially in gastric cancer. **Objective:** To study the long-term results of the use of personalized systemic and intraperitoneal chemotherapy as part of the combined treatment of gastric cancer complicated by synchronous peritoneal carcinomatosis (cytoreductive surgical treatment and personalized appointment of postoperative systemic and intraperitoneal chemotherapy, selected based on the assessment of the expression levels of monoresistance genes in the tumor). **Material and methods:** Seven-year results of treatment of 70 patients with stage IV gastric cancer (with peritoneal carcinomatosis) were analyzed. All patients underwent cytoreductive treatment, followed by chemotherapy courses. In the main group (n=35), after cytoreductive surgical treatment, personalized systemic and intraperitoneal chemotherapy was performed based on the expression levels of the genes ABCC5, RRM1, TYMS, TOP1, TOP2 α , TUBB3, BRCA1 and ERCC1. In the control group, standard postoperative chemotherapy was performed according to the FOLFOX scheme, without peritoneal control. **Results:** In the main group, the median time to cancer progression was 14.9 with an interquartile range (13.5-17.2) months, and in the control group - 11.2 (10.3-11.6) months. The median overall survival in the main group was 17.9 with an interquartile range (14.7-19.5) months, in the control group - 12.7 (11.3-13.1) months (n=35) (p<0.001). **Conclusion:** the developed method of cytoreductive surgical treatment with personalized prescribing of drugs for systemic and intraperitoneal chemotherapy for stage IV gastric cancer (with peritoneal carcinomatosis), based on the molecular genetic characteristics of the tumor, allows to improve the indicators of relapse-free and overall survival.

Key words: carcinomatosis, personalized systemic and intraperitoneal chemotherapy, cytoreductive surgery, peritoneal carcinomatosis index.

Актуальность. Рак желудка (РЖ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний в мире. РЖ в 2010 году, занимал 2-е место (10%) в структуре онкологической заболеваемости [1]. За последние 10 лет в России, согласно данным официальной статистики на 2019 г., РЖ сместился на 5-е место в мире и 6-е место (5,7 %) в России по распространенности злокачественных новообразований. Несмотря на положительную тенденцию к

снижению уровня заболеваемости, рак желудка по-прежнему, является третьей в мире и второй в России (9,3 %) причиной смертей онкологических пациентов [2]. Рак желудка IV стадии по статистике выявляется у 39,8 % первичных пациентов. Примерно у 11 – 43 % пациентов с IV стадией рака желудка выявляется синхронный карциноматоз брюшины [3]. При этом карциноматоз, без других отдаленных метастазов встречается лишь в 18 – 20 % случаев от общей доли IV стадии. [4]. Перитонеальный карциноматоз (ПК) является одним из основных и наиболее неблагоприятных вариантов прогрессирования злокачественных опухолей различных локализаций, особенно при раке желудка [5].

Цель исследования – изучить отдалённые результаты применения персонализированной системной и интраперитонеальной химиотерапии в составе комбинированного лечения рака желудка, осложненного синхронным карциноматозом брюшины (циторедуктивное хирургическое лечение и персонализированное назначение послеоперационной системной и интраперитонеальной химиотерапии, подобранной на основании оценки уровней экспрессии генов монорезистентности в опухоли).

Материал и методы

В работе проанализированы 7-летние результаты лечения 70 пациентов с раком желудка IV стадии, с карциноматозом брюшины, при отсутствии других отдаленных метастазов (печень, легкие и т.д.), госпитализированных в НИИ онкологии в период с начала 2014 по конец 2021 г. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, а также с разрешения локального этического комитета НИИ онкологии; все пациенты подписали информированное согласие на исследование. Важным критерием включения в исследование служил индекс перитонеального карциноматоза (PCI от англ.: Peritoneal Cancer Index). Верхней границей включения служил PCI <12 (из максимального 39).

Больных распределили на две группы. Контрольная группа (n=35) была сформирована ретроспективно, на основании анализа медицинской документации (период с 2014 по 2017 г.), которым выполнялось циторедуктивное оперативное лечение с последующей стандартной послеоперационной химиотерапией по схеме FOLFOX, без перитонеального контроля. В основной группе (n=35) после циторедуктивного оперативного лечения проведена персонализированная системная и интраперитонеальная химиотерапия на основании уровней экспрессии генов ABCC5, RRM1, TYMS, TOP1, TOP2 α , TUBB3, BRCA1 и ERCC1. Уровень экспрессии генов монорезистентности в операционном материале был оценён с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Критерии RECIST 1.1 были использованы для оценки объективного ответа на проводимую химиотерапию и в случае прогрессирования заболевания. Послеоперационные осложнения были оценены в соответствии с классификацией АММ (Abdominal Morbidity and Mortality System). Нежелательные явления в процессе послеоперационной химиотерапии оценивались с помощью критериев СТСАЕ, версия 4.03. Статистический анализ проведён с использованием прикладного пакета «IBM SPSS Statistics» версии 22.0 (IBM Corp., USA). Для сравнения количественных данных в двух независимых выборках использовался U-критерий Манна–Уитни. Для определения статистической значимости различий номинальных признаков использовали анализ таблиц сопряженности (критерий χ^2 Пирсона, а также двусторонний точный тест Фишера). Для анализа общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и медианы до прогрессирования заболевания использовались кривые выживаемости Каплана–Майера. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью Log-Rank test. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Частота выполнения расширенной комбинированной паллиативной га-стрэктомии по Ру (46 % и 34 %) и паллиативной гастрэктомии по Ру (54 % и 66 %) в основной и контрольной группах статистически не различалась ($\chi^2 = 9,056932$; $p = 0,33246$). Доля R0 – резекций достигнута у 24 (69 %) пациентов в основной группе, тогда как в контрольной – только у 9 (26 %), R1 – у 10 (29 %) и 21 (60 %) пациента, R2 – у 1 (3 %) и 5 (14 %) соответственно ($p=0,0012$). Следует отметить, что в основной группе преобладает доля R0 – резекции (69 %), против 26 % в контрольной группе, в связи с этим в контрольной группе рецидив в зоне эзофагоэнтэроанастомоза и в культе ДПК развивался чаще. По объемам лимфодиссекции в исследуемых группах имеются различия: в основной группе преобладает доля D2-лимфодиссекции 63 % (n=22), против 29 % (n= 10), при этом количество удаленных ЛУ варьировало от 20 до 43 (при рекомендованном минимуме в 16 ЛУ, необходимых для правильного определения

N-статуса). В контрольной группе большинству пациентов (71%; n=25) выполнена D1+ лимфодиссекция, против 31% (n=11) в основной группе ($\chi^2 = 11,94444$; p = 0,004).

В основной группе преобладала доля CC-0 score, данный объем выполнен у 69 % пациентов (n=24) в основной группе и лишь у 37 % (n=13) в контрольной; CC-1 score – 17 % (n=6) в основной и 26 % (n=9) в контрольной группе; CC-2 score – 6 % (n=2) в основной и 23 % (n=8) в контрольной группе; CC-3 score – 8 % (n=3) в основной и 14 % (n=5) в контрольной группе ($\chi^2 = 12,79$; p = 0,0017). Индекс перитонеального канцероматоза (PCI) являлся основным критерием для включения пациентов в клиническое исследование. В обеих группах преобладали пациенты с PCI (9–12), 14 (40 %) в основной и 17 (49 %) в контрольной группе. Доля PCI (5–8) составила 31 % (n=11) в основной и 37 % (n=13) в контрольной группе. В основной группе количество пациентов с PCI (0–4) было 10 (29 %), а в контрольной группе – 5 (14%) ($\chi^2 = 7,943$; p = 0,019). По развитию осложнений в послеоперационном периоде значимых различий в исследуемых группах не наблюдалось ($\chi^2=9,960361$; p=0,13).. В процессе проводимой послеоперационной химиотерапии в обеих группах осложнения носили кратковременный и обратимый характер.

Таким образом, в исследуемых группах нет статистически значимых различий по объемам циторедуктивного оперативного пособия, вариантам прорастания в соседние органы, и объемам расширенных комбинированных циторедуктивных операций и значениям PCI. Но различия в объеме лимфодиссекции, R-резекции и полноте циторедукции (CC Score) являются статистически значимыми. Сроки наблюдения за больными составили от 11 до 30,3 мес. В основной группе медиана времени до прогрессирования онкологического заболевания составила 14,9 с интерквартильным размахом (13,5–17,2) мес, а в группе контроля – 11,2 (10,3–11,6) мес. Медиана общей выживаемости в основной группе составила 17,9 с интерквартильным размахом (14,7–19,5) мес, в контрольной группе – 12,7 (11,3–13,1) мес (n=35) (p<0,001). Следует отметить, что в основной группе 11 пациентов находятся в процессе лечения без признаков прогрессирования (срок наблюдения составил от 13,2 до 30,3 мес.

Заключение

Разработанный способ циторедуктивного оперативного лечения с персонализированным назначением препаратов для системной и интраперитонеальной химиотерапии, при раке желудка IV стадии (с карциноматозом брюшины), на основании молекулярно-генетических характеристик опухоли позволяет улучшить показатели безрецидивной и общей выживаемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
2. *Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность)* / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. 252 с.
3. Хомяков В.М., Рябов А.Б., Болотина Л.В., Соболев Д.Д., Уткина А.Б., Кузнецова О.С. Лечение больных раком желудка с канцероматозом брюшины. Современный взгляд и перспективы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* 2017. Т. 6, № 6. С. 4–13.
4. *Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году*/ под редакцией А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2020. 239 с.
5. Ганцев Ш.Х., Забелин М.В., Ганцев К.Ш., Измаилов А.А., Кзыргалин Ш.Р. Перитонеальный канцероматоз: мировые научные школы и современное состояние вопроса. *Креативная хирургия и онкология.* 2021; 11(1):85–91. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2021-11-1-85-91>

ВАЖНОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ВЕРИФИКАЦИИ ОЧАГОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ В ЛЕГКИХ

А.А. Мох¹, Е.О. Родионов^{1,2}, С.В. Миллер², С.А. Тузиков^{1,2}, Д.В. Подолько²,
Т.В. Полищук²

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Россия, г. Томск, Россия¹

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

Актуальность. На современном уровне развития клинической онкологии вопрос морфологической диагностики остается многогранным. Как показывает практика, лучевые методы обследования не обладают достаточными специфическими признаками для проведения достоверной дифференциальной диагностики. Верификация очагового образования легкого, знание морфологической структуры имеют большое значение для выбора лечебной тактики и определения прогноза заболевания. **Цель исследования** – оценить важность инвазивных методов получения морфологического материала при обследовании больных с очаговыми образованиями легких. **Материал и методы.** В работе проанализированы данные 101 пациента с очаговыми образованиями легких и подозрением на метастатическое поражение из ранее установленного первичного злокачественного новообразования, находившегося на обследовании и лечении в торакальном отделении НИИО в 2007–2021 гг. Были выделены группы нозологических форм первичного очага. Проведен анализ компьютерных томограмм с оценкой наличия патологических включений в легких и плевре. Всем больным было рекомендовано хирургическое вмешательство с последующей морфологической верификацией полученного материала. **Результаты.** При анализе снимков компьютерной томограммы были выделены признаки, встречающиеся у большей части больных: шаровидная форма образования, четкие контуры, окружающий легочной рисунок не изменен. Данных изменений недостаточно для постановки точного диагноза, было принято решение о проведении хирургического вмешательства. Основной спектр выполняемых операций среди данной группы больных: у 65 – атипичная резекция, у 26 – лобэктомия, у 4 – пневмотомия и у 3 – диагностическая торакоскопия. У 28 пациентов послеоперационные осложнения относились преимущественно к I–II уровню по классификации TMM (Thoracic Morbidity and Mortality System). При плановом гистологическом исследовании удаленных препаратов установлено, что у 20 пациентов очаговые образования, трактованные как метастазы по данным компьютерных томограмм, оказались доброкачественными (туберкулома – у 5, гамартома – у 3, саркоидоз – у 1 и хронические неспецифические заболевания легких – у 11 больных). **Заключение.** Зачастую у пациентов с ранее установленным диагнозом злокачественного новообразования выявленные очаги в легких расцениваются как метастатическое поражение, поскольку ряд заболеваний органов грудной клетки имеет сходную томографическую семиотику. Следовательно, только морфологическая диагностика выявленных изменений позволяет определить верную тактику ведения больных.

Ключевые слова: очаговые образования легкого, метастатические поражения, морфологическая диагностика.

THE IMPORTANCE OF MORPHOLOGICAL VERIFICATION OF PULMONARY NODULES

A.A. Mokh¹, E.O. Rodionov^{1,2}, S.V. Miller², S.A. Tuzikov^{1,2}, D.V. Podolko², T.V. Polishchuk²

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute Tomsk NRMC, Tomsk, Russia²

Abstract

Background. At the current level of development of clinical oncology, the problem of morphological diagnostics remains multifaceted. As practice shows, the methods of radiation examination do not have sufficient specific features for truthful differential diagnosis. Verification of pulmonary nodules, knowledge of the morphological structure is of great importance for the choice of therapeutic tactics and determining the prognosis of the disease. **Material and methods.** The data of 101 patients with focal lung formations and suspected metastatic lesion from a previously established primary malignant neoplasm, who were examined and treated in the thoracic department of the Tomsk Cancer Research Institute in 2007-2021, were analyzed. Groups of nosological forms of the primary focus were identified. The analysis of computed tomograms with an assessment of the presence of pathological inclusions in the lungs and pleura was carried out. Surgical intervention with subsequent morphological verification of the obtained material was recommended to all patients. **Results.** When analyzing the CT scans, signs were identified that occur in most patients: a globular shape of the formation, clear contours, the surrounding pulmonary pattern has not been changed. These changes are not enough to make an accurate diagnosis, it was decided to carry out surgical intervention. The main range of operations performed among this group of patients: 65 – atypical resection, 26 - lobectomy, 4 - pneumotomy and 3 - diagnostic thoracoscopy. In 28 patients, postoperative complications mainly related to level I-II according to the TMM classification. During a planned histological examination of the removed preparations, it was found that in 20 patients, focal formations treated as metastases according to computed tomograms turned out to be benign (tuberculosis - in 5, hamartoma - in 3, sarcoidosis - in 1 and chronic nonspecific lung

diseases - in 11 patients). **Conclusion.** Often, in patients with a previously diagnosed malignant neoplasm, the detected foci in the lungs are regarded as a metastatic lesion, since a number of diseases of the chest organs have similar tomographic semiotics. Consequently, only the morphological diagnosis of the detected changes allows to determine the unerring tactics for managing patients.

Key words: pulmonary nodules, metastatic lesions, morphological diagnosis.

Актуальность. На современном уровне развития клинической онкологии вопрос морфологической диагностики остается многогранным. Как показывает практика, лучевые методы обследования не обладают достаточными специфическими признаками для проведения достоверной дифференциальной диагностики очаговых образований легких (ООЛ). Трудности точной верификации хорошо известны – чаще всего приходится сравнивать между периферическим раком, доброкачественными опухолями (гамартома и т.д.), туберкулезом, саркоидозом, метастатическим поражением легкого [1, 2]. При наличии в анамнезе злокачественного новообразования и выявлении в легких очаговых образований, описываемых по данным КТ как метастазы, в ряде случаев онкологические учреждения проводят лекарственную терапию без предварительного морфологического подтверждения злокачественного процесса. В настоящее время широкое развитие получает проведение хирургических инвазивных методов диагностики ООЛ. К ним относятся чрезбронхиальная биопсия легкого, трансторакальная биопсия, видеоторакоскопия, видеоассистированная мини-торакотомия или торакотомия [3]. Эти методы позволяют получить достаточное количество материала для верификации патологического процесса [4].

Цель исследования – оценить важность инвазивных методов получения морфологического материала при обследовании больных с очаговыми образованиями легких.

Материал и методы

Основу настоящей работы составили данные 101 пациента с очаговыми образованиями легких и подозрением на метастатическое поражение из ранее установленного первичного злокачественного новообразования, находившегося на обследовании и лечении в торакальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ в 2007–2021 гг.

Возраст больных составлял от 16 до 81 года. Преобладающее число пациентов (65 %) старше 50 лет; мужчин – 37, женщин – 64. Диаметр очагов в легких составил от 3 до 80 мм, средний диаметр – 23 мм. Локализация, размеры и количество образований приведены в табл. 1.

Были выделены следующие группы нозологических форм первичного очага: молочная железа (25), органы пищеварения (15), мочевые пути (14), саркома (12), органы дыхания и грудной клетки (9), женские половые органы (7), неуточненной локализации (6), органы головы и шеи (5), мужские половые органы (5), щитовидная железа (3). Проведен анализ компьютерных томограмм (КТ) с оценкой наличия патологических включений в легких и плевре, топографо-анатомическое расположение, форма, контуры, структура и размеры. Всем больным было рекомендовано хирургическое вмешательство с последующей морфологической верификацией полученного материала.

Таблица 1

Характеристика очаговых образований в легких

Показатель	Значение	
	абс.	%
Локализация очага:		
верхняя доля правого легкого	24	23,76
средняя доля	11	10,89
нижняя доля правого легкого	27	26,73
верхняя доля левого легкого	21	20,79
нижняя доля левого легкого	18	17,82
Количество:		
солитарный	25	24,75
множественные	76	75,25

Размер очага, мм:		
0-10	29	28,71
11-20	21	20,79
21-30	23	22,77
31-40	18	17,82
41-50	6	5,94
51-60	1	0,99
61-70	1	0,99
71-80	2	1,98

Результаты

При анализе снимков компьютерной томограммы были выделены признаки, встречающиеся у большей части больных: шаровидная форма образования, контуры четкие и ровные, окружающий легочной рисунок не изменен [5]. Данных изменений было недостаточно для постановки точного диагноза, было принято решение о проведении хирургического вмешательства. Основной спектр выполняемых операций среди данной группы больных: у 65 – атипичная резекция, у 26 – лобэктомия, у 4 – пневмотомия и у 3 – диагностическая торакоскопия. У 28 (27,72 %) пациентов констатированы послеоперационные осложнения, которые преимущественно относятся к I–II уровню по классификации ТММ (Thoracic Morbidity and Mortality System). Летальных исходов не отмечено.

При плановом гистологическом исследовании удаленных препаратов была проведена 100 % морфологическая верификация и установлено, что у 81 пациента подтвердился метастаз из первичного очага, у 20 пациентов образования, трактованные как метастазы по данным компьютерных томограмм, оказались доброкачественными. Распределение больных по морфологической структуре очаговых образований легких:

- Метастаз опухолей других локализаций – 81 (80,2 %);
- Туберкулома – 5 (4,95 %);
- Антракоз – 4 (3,96 %);
- Гамартома – 3 (2,97 %);
- Пневмофиброз – 3 (2,97 %);
- Амилоидоз – 1 (0,99 %);
- Саркоидоз – 1 (0,99 %);
- Хронический абсцесс – 1 (0,99 %);
- Интерстициальная пневмония – 1 (0,99 %);
- Лангергансоклеточный гистиоцитоз – 1 (0,99 %).

Заключение

Зачастую у пациентов с ранее установленным диагнозом злокачественного новообразования выявленные очаги в легких, особенно множественного характера, расцениваются как метастатическое поражение, поскольку ряд заболеваний органов грудной клетки имеет сходную томографическую семиотику. Данная тактика влечет за собой, как правило, назначение противоопухолевого лечения. В результате проведенного исследования выявлено, что у всех больных была 100 % послеоперационная верификация полученного материала, а 19,8 % пациентов смогли избежать назначения токсической терапии.

Следовательно, только морфологическая верификация выявленных изменений в легких позволяет установить верный диагноз и назначить правильную лечебную тактику. С целью дифференциальной диагностики в последние годы широко используют трансторакальную биопсию. При всей своей простоте данный метод не всегда может быть использован ввиду определенных трудностей, которые возникают в случае малых размеров образований, при недоступном топографо-анатомическом расположении, наличии распадов или полостей. Кроме того, не все медицинские учреждения имеют в своем распоряжении специализированные, хорошо оснащенные отделения торакальной хирургии. В связи с этим альтернативой трансторакальной биопсии является диагностическая торакоскопия, во время которой возможно получить достаточный объем опухолевого материала для последующей морфологической верификации и при необходимости проведения молекулярно-генетического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Величко С.А., Фролова И.Г., Окунев В.В. Трансторакальная пункция в современной диагностике периферического рака легкого // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 2 (приложение). С. 16-17.
 2. Миллер С.В., Фролова И.Г., Величко С.А., Тузиков С.А., Байдала П.Г., Полищук Т.В., Родионов Е.О., Манибадаров Ж.Н. Одиночные округлые образования в легком, тактика ведения // Сборник научных трудов: материалы II съезда врачей лучевой

диагностики Сибирского федерального округа «Достижения современной лучевой диагностики в клинической практике» (27–28 сентября 2012). Бюллетень сибирской медицины. 2012. № 5 (приложение). С. 80-82.

3. Чиссов В.И., Трахтенберг А.Х., Пикин О.В., Паришин В.Д. Метастатические опухоли легких: [руководство]. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. С. 13-44.

4. Котив Б.Н., Чуприна А.П., Ясюченя Д.А., Мельник Д.М. Видеоторакокопия в дифференциальной диагностике и лечении периферических образований легких // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. 2012. Т. 7, № 2. С. 18-21.

5. Седых С.А., Адасько Е.В. Сравнительная характеристика рентгенологических и компьютерно-томографических данных в диагностике легочных метастазов // Материалы V Всероссийского съезда онкологов. Ростов н/Д, 2000. Т. 1. С. 381-383.

МИКРОРНК С ИЗМЕНЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ПРИ МЕЛАНОМЕ – РЕГУЛЯТОРЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ МЕЛАНОЦИТОВ

Н.В. Палкина, Т.Г. Рукша

ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Аннотация

МикроРНК – короткие некодирующие молекулы РНК, обладающие регуляторными свойствами на экспрессию генов клетки, что вызывает интерес в отношении использования их свойств с целью возможности регуляции канцерогенеза. Проведен сравнительный анализ полного экспрессионного профиля микроРНК в клетках меланомы и невусов и установлены функции некоторых микроРНК с измененной экспрессией при меланоме, потенциально связанных с канцерогенезом, с использованием трансфицируемых в геном клеток модуляторов экспрессии данных микроРНК (ингибиторов и имитаторов молекул) в отношении регуляции ключевых параметров опухолевой прогрессии – пролиферации/жизнеспособности, апоптотической гибели, миграции, инвазии, клоногенности на клетках двух различных линий меланомы кожи *in vitro*. По результатам исследования определены роли и установлены механизмы функционирования выявленных микроРНК с дифференциальной экспрессией при меланоме кожи miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065, что дает новые представления об аспектах патогенеза меланомы и характеризует данные молекулы в качестве перспективных мишеней для разработки новых диагностических и терапевтических подходов в качестве новых аспектов патогенеза меланомы кожи, и является предпосылкой разработки новых способов химиотерапевтического воздействия с целью лечения диссеминированной меланомы кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, микрочипирование, микроРНК, опухолевая прогрессия.

MICRORNAs WITH ALTERED EXPRESSION IN MELANOMA AS REGULATORS OF TUMOR PROGRESSION IN MALIGNANT MELANOCYTES

N.V. Palkina, T.G. Ruksha

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

Annotation

MicroRNAs are short noncoding RNA molecules that have regulatory properties for cell gene expression, which is of interest in relation to the use of their properties in order to be able to regulate carcinogenesis. A comparative analysis of the full expression profile of miRNAs in melanoma and nevus cells was carried out and the functions of some microRNAs with altered expression in melanoma, potentially associated with carcinogenesis, were established using modulators of the expression of these microRNAs (inhibitors and imitators of molecules) transfected into the cell genome in relation to the regulation of key parameters of tumor progression. – proliferation/viability, apoptotic death, migration, invasion, clonogenicity on cells of two different skin melanoma lines *in vitro*. Based on the results of the study, the roles and mechanisms of functioning of the identified miRNAs with differential expression in skin melanoma miR-106a, miR-4286, miR-204 and miR-3065 were determined, which gives new insights into aspects of the pathogenesis of melanoma and characterizes these molecules as promising targets for development of new diagnostic and therapeutic approaches as new

aspects of the pathogenesis of skin melanoma, and is a prerequisite for the development of new methods of chemotherapeutic exposure to treat disseminated skin melanoma.

Key words. Melanoma, microarray, microRNA, tumor progression.

Актуальность. Меланома кожи (МК) – агрессивное злокачественное новообразование с самым высоким показателем смертности среди дерматологических онкозаболеваний и отсутствием эффективной терапии диссеминированных форм [1]. Частота развития меланомы увеличивается во многих странах мира среди лиц со светлым типом кожи [2]. Данные факты говорят о необходимости разработки и создания новых способов лечения данного заболевания, а также совершенствования дифференциально-диагностических подходов. В этом аспекте вызывают интерес недавно открытые молекулы микроРНК, являющиеся высокостабильными консервативными соединениями длиной от 19 до 24 нуклеотидов и играющие важную роль в регуляции выживаемости клеток, пролиферации, дифференцировке, посредством посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, вызывая деградацию или изменяя стабильность трансляционной эффективности мРНК, благодаря спариванию оснований с комплементарными участками на мРНК-мишени [3]. На сегодняшний день идентифицировано более 2600 видов микроРНК у человека, эти молекулы обладают тканеспецифичностью и могут одновременно регулировать экспрессию до 90 % генома человека, но функции микроРНК и их мишени являются объектом дальнейшего уточнения [4]. Сообщается, что соотношение уровней различных микроРНК (профиль микроРНК) в клетках изменяется в процессе малигнизации, становясь специфичным для отдельного заболевания [5].

Цель исследования – провести сравнительный анализ полного экспрессионного профиля микроРНК в клетках меланомы кожи и доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи (невусов) и установить функции микроРНК с измененным уровнем экспрессии при меланоме с использованием трансфицируемых в геном клеток модуляторов экспрессии микроРНК (ингибиторов и имитаторов молекул) в отношении регуляции ключевых параметров опухолевой прогрессии – пролиферации/жизнеспособности, апоптотической гибели, миграции, инвазии, клоногенности на клетках различных линий меланомы кожи *in vitro*.

Материал и методы

Объект исследования – биоптаты меланоцитарных новообразований кожи нативные и заключенные в парафин (FFPE) (меланома кожи $n=45$, невусы $n=22$), клеточные культуры человеческой меланомы линий BRO и SK-MEL1. Методы: анализ окрашенных гематоксилином-эозином гистологических срезов, макродиссекция, культивирование клеток, трансфекция, проточная цитометрия, МТТ-тест, оценка миграции и инвазии клеток при помощи камер, оценка клоногенности клеток на основе спектрофотометрии, микроэррей, ПЦР-РВ, биоинформатический анализ, статистические методы.

Результаты

По результатам полного экспрессионного анализа FFPE-образцов МК ($n=16$) и невусов ($n=3$) выявлены 1171 из 2578 зрелых микроРНК, экспрессия которых в образцах МК различается в 2 и более раз ($p<0,05$). Профилирование микроРНК нативных образцов МК ($n=7$) и невусов ($n=6$) выявило 62 вида зрелых микроРНК, уровни которых изменены в МК в 2 и более раз ($p<0,05$). В качестве дифференцированно-экспрессируемых микроРНК, потенциально связанных с канцерогенезом по результатам анализа литературных данных и биоинформатического анализа сигнальных путей и генов-мишеней, были определены микроРНК miR-106a, miR-4286, и miR-3065, имеющие повышенный уровень экспрессии в клетках МК в 2,88 раза ($p=0,0126$), в 17,79 раза ($p=0,0002$) и 5,03 раза ($p=0,0176$) соответственно, и микроРНК miR-204, которая по данным микроэррея была снижена в клетках МК в 3,56 раза ($p=0,0141$).

По результатам модуляции уровней исследуемых микроРНК в клетках меланомы кожи BRO и SK-MEL1 после трансфекции в геном опухолевых клеток исследуемых микроРНК установлено, что miR-4286 в клетках МК выступает в качестве активатора пролиферации/жизнеспособности, так как установлен антипролиферативный эффект после трансфекции в клетки ее ингибитора, а микроРНК miR-204 и miR-3065 в отношении регуляции пролиферации/жизнеспособности клеток функционируют однонаправленно, проявляя плейотропные свойства и имея антипролиферативные эффекты вне зависимости от направления модуляции уровней после трансфекции ингибиторов и имитаторов данных молекул, а функционирование miR-106a с регуляцией процессов пролиферации в клетках МК не связано.

МикроРНК miR-4286 снижает процессы апоптотической гибели клеток МК, так как установлено, что ее ингибирование в клетках меланомы BRO увеличивает долю клеток,

находящихся в апоптозе/некрозе в 2,64 раза ($p=0,0495$), но не влияет на долю клеток, находящихся в преапоптозе, а в клетках меланомы SK-MEL1 не оказывает влияния на процентное соотношение клеток, находящихся на различных стадиях апоптотической гибели.

Функционирование микроРНК miR-204, miR-3065 и miR-106a в клетках МК не затрагивает регуляцию процессов апоптотической гибели, так как выявлено, что как ингибирование микроРНК miR-3065 и miR-204, так и увеличение экспрессии данных молекул при помощи трансфекции имитатора в клетках меланомы BRO и SK-MEL1 не оказывают влияния на процессы апоптотической гибели, однако увеличение экспрессии микроРНК miR-204 приводит к небольшому снижению доли живых клеток – на 4,50 % ($p=0,0495$).

Ингибирование микроРНК miR-106a, а также модуляция уровней экспрессии микроРНК miR-106a, miR-204 и miR-3065 не оказывают влияния на апоптоз клеток МК.

МикроРНК miR-3065 в клетках МК сдерживает миграцию клеток, но имеет плейотропные свойства в отношении инвазии, приводя к ее усилению вне зависимости от направления модуляции уровней после трансфекции ингибитора и имитатора, так как установлено, что ингибирование miR-3065 увеличивает миграционную активность клеток меланомы BRO в 1,45 раза ($p=0,0495$), а трансфекция имитатора miR-3065 приводит к противоположному эффекту – снижению уровня миграции клеток в 1,20 раза ($p=0,0495$). Как ингибирование, так и трансфекция имитатора miR-3065 в клетках меланомы BRO приводит к увеличению уровней инвазии клеток в 1,30 и 1,44 раза соответственно ($p=0,0495$). В отношении регуляции процесса миграции клеток выявлен однонаправленный функциональный эффект miR-204 с miR-3065, заключающийся в способности miR-204 снижать миграцию клеток МК, однако, в отличие от miR-3065, miR-204 не является регулятором процессов инвазии клеток МК, так как получено, что ингибирование miR-204 приводит к усилению миграции клеток в 1,55 раза ($p=0,0495$), но не влияет на уровень инвазии клеток. Трансфекция имитатора miR-204 в клетки меланомы BRO не оказывает влияния на процессы миграции и инвазии клеток.

МикроРНК miR-106a усиливает инвазивную способность клеток МК, но не является регулятором процессов миграции, так как получено, что ингибирование miR-106a не приводит к изменению уровня миграции клеток меланомы BRO, однако усиливает их способность к инвазии в 1,30 раза ($p=0,0495$).

Функционирование miR-4286 в клетках МК не связано с регуляцией миграционной и инвазивной способности клеток, так как ингибирование данной микроРНК не оказывает влияния на показатели миграции и инвазии клеток меланомы BRO.

В клетках МК все исследуемые микроРНК способствуют снижению клоногенности клеток, так как установлено, что ингибирование miR-106a увеличивает способность клеток меланомы BRO образовывать колонии в 1,15 раза ($p=0,0495$), а ингибирование miR-4286 приводит к усилению клоногенности клеток в 1,19 раза ($p=0,0495$).

Ингибирование miR-3065 не оказывает влияния на клоногенность клеток меланомы BRO, а трансфекция имитатора данной микроРНК приводит к снижению количества формируемых колоний в 1,17 раза по сравнению с контролем ($p=0,0495$).

Увеличение уровня miR-204 в клетках меланомы BRO снижает клоногенность клеток в 1,20 раза в сравнении с контролем ($p=0,0495$), в то же время ингибирование данной микроРНК не влияет на этот показатель.

Таким образом, miR-106a в клетках МК является онкосупрессором и подавляет процессы инвазии и клоногенности, miR-4286 проявляет как онкогенные свойства (способствует увеличению пролиферации/жизнеспособности клеток и снижению апоптоза), так и онкосупрессивные (подавляет клоногенность клеток). МикроРНК miR-3065 в клетках МК функционирует преимущественно в качестве онкосупрессора (подавляет пролиферацию/жизнеспособность, миграцию и клоногенность), но при этом обладает и онкогенными свойствами (усиливает инвазию клеток). А микроРНК miR-204 функционирует однонаправленно с микроРНК miR-3065 в клетках МК, проявляя онкосупрессивные свойства (подавляет пролиферацию/жизнеспособность, миграцию и клоногенность клеток).

Заключение

По результатам исследования определены роли и установлены механизмы функционирования выявленных микроРНК с дифференциальной экспрессией при меланоме кожи miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065, что дает новые представления об аспектах патогенеза меланомы и характеризует данные молекулы в качестве перспективных мишеней для разработки новых диагностических и терапевтических подходов в качестве новых аспектов патогенеза меланомы кожи, что является предпосылкой разработки новых способов химиотерапевтического воздействия с целью лечения диссеминированной меланомы кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Имянитов Е.Н.* Эпидемиология и биология опухолей кожи // Практическая онкология. 2012. Т. 13, № 2. С. 61–68.
2. *Apalla Z., Lallas A., Sotiriou E. et al.* Epidemiological trends in skin cancer // *Dermatol. Pract. Concept.* 2017. V.7, № 2. P. 1–6.
3. *Bartel D. P.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* 2004. Vol. 116, № 2. P. 281–297.
4. *Si W., Shen J., Zheng H. et al.* The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance // *Clin Epigenet.* 2019. V.11, № 1. P. 25.
5. *Lu J., Getz G., Miska E. A., et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature.* 2005 V.435, № 7043. P. 834–838.

ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ТРАКЦИОННЫМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ВОЗВРАТНЫХ ГОРТАННЫХ НЕРВОВ ПРИ ОПЕРАЦИЯХ НА ОРГАНАХ ШЕИ

К.А. Петухов, С.В. Зинченко

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия.

Аннотация

Проблема реабилитации пациентов с тракционными повреждениями возвратного гортанного нерва (ВГН), возникшими в ходе операции на органах шеи, на сегодняшний день не решена. Внедренный 10 лет назад нейромониторинг возвратных гортанных нервов позволил сократить количество полного пересечения нервов, но количество механических сублетальных повреждений (тракционных) не уменьшилось. По сути, роль нейромониторинга при сохранении непрерывности самого нерва свелась к качественной оценке: есть или нет перерыв. Количественные изменения, формирующие как раз 30–60 % нарушений функции гортани после операции, не учитываются. До настоящего времени в России и мире не предложено эффективных методик количественной оценки мониторинга функции ВГН, не определены пороговые значения показаний монитора, роль нейромониторинга сводится лишь к визуализации нервов, при детекции повреждений превентивные мероприятия не выполняются. Нейромонитор «Нейрософт» с многоканальными отведениями позволяет провести количественную оценку повреждений, электрофизиологическое исследование мышц гортани в до- и послеоперационном периоде.

Ключевые слова: возвратный гортанный нерв, паралич гортани, нейропротекция, интраоперационный нейромониторинг, органы шеи.

INTRAOPERATIVE NEUROPROTECTION IN PATIENTS WITH TRACTION INJURIES OF RECURRENT LARYNGEAL NERVES DURING OPERATIONS ON NECK ORGANS

K.A. Petukhov, S.V. Zinchenko

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Annotation

The problem of rehabilitation of patients with traction injuries of the recurrent laryngeal nerve (RLN) that occurred during surgery on the neck organs has not been solved to date. Neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves introduced 10 years ago has reduced the number of complete nerve intersections, but the number of mechanical sublethal injuries (traction) has not decreased. In fact, the role of neuromonitoring while maintaining the continuity of the nerve itself has been reduced to a qualitative assessment: is there a break or not. Quantitative changes that form just 30-60% of laryngeal dysfunction after surgery are not performed. To date, no effective methods have been proposed in Russia and the world for quantifying the monitoring of the function of the RLN, threshold values of monitor readings have not been determined, the role of neuromonitoring is reduced only to the visualization of nerves, preventive measures are not carried out when detecting damage. The Neurosoft neuromonitor with multichannel leads allows for a quantitative assessment of damage, electrophysiological examination of the laryngeal muscles in the pre- and postoperative period.

Key words: recurrent laryngeal nerve, laryngeal paralysis, neuroprotection, intraoperative neuromonitoring, neck organs.

Актуальность. Операции, проводимые на щитовидной и паращитовидных железах, являются одними из наиболее распространенных в мире и в то же время технически сложными видами хирургических вмешательств. Это связано с тесным взаимоотношением железы с жизненно важными структурами и вариантами их топографического расположения. Особое место среди возможных осложнений, развивающихся после этих операций, занимает повреждение возвратного гортанного нерва (ВГН). Потеря функции возвратного гортанного нерва (ВГН) во время операции на щитовидной или паращитовидной железах, несмотря на макроскопически интактный нерв, представляет собой проблему, которая приводит к нарушениям фонации и в ряде случаев к стойкой инвалидизации пациентов [1]. Травма ВГН может сопровождаться нарушением не только фонации, но и дыхания, глотания, появлением выраженного кашлевого рефлекса [2].

Интраоперационный нейромониторинг ВГН во время операций на органах шеи помогает в режиме реального времени с помощью постоянного контроля провести оценку сохранности функции гортанных нервов [3]. Данный метод исследования является безопасным, эффективным, надежным и легко выполним для профилактики послеоперационного паралича гортани [4]. Используя интраоперационный нейромониторинг ВГН, можно провести качественную (но не количественную) оценку поврежденного нерва.

По сути, роль нейромониторинга при сохранении непрерывности самого нерва свелась к качественной оценке: есть или нет перерыв. Количественные изменения, формирующие как раз 30–60% нарушений функции гортани после операции, не учитываются. До настоящего времени в России и мире не предложено эффективных методик количественной оценки мониторинга функции ВГН, не определены пороговые значения показаний монитора, роль нейромониторинга сводится лишь к визуализации нервов, при детекции повреждений превентивные мероприятия не выполняются [5,6].

Цель исследования – количественная оценка повреждений ВГН в ходе операции на щитовидной и паращитовидных железах с использованием интраоперационного нейромониторинга для определения необходимости проведения послеоперационной реабилитации и нейропротекции у данной категории пациентов.

Материал и методы

В нашем исследовании мы использовали нейромонитор «Нейрософт» с многоканальными отведениями и эндоларингеальные активные электроды. На нейромониторе происходит регистрация прохождения импульса по возвратному гортанному нерву. На основании полученных данных формируем информацию о характере и тяжести повреждения, что необходимо для решения о проведении послеоперационной реабилитации и нейропротекции.

Результаты

Нами проведено пилотное исследование на 10 пациентах, которым была выполнена тиреоидэктомия до поводу диффузного токсического зоба. Всем пациентам проводился нейромониторинг, используя сигнальное отведение от мышц кисти в качестве детектора глубины наркоза и миорелаксации. Амплитуда ответа от мышц кисти была одинаковой. У 7 пациентов амплитуда сигнала от активного гортанного электрода не менялась на протяжении всей операции, у них по результатам общего осмотра и прямой ларингоскопии после операции не было нарушений фонации и иннервации гортани. У всех пациентов отмечено снижение амплитуды импульса после удаления препарата 80, 77 и 82 % по отношению к кистевому электроду. После операции у этих пациентов отмечены дисфония и ограничения подвижности элементов гортани, что явилось основанием для проведения нейротропной терапии в послеоперационном периоде.

Заключение

Вопросы диагностики тракционных повреждений возвратного гортанного нерва во время проведения операции на органах шеи на сегодняшний день являются актуальными. Предлагаемая нами методика ранней детекции повреждений нерва с использованием нейромониторинга и последующим проведением нейропротекции и реабилитации пациентов показала свою эффективность. Работы в данном направлении продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Per Mattsson, Jonas Hydman, Mikael Svensson. Recovery of laryngeal function after intraoperative injury to the recurrent laryngeal nerve // *Gland Surgery*. 2015. 4(1): P.27-P.35 doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2015.01.10
2. Харнас С.С., Ипполитов Л.И., Насимов Б.Т., Вычужанин Д.В. Профилактика повреждения возвратных гортанных нервов при операциях на щитовидной железе // *Врач*. 2015. Т. 5 С. 22-25
3. Prades J-M., Lelonge Y., Farizon B., Dubois M.-D., Gavid M. Intraoperative neuromonitoring by vagus nerve stimulation in thyroid surgery: Clinical assessment of recurrent and superior laryngeal nerves // *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. 2020. 137(3): P.227-P. 230 doi: 10.1016/j.anorl.2020.04.005

4. Pietro Giorgio Calò, Fabio Medas, Enrico Erdas, Maria Rita Pittau, Roberto Demontis, Giuseppe Pisano, Angelo Nicolosi. Role of intraoperative neuromonitoring of recurrent laryngeal nerves in the outcomes of surgery for thyroid cancer // International journal of surgery. 2014 P.213-P.217. doi: 10.1016/j.ijso.2014.05.003
5. Linyi Peng, Zhuqing Jia, Xinhua Yin, Xin Zhang, Yanan Liu, Ping Chen, Kangtao Ma, Chunyan Zhou. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // Stem Cells and Development. 2008. 17(4): P.761-P.773. doi: 10.1089/scd.2007.0217
6. Summa P. G. di, Kingham P. J., Raffoul W., Wiberg M., Terenghi G., Kalbermatten D. F. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration // Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2010. 63(9): P.1544-P.1552. doi: 10.1016/j.bjps.2009.09.012

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD163 НА МОНОЦИТАХ КРОВИ И МАКРОФАГАХ ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Е.А. Простакишина¹, П.С. Ямщиков¹, А.А. Фролова^{1,2}, М.А. Ракина¹,
М.Р. Патышева^{1,2}, И.В. Ларионова^{1,2,3}**

НИ Томский государственный университет, Россия, г. Томск¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²
Сибирский государственный медицинский университет, Россия, г. Томск³

Аннотация

Циркулирующие моноциты являются основным источником опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ). Известно, что при раке молочной железы (РМЖ) ОАМ, основным маркером которых считается CD163+, поддерживают рост первичной опухоли и ее метастазирование. Кроме того, на основании экспериментальных данных показано, что слияние CD163+ ОАМ и раковых клеток, происходящее в солидных опухолях, может играть важную роль в клинической прогрессии РМЖ [1]. Неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) является стандартным методом для лечения безметастатической формы РМЖ и оптимальной моделью для изучения феномена взаимодействия иммунной системы и цитостатического лечения. **Цель** – характеристика содержания CD163+ моноцитов в периферической крови, а также количественное содержание CD163+ ОАМ в опухоли до и после проведения НАХТ. Было обнаружено, что экспрессия CD163 в минорных субпопуляциях CD14-CD16+ и CD14+CD16+ моноцитов было отличительным признаком у пациенток с РМЖ. Так, 99,08 % CD14-CD16+CD163+ клеток наблюдалось в группе больных против 60,00 % у здоровых женщин ($p=0,039$) и 98,08 % CD14+CD16+CD163+ при РМЖ против 86,96 % у здоровых ($p=0,049$). На фоне того, что системное влияние опухоли на моноциты крови проявлялось на уровне транскриптома этих клеток, экспрессия гена CD163 была повышена в группе РМЖ и, тем самым, коррелировала с результатом анализа проточной цитометрии. Анализ с помощью количественной иммуногистохимии и иммунофлюоресцентный анализ с помощью конфокальной микроскопии показали, что значительная часть моноцитов CD163+ привлекается в опухоль после проведения НАХТ. Таким образом, CD163+ моноциты вовлекаются в патогенез безметастатического РМЖ, в том числе и на этапах химиотерапевтического лечения, что показывает их диагностическую и терапевтическую ценность.

Ключевые слова: моноциты, опухолеассоциированные макрофаги, CD163, РНК-секвенирование, рак молочной железы.

CD163 EXPRESSION ON BLOOD MONOCYTES AND TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGES IN BREAST CANCER

**E.A. Prostakishina¹, P.S. Yamschikov¹, A.A. Frolova^{1,2}, M.A. Rakina¹,
M.R. Patysheva^{1,2}, I.V. Larionova^{1,2,3}**

National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk¹
Cancer Research Institute Tomsk NRMC, Russia, Tomsk²
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk³

Abstract

Circulating monocytes serve as a principal source of long-lived tumor infiltrating cells such as tumor-associated macrophages (TAM). It is known that CD163+ TAM support the growth of the primary tumor and metastasis in

breast cancer (BC). In addition, it has been shown that the fusion of CD163+ expressing TAM and cancer cells occurs in solid tumors and may play an important role in the clinical progression of the tumor [1]. Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is a standard method for the treatment of early-stage breast cancer and optimal model for studying phenomenon of interaction between immune system and cytostatic treatment. The aim of this research was to characterize the content of CD163+ monocytes in peripheral blood, as well as the quantitative content of CD163+ TAM in the tumor before and after NAC. It was found that the content of CD163 on the minor subpopulations such as CD14-CD16+ and CD14+CD16+ monocytes was a hallmark in patients with breast cancer. Thus, 99.08% of CD14-CD16+CD163+ cells were observed in the group of patients versus 60.00% in healthy women ($p = 0.039$) and 98.08% of CD14+CD16+CD163+ in breast cancer versus 86.96% in healthy women ($p = 0.049$). Against the background of the fact that the systemic effect of the tumor on blood monocytes was manifested at the level of the transcriptome of these cells, the expression of the CD163 gene was increased in the breast cancer group and, thus, correlated with the result of the analysis of flow cytometry. Analysis by quantitative immunohistochemistry and immunofluorescence analysis by confocal microscopy showed that a significant proportion of CD163+ monocytes were recruited into the tumor after NAC. Thus, CD163+ monocytes are involved in the pathogenesis of non-metastatic breast cancer, including at the stages of chemotherapy treatment, which shows their diagnostic and therapeutic value.

Key words: monocytes, tumor-associated macrophages, CD163, RNA-seq, breast cancer.

Актуальность. Рак молочной железы (РМЖ) занимает одно из первых мест среди злокачественных заболеваний у женщин во всем мире, при этом повсеместно диагностируется более одного миллиона новых случаев каждый год [2]. В качестве системного лечения РМЖ перед хирургическим этапом лечения используют неoadъювантную химиотерапию (НАХТ), которую применяют для снижения объема хирургического вмешательства и уменьшения послеоперационных осложнений. Известно, что эффективный ответ на НАХТ хорошо коррелирует с более продолжительной общей выживаемостью [3]. Однако клетки врожденного иммунитета, в особенности клетки моноцитарно-макрофагальной системы – опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ), могут в процессе химиотерапии как взаимодействовать с иммунной системой, так и блокировать ее эффекты [4]. Была также продемонстрирована прямая корреляция между большим количеством ОАМ и худшим прогнозом и/или низкой выживаемостью пациенток с раком молочной железы [2,5]. Значительная часть ОАМ происходит из циркулирующих моноцитов, которые привлекаются в опухоль и под влиянием внутриопухолевых факторов затем программируются в клетки, либо способствующие опухолевой прогрессии, либо ей препятствующие.

Доподлинно известно, что общее увеличение циркулирующих моноцитов коррелирует с плохим клиническим исходом колоректального рака и рака молочной железы [1]. Поскольку популяция моноцитов крови неоднородна, то разные субпопуляции могут неодинаково реагировать на наличие опухоли, в том числе различно взаимодействовать с факторами микроокружения опухоли, тем самым влияя на эффективность лечения. Таким образом, данные субпопуляции моноцитов могут выступать в качестве предшественников опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ) с проопухолевой активностью и способны рекрутировать другие моноциты крови в опухолевую ткань с последующей их дифференцировкой в ОАМ [6]. Несмотря на то, что исследован механизм снижения эффективности химиотерапии при помощи ОАМ, информация о роли моноцитов как регуляторов ответа опухоли на химиотерапевтические агенты крайне ограничена [7].

На данный момент предполагается, что фенотип макрофагов в раковых клетках, определяемых экспрессией маркера CD163, обусловлен слиянием CD163+ ОАМ и раковых клеток [1,8]. Экспериментальные данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают, что слияние этих клеток происходит в солидных опухолях и может играть важную роль в клинической прогрессии опухоли [8]. Кроме того, было показано, что слияние раковых клеток способствует гетерогенности опухоли, создавая подмножества опухолевых клеток с пониженной восприимчивостью к гормональной терапии и химиотерапии [1].

Цель исследования – характеристика содержания CD163+ моноцитов в периферической крови, а также содержание CD163+ ОАМ в опухоли до и после проведенной НАХТ.

Материал и методы

Для каждого метода исследования была выбрана определенная когорта людей, включающая пациенток с РМЖ и здоровых женщин. Так, для проточной цитометрии эта когорта включала 38 пациенток и 17 здоровых женщин. Для РНК секвенирования были исследованы моноциты пациенток с РМЖ ($n=9$) и здоровых женщины ($n=7$); а для иммуногистохимического исследования – когорта из 122 пациенток с инвазивной карциномой молочной

железы, разделенная на две группы: не получавшие НАХТ (N=26) и подвергавшиеся НАХТ (N=96).

В качестве материала для РНК секвенирования и многоцветной проточной цитометрии использовалась цельная кровь, из которой были выделены мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и моноциты. Для иммуногистохимического (ИГХ) и иммунофлюоресцентного (ИФ) анализа – фиксированные формалином и залитые парафином срезы тканей от пациенток с РМЖ.

Массовое параллельное секвенирование транскриптома моноцитов проводилось на платформе NextSeq 550, Illumina. Для ИГХ и ИФ срезы были подготовлены и окрашены согласно протоколу и проанализированы с помощью световой и конфокальной микроскопии соответственно.

Результаты

С помощью анализа циркулирующих субпопуляций моноцитов с помощью проточной цитометрии в соответствии с экспрессией CD14 и CD16 были идентифицированы моноциты классической (CD14+CD16-), промежуточной (CD14+CD16+) и неклассической субпопуляций (CD14-CD16+). При этом у пациенток с РМЖ и здоровых женщин наблюдалось сходное распределение этих маркеров в субпопуляциях. Для CD14+CD16- 86,12 % (83,64–91,25 %) у здоровых женщин против 92,78 % (83,60–98,97%) пациенток с РМЖ; для CD14+CD16+ 3,68 % (2,72–4,8 %) у здоровых женщин против 2,56 % (1,44–5,60 %) пациенток с РМЖ и для CD14-CD16+ –2,70 % (1,54–11,64%) у здоровых против 5,61 % (1,23–8,1 %) пациенток с РМЖ. Анализ содержания клеток с экспрессией CD163 в этих субпопуляциях позволил обнаружить более высокий процент CD163+ клеток в группе с РМЖ в подмножествах CD14+CD16+: 98,08% (86,40–100,00 %) у пациенток против 86,96 % (77,33–93,02 %) у здоровых женщин (p=0,049) и CD14-CD16+: 99,08 % (83,47–99,99%) у пациенток против 60,00 % (41,06-91,3%) у здоровых (p=0,039).

Далее для изучения особенностей транскрипционного программирования циркулирующих моноцитов под влиянием карциномы молочной железы было применено массовое параллельное РНК-секвенирование моноцитов CD14+ пациенток и здоровых женщин. Анализ дифференциальной экспрессии (DEA) моноцитов пациенток с РМЖ по сравнению с моноцитами здоровых женщин выявил 235 активируемых и 121 поздравляющийся ген в моноцитах РМЖ с $\lg2FC \geq \pm 0,5$ и $p\text{-adj} \leq 0,05$, а последующий анализ главных компонент (PCA) и иерархическая кластеризация показали выраженные отличия транскриптома моноцитов здоровых женщин от транскриптома пациенток с РМЖ. При этом определённая с помощью РНК-секвенирования экспрессия CD163 коррелировала с результатами проточной цитометрии – уровень мРНК CD163 был повышен в группе РМЖ с $\lg2FC = 0,54$ и $p\text{-adj} = 0,036$.

Для определения влияния НАХТ на содержание CD163+ макрофагов в опухолевой ткани были использованы срезы парафиновых блоков пациенток с НАХТ и без НАХТ. В результате количество CD163+ клеток в ткани опухоли был выше у пациенток, получавших НАХТЮ, – 14,06 % (10,0(5,0–20,0 %)), по сравнению с пациентками, не получивших лечения, – 8,92 % (1,0(1,0–10,0 %)) (p = 0,014). Для ответа на вопрос о влиянии НАХТ на накопление CD163+ моноцитов в ткани РМЖ был проведен иммунофлюоресцентный анализ с помощью конфокальной микроскопии. Было продемонстрировано, что CD163 преимущественно экспрессируется на макрофагах, происходящих из моноцитов CD14+CD68+, которые проникают в опухолевую ткань в отличие от CD14-CD68+. По результатам обоих исследований можно сделать вывод, что НАХТ стимулирует привлечение моноцитов CD163+ в опухоль молочной железы.

Заключение

Полученные данные в результате проточной цитометрии и РНК- секвенирования позволили количественно охарактеризовать содержание CD163+ моноцитов в периферической крови. В большинстве своем высокая экспрессия CD163 наблюдалась на минорных субпопуляциях CD14-CD16+ и CD14+CD16+ моноцитов в группе пациенток с РМЖ. Дальнейший анализ с помощью количественной иммуногистохимии и иммунофлюоресцентный анализ с помощью конфокальной микроскопии продемонстрировали, что значительная часть моноцитов CD163+ привлекается в опухоль уже после проведения НАХТ. Таким образом, CD163+ моноциты вовлекаются в патогенез безметастатического РМЖ, в том числе и на этапах химиотерапевтического лечения, что раскрывает их диагностическую и терапевтическую ценность.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-25-00435.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garvin S., Oda H., Arnesson L.-G., Lindström A., Shabo
2. I. Tumor cell expression of CD163 is associated to postoperative radiotherapy and poor prognosis in patients with breast cancer treated with breast-conserving surgery// *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018. Vol. 144, №7. P. 1253–1263.
3. Volodko N., Gutor T., Petronchak O. et al. Low infiltration of tumor-associated macrophages in high c-Myb-expressing breast tumors// *Sci Rep.* 2019. Vol. 9. P. 1-9.
4. Asaoka M., Gandhi S., Ishikawa T., & Takabe K. Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Past, Present, and Future// *Breast Cancer: Basic and Clinical Research.* 2020. Vol. 14. P. 1-8.
5. Larionova I., Kazakova E., Patysheva M., Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages// *Cancers.* 2020. Vol. 12. №6. P. 1-40.
6. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte Vol. Coordinated Regulation of Myeloid Cells by Tumours// *Nat Rev Immunol.* 2012. Vol. 12. №4. P. 253-268.
7. Olingy C.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte Heterogeneity and Functions in Cancer// *J Leukoc Biol.* 2019. Vol. 106. №2. P. 309-322.
8. Larionova I., Cherdynseva N., Liu T., Patysheva M., Rakina M., Kzhyshkowska J. Interaction of Tumor-Associated Macrophages and Cancer Chemotherapy// *Oncoimmunology.* 2019. Vol. 8, №7. P. 1-15.
9. Powell A. E., Anderson E. C., Davies P. S., Silk A. D., Pelz C., Impey S., Wong M. H. Fusion between Intestinal Epithelial Cells and Macrophages in a Cancer Context Results in Nuclear Reprogramming// *Cancer Research.* 2011. Vol. 71. №4. P. 1497–1505.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С МЕДУЛЛЯРНЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

Д.И. Сафин^{1,2}, С.В. Зинченко^{1,2}

ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Татарстан имени профессора М.З. Сигала», г. Казань, Россия¹
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия²

Аннотация

Медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ) – опухоль из секретирующих кальцитонин парафолликулярных С-клеток щитовидной железы. Более чем в 50 % случаев МРЩЖ диагностируется на III и IV стадиях, при которых возможности лечения ограничены. Данная патология может быть одним из проявлений синдрома множественных эндокринных неоплазий типа 2А (синдром Сиппла) или 2В (синдром Горлина), обусловленного мутацией в гене RET и наследуемого по аутосомно-доминантному типу либо другой редкой генетической аномалией. В настоящее время нет достоверных данных о распространенности генетических нарушений у пациентов с МРЩЖ в российской популяции. Генетическое исследование, позволяющее выяснить происхождение МРЩЖ, является дорогостоящим и в настоящее время рутинно не проводится. Для получения этих данных необходимо отобрать методом сплошной выборки всех пациентов, получавших лечение по поводу МРЩЖ на определенной территории, поднять их операционный материал и провести генетическое исследование этого материала. Для нашего исследования мы отобрали всех пациентов, получавших лечение по поводу МРЩЖ в ГАУЗ «РКОД МЗ РТ им. проф. М.З. Сигала» г. Казани с 2017 по 2021 г., и провели стратификацию по возрастно-половому признаку. По результатам нашего исследования можно оценить ситуацию с МРЩЖ по Республике Татарстан в целом, так как абсолютное большинство пациентов данного региона кумулируется в онкодиспансере г. Казани. На втором этапе нашего исследования планируется запрос операционного материала отобранных пациентов для проведения молекулярно-генетического исследования с целью анализа полученных данных и разработки рекомендаций по проведению генетических исследований пациентам с МРЩЖ и их родственникам.

Ключевые слова: медуллярный рак щитовидной железы, кальцитонин, синдром множественных эндокринных неоплазий, RET мутация

CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH MEDULLARY THYROID CANCER IN THE REPUBLIC OF TATARSTAN

D.I. Safin^{1,2}, S.V. Zinchenko^{1,2}.

Republican clinical oncological dispensary, Kazan, Russia¹
Kazan Federal University, Kazan, Russia²

Annotation

Medullary thyroid cancer (MTC) is a tumor of the calcitonin-secreting parafollicular C-cells of the thyroid gland. More than 50% of cases of MTC are diagnosed at stages III and IV, in which treatment options are limited. This pathology may be one of the manifestations of multiple endocrine neoplasia syndrome type 2A (Sipple's syndrome) or 2B (Gorlin's syndrome), caused by a mutation in the RET gene and inherited in an autosomal dominant manner, or another rare genetic anomaly. Currently, there are no reliable data on the prevalence of genetic disorders in patients with MTC in the Russian population. Genetic testing to determine the origin of MTC is costly and is currently not routinely performed. To obtain these data, it is necessary to select by the method of continuous sampling all patients treated for MTC in a certain area, collect their surgical material and conduct a genetic study of this material. For our study, we selected all patients who received treatment for MTC at the RKOD MH RT named after prof. M.Z. Sigal, Kazan from 2017 to 2021 and stratified by age and gender. Based on the results of our study, it is possible to assess the situation with MTC in the Republic of Tatarstan as a whole, since the vast majority of patients in this region accumulate in the oncology dispensary in Kazan. At the second stage of our study, we plan to request surgical material from selected patients for molecular genetic testing in order to analyze the data obtained and develop recommendations for conducting genetic testing for patients with MTC and their relatives.

Key words: medullary thyroid cancer, calcitonin, multiple endocrine neoplasia, RET mutation.

Актуальность. Медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ) – опухоль из секретирующих кальцитонин парафолликулярных С-клеток щитовидной железы, которые происходят из нейроэктодермы, т. е. эмбриональной закладки, отличающейся от мезодермального происхождения А- и В-клеток щитовидной железы. МРЩЖ составляет примерно 5 % от всех опухолей щитовидной железы [1,2].

В 20–30 % случаев МРЩЖ обусловлен различными генетическими нарушениями и передается по аутосомно-доминантному типу, в остальных случаях он является спорадическим заболеванием. Наследственная форма МРЩЖ может проявляться в составе синдрома множественных эндокринных неоплазий типа 2А (синдром Сиппла) в сочетании с феохромоцитомой и гиперплазией паращитовидных желез и типа 2В (синдром Горлина) в сочетании с феохромоцитомой, множественными невриномами слизистых оболочек и расстройствами опорно-двигательного аппарата либо же в виде изолированной семейной формы [3]. Этиологическим фактором развития наследственных форм МРЩЖ является мутация в гене RET, расположенном в 10 хромосоме. Ген RET кодирует трансмембранно расположенный рецептор тирозинкиназы, активация которого приводит к гиперплазии С-клеток щитовидной железы [4,5]. В дальнейшем из этого состояния развивается МРЩЖ, который неминуемо прогрессирует и дает регионарные и отдаленные метастазы [6].

Диагностика МРЩЖ является непростой задачей, для которой необходимо проводить дифференциальную диагностику между спорадическими и наследственными формами, а также проводить оценку стадии заболевания для выбора оптимальной тактики лечения. Очевидно, что ранняя диагностика и лечение предполагают более благоприятный прогноз и лучшую выживаемость пациентов. Агрессивность течения МРЩЖ зависит от наличия мутации в гене RET, а также от уровня кальцитонина и раково-эмбрионального антигена в крови [7, 8]. Молекулярно-генетическое исследование позволяет выявить бессимптомный МРЩЖ, а также пациентов с высоким риском [9] и в дальнейшем назначить превентивное хирургическое лечение до прогрессирования заболевания, что дает возможность полностью излечить пациента [10].

Средний возраст пациентов с МРЩЖ на момент установки диагноза, по данным некоторых зарубежных авторов, варьируется от 43,4 до 53,8 года, а гендерное соотношение (мужчины/женщины) от 1/1,35 до 1/1,5 [11,12,13]

Целью нашего исследования явилось изучение возрастного-полового состава пациентов с подтвержденным МРЩЖ, проживающих на территории Республики Татарстан с 2017 по 2021 г. На втором этапе нашего исследования планируются запрос и изъятие операционного материала отобранных пациентов для проведения молекулярно-генетического исследования с целью анализа полученных данных. В дальнейшем это позволит разработать рекомендации по проведению генетических исследований пациентам с МРЩЖ и их родственникам.

Материал и методы

Объектом исследования явились 56 пациентов с подтвержденным диагнозом МРЩЖ, проходивших лечение в условиях ГАУЗ «РКОД МЗ РТ им.проф. М.З.Сигала» г. Казани с 2017 по 2021 г., отобранных методом сплошной выборки. Произведена стратификация данных

пациентов по возрастному-половому составу. Возраст пациентов оценивался на момент установления диагноза. Возрастные группы сформированы согласно возрастной классификации Всемирной организации здравоохранения.

Результаты

Проанализировав полученные данные, мы получили следующие результаты: количество мужчин 15 (26,7%), женщин 41 (73,2%), соотношение 1/2,7 (рис. 1).

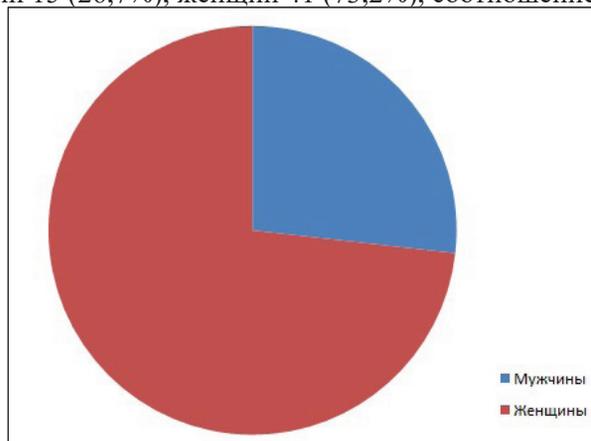


Рис. 1 Соотношение мужчин и женщин среди пациентов с МРЦЖ в Республике Татарстан

Стратификация по возрастным группам (рис. 2):

18–44 лет – 10 чел.;
45–9 лет – 24 чел.;
60–74 лет – 22 чел.

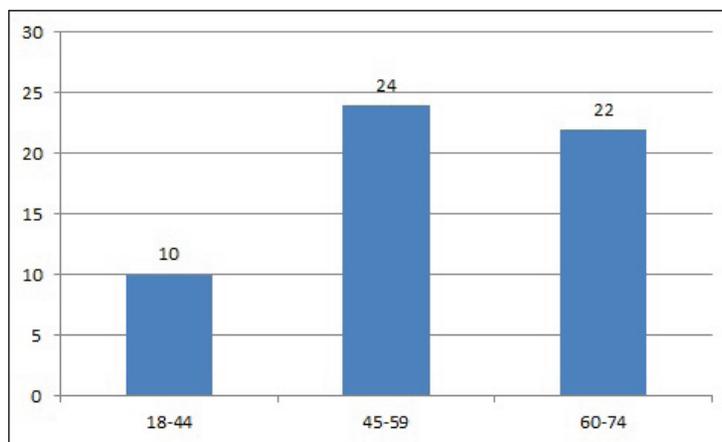


Рис. 2 Стратификация по возрастным группам пациентов с МРЦЖ в Республике Татарстан Самая многочисленная возрастная группа – 45–59 лет. Средний возраст пациентов составил 54,8 года.

Заключение

На данном этапе нашего исследования мы изучили возрастную-половую состав пациентов с подтвержденным МРЦЖ, проживающих на территории Республики Татарстан с 2017 по 2021 г. Полученные нами результаты показывают, что МРЦЖ в Республике Татарстан встречается преимущественно у лиц женского пола, причем разница в соотношении мужчины/женщины значительно больше, чем в среднем по миру (1/2,7 против 1/1,35, 1/1,5). Самая многочисленная возрастная группа – 45–59 лет, а средний возраст пациентов составил 54,8 года, что несколько больше, чем в среднем по миру (43,4–53,8). По этим результатам можно оценить характеристику пациентов с МРЦЖ по Республике Татарстан. Следующим этапом мы планируем запрос операционного материала отобранных пациентов для проведения молекулярно-генетического исследования с целью анализа полученных данных. В дальнейшем это позволит разработать рекомендации по проведению генетических исследований пациентам с МРЦЖ и их родственникам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Marsh D.J., Learoyd D.L., Robinson B.G.* Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update //Thyroid. 1995. Т. 5, №. 5. С. 407-424.
2. *Almeida M.Q., Stratakis C. A.* Solid tumors associated with multiple endocrine neoplasias //Cancer genetics and cytogenetics. 2010. Т. 203. №. 1. С. 30-36.
3. *Pelizzo M.R., Boschin I.M., Bernante P., Toniato A., Piotto A., Pagetta C., Nibale O., Rampin L., Muzzio P.C., Rubello D.* Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients //European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 2007. Т. 33, №. 4. С. 493-497.
4. *Mulligan L. M., Eng C., Healey C.S., Clayton D., Kwork J.B.J., Gardner E., Ponder M.A., Frilling A., Jackson C.E., Lehnert H., Neumann H.P.H., Thibodeau S.N., Ponder B.A.J.* Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC //Nature genetics. 1994. Т. 6. №. 1. С. 70-74.
5. *Roy M., Chen H., Sippel R. S.* Current understanding and management of medullary thyroid cancer //The Oncologist. 2013. Т. 18, №. 10. С. 1093-1100.
6. *Waguespack S.G., Rich A.T., Perrier N.D., Jimenez C., Cote J.G.* Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood //Nature Reviews Endocrinology. 2011. Т. 7, №. 10. С. 596-607.
7. *Almeida M. Q., Hoff A. O.* Recent advances in the molecular pathogenesis and targeted therapies of medullary thyroid carcinoma // Current opinion in oncology. – 2012. – Т. 24. – №. 3. – С. 229-234.
8. *Giuffrida D., Gharib H.* Current diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma //Annals of Oncology. 1998. Т. 9. №. 7. С. 695-701.
9. *Frohnauer M. K., Decker R. A.* Update on the MEN 2A c804 RET mutation: is prophylactic thyroidectomy indicated? //Surgery. 2000. Т. 128, №. 6. С. 1052-1058.
10. *Marx S. J.* Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2 //Nature Reviews Cancer. 2005. Т. 5, №. 5. С. 367-375.
11. *Randle R. W., Balentine C.J., Levenson G.E., Havlena J.A., Sippel R.S., Schneider D.F., Pitt S.C.* Trends in the presentation, treatment, and survival of patients with medullary thyroid cancer over the past 30 years //Surge
12. *Modigliani E., Cohen R., Campos J.M., Conte-Devolx B., Maes B., Boneu A., Schlumberger M., Bigorgne J.C., Dumontier P., Leclerc L., Corcuff B., Guilhem I.* Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients //Clinical endocrinology. 1998. Т. 48. №. 3. С. 265-273.
13. *Raue F., Kotzerke J., Reinwein D., Schröder S., Röher H.D., Deckart H., Höfer R., Ritter M., Seif F., Buhr H., Beyer J., Schober O., Becker W., Neumann H., Calvi J., Winter J., Vogt H.* Prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: evaluation of 741 patients from the German Medullary Thyroid Carcinoma Register //The clinical investigator. 1993. Т. 71, №. 1. С. 7-12.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЛАНИРОВАНИЯ IMRT/VMAT ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫМ РАКОМ. СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ МРНЦ ИМ. А.Ф. ЦЫБА

**А.В. Семенов, О.Г. Лепилина, И.А. Гулидов, Н.Б. Борышева, К.Б. Гордон,
Д.А. Гевондян, П.К. Бурьян**

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; г. Обнинск, Россия

Введение

Возможными способами доставки дозы к опухоли с помощью современных линейных ускорителей являются статическая модулированная по интенсивности лучевая терапия (IMRT) и ротационная методика (VMAT). Технические различия в данных технологиях невелики, однако способны оказать влияние на результаты проводимых клинических исследований. **Цель исследования** – разработать внутренний технический протокол в выборе методики облучения (7-9F IMRT или две арки VMAT) для группы пациентов с плоскоклеточным орофарингеальным раком. **Материал и методы.** Для исследования ретроспективно было отобрано 20 пациентов с орофарингеальным раком. В каждом отдельном случае было создано 2 плана лучевой терапии (IMRT и VMAT) для последующего сравнительного анализа групп по критериям гомогенности и лучевой нагрузки на критические структуры. **Результаты.** Было установлено, что время на реализацию плана VMAT в среднем в два раза ниже ($2,4 \pm 0,3$ мин – для VMAT и $8,0 \pm 1,1$ мин – для IMRT ($p < 0,001$)). При оценке дозиметрических параметров планов в исследуемых группах обнаружено преимущество VMAT в отношении индекса гомогенности (HI) ($p = 0,003$). Лучевая нагрузка на контралатеральную околоушную ($p < 0,001$) и поднижнечелюстную слюнную железу ($p = 0,036$), спинной мозг ($p = 0,003$) и полость рта ($p = 0,06$) была ниже в группе VMAT. Средняя доза на ипсилатеральные слюнные железы не отличалась ($p = 0,75-0,91$). Средняя доза на гортань была ниже в группе IMRT ($p < 0,001$). **Выводы.** С учетом значительного преимущества VMAT в отношении временных затрат на реализацию плана лучевой терапии и небольшого преимущества в отношении дозиметрических характеристик данная технология является оптимальной в лечении пациентов с орофарингеальным раком.

Ключевые слова: орофарингеальный рак, лучевая терапия, планирование лучевой терапии.

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMRT/VMAT PLANNING RESULTS FOR PATIENTS WITH OROPHARYNGEAL CANCER. OWN EXPERIENCE OF THE MRSC NAMED AFTER A.F. TSYBA

A.V. Semenov, O.G. Lepilina, I.A. Gulidov, N.B. Barysheva, K.B. Gordon, D.A. Gevondyan, P.K. Buryan

MRSC named after A.F. Tsyba - branch of the FSBI "NMIC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia; Obninsk, Russia

Introduction

Possible ways of dose delivery to the tumor using modern linear gas pedals are static intensity modulated radiotherapy (IMRT) and rotational technique (VMAT). The technical differences in these techniques are not great, but can have an impact on the results of ongoing clinical trials. **Aim of study:** The aim of the study was to develop an internal technical protocol in the choice of irradiation technique (7-9F IMRT or two VMAT arcs) for a group of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Material and Methods.** Twenty patients with oropharyngeal cancer were retrospectively selected for the study. Two radiation therapy plans (IMRT and VMAT) were created in each individual case for subsequent comparative analysis of the groups according to the criteria of homogeneity and radiation burden on critical structures. **Results.** It was found that the time to implement the VMAT plan was on average half as long (2.4 ± 0.3 min for VMAT and 8.0 ± 1.1 min for IMRT ($p < 0.001$)). When assessing the dosimetric parameters of the plans in the studied groups, VMAT was found to be superior with respect to the homogeneity index (HI) ($p = 0.003$). Radiation exposure to the contralateral parotid ($p < 0.001$) and submandibular salivary gland ($p = 0.036$), spinal cord ($p = 0.003$) and oral cavity ($p = 0.06$) was lower in the VMAT group. The mean dose to the ipsilateral salivary glands was not different ($p = 0.75 - 0.91$). The mean dose to the larynx was lower in the IMRT group ($p < 0.001$). **Conclusions.** Considering a significant advantage of VMAT with regard to the time cost of the radiation therapy plan and a small advantage with regard to the dosimetric characteristics, this technology is optimal in the treatment of patients with oropharyngeal cancer.

Key words: oropharyngeal cancer, radiotherapy, radiotherapy planning

Введение. Лучевая терапия с модуляцией интенсивности (IMRT и VMAT) является современным стандартом оказания специализированной медицинской помощи в радиационной онкологии. Для пациентов с орофарингеальным раком переход от 3D-конформной лучевой терапии (3DCRT) к IMRT дает ряд преимуществ. Благодаря техническому усовершенствованию линейных ускорителей и планирующих систем возможно значительное снижение дозы на критические органы. При этом улучшилась переносимость лечения, снизилась частота нежелательных явлений ЛТ. Повсеместное применение IMRT и VMAT для пациентов с опухолями головы и шеи позволило снизить частоту тяжелых форм ранней дисфагии, мукозита: различия в частоте постлучевых осложнений между группами в ряде исследований достигают 100–200 % по сравнению с 2D/3DCRT [1, 2].

Однако вместе с повышением конформности усложняется процесс планирования ЛТ. Следовательно, помимо протокола иммобилизации пациентов и КТ-топометрии важна выработка единого подхода в оконтуривании и планировании ЛТ, а также определение оптимальной методики облучения с точки зрения дозиметрических характеристик и временных затрат на осуществление лечения. В данном исследовании мы оценили опыт планирования лучевой терапии с модуляцией интенсивности (IMRT и VMAT) для пациентов с орофарингеальным раком. Целью работы была разработка внутреннего протокола для данной группы пациентов и унификация подхода в рамках клинических исследований и рутинной клинической практики.

Материал и методы

В ретроспективное исследование были включены 20 пациентов с плоскоклеточным орофарингеальным раком, которым была проведена лучевая/химиолучевая терапия по радикальной программе в ускоренном режиме фракционирования на аппарате Varian Halcyon.

Для каждого пациента было сформировано два плана ЛТ: IMRT (7–9 направлений) и VMAT (2 арки). В рамках предлучевой подготовки пациентам изготавливали термопластическую маску с фиксацией головы, шеи и плечей. Топометрическую компьютерную томографию осуществляли на аппарате General Electric Discovery RT. Процесс оконтуривания и плани-

рования проводили с использованием системы Varian Eclipse 16.1. Лечение осуществляли в режиме симультанного интегрированного буста с формированием трех целевых объемов (табл.1).

Таблица 1

Целевые объемы для пациентов с орофарингеальным раком (режим ускоренного фракционирования. РОД 2,4 Гр x 26–27 фракций, SIB-режим)

Целевой объем	Структуры
CTV_64,80 Gy	(GTVp+10 мм, GTVn+5 мм) +3 мм (PTV)
CTV_59,40 Gy	GTVp+10 мм + GTVn+5 мм + группы л/у с подтвержденными метастазами
CTV_51,30 Gy	CTV_59,40 Gy + зоны низкого риска, согласно Biau et al. [3]
PTV	+3 мм для всех CTV

Целью планирования было максимально возможное приближение к предписаниям по покрытию мишени и лучевой нагрузке на органы риска, принятым в МРНЦ им. А.Ф. Цыба на основании международных рекомендаций QUANTEC.

Для каждого плана ЛТ была собрана информация о количестве полей/арок, мониторинжных единиц (MU) и скорости реализации плана. Для PTV учитывались следующие параметры: минимальная (Dmin), максимальная (Dmax), средняя доза (Dmean), D(98 %), D(95 %), D(5 %), D(2 %). Индекс гомогенности (HI) считали по следующей формуле:

Индекс гомогенности (HI)

Значение HI должно стремиться к нулю, оптимальным значением индекса считаются показатели до 0,12.

Для оценки статистической значимости различий между группами IMRT и VMAT были использованы программные пакеты Stattech, StatPlus Soft. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

Данные о базовых характеристиках планов, отражающих временные затраты на ЛТ, представлены в таб. 2.

Таблица 2

Базовые характеристики планов ЛТ

Показатель	Техника ЛТ	IMRT1/VMAT2		P
		M ± SD / Me	95% ДИ / Q1 – Q3	
Время лечения (мин.)	IMRT	8,0 ± 1,1	7,5 – 8,5	<0,001*
	VMAT	2,4 ± 0,3	2,3 – 2,6	
Число полей/арок	IMRT	9	7 – 9	<0,001*
	VMAT	2	2 – 2	
Мониторные единицы (MU)	IMRT	2528,8	2421,5 – 2758,2	<0,001*
	VMAT	1167,5	908,5 – 1244,0	

Было установлено, что количество мониторинжных единиц (MU) для IMRT было выше, чем для VMAT в среднем в два раза (2528,8 ЕД для IMRT против 1167,5 ЕД для VMAT, p<0,001). Время работы установки для реализации одного плана ЛТ различалось еще более значимо: 2,4±0,3 мин – для VMAT и 8,0±1,1 мин – для IMRT (p<0,001).

На втором этапе мы оценили дозное распределение в PTV_6480 Gy как ключевой мишени, покрывающей объем опухоли, и вовлеченных в опухолевый процесс лимфоколлекторов.

При оценке дозиметрических характеристик планов нами было установлено, что технология VMAT с применением 2 арок позволяет лучше приблизиться к предписаниям на мишень и критические структуры и достичь более гомогенного распределения дозы в мишени. Так, средняя доза, D95 %, D98 % была статистически значимо выше в группе VMAT (p<0,001). При сравнении минимальной дозы также была обнаружена статистическая тенденция в пользу применения VMAT (p=0,06). Средние значения D5 %, D2 % (зоны максимума) между группами не отличались, однако различия покрытия мишени D95 % и D98 % отразились на индексе гомогенности: HI для VMAT составил 0,06, а для IMRT – 0,08 (p=0,003).

Информация о лучевой нагрузке на критические структуры в зависимости от примененной техники лучевой терапии представлена в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительный анализ лучевой нагрузки на органы риска

Орган риска	Оцениваемый параметр	IMRT	VMAT	P
Околоушная слюнная железа (ипсилатеральная)	Dmean	33,66 ± 6,91	33,43 ± 6,87	0,915
Околоушная железа (контралатеральная)	Dmean	23,14 ± 3,1	20,47 ± 3,4	<0,001*
Поднижнечелюстная слюнная железа (ипсилатеральная)	Dmean	48,75 ± 5,7	51,30 ± 10,9	0,750
Поднижнечелюстная слюнная железа (контралатеральная)	Dmean	30,59 ± 7,8	30,09 ± 7,2	0,036*
Полость рта	Dmean	41,21 ± 4,5	38,05 ± 3,9	0,060
Спинальный мозг	Dmax	39,60 ± 2,3	37,09 ± 1,8	0,003*
Гортань	Dmean	28,40 ± 5,4	35,20 ± 6,1	<0,001*
Тело (контур пациента)	Dmean	11,83 ± 0,9	11,85 ± 1,2	0,510

Полученные результаты демонстрируют отсутствие различий в средней лучевой нагрузке, приходящейся на ипсилатеральные слюнные железы ($p=0,75-0,91$). При сравнении лучевой нагрузки на контралатеральную околоушную и поднижнечелюстную слюнную железу средняя доза была ниже в группе VMAT: средняя доза на околоушную слюнную железу составила $20,4 \pm 3,4$ Гр и $23,14 \pm 3,1$ Гр ($p<0,001$), на поднижнечелюстную слюнную железу – $30,09 \pm 7,2$ Гр и $30,59 \pm 7,8$ Гр ($p=0,03$) соответственно. Лучшие результаты планирования для VMAT были достигнуты и в отношении спинного мозга ($p=0,003$), полости рта ($p=0,06$). Однако при ротационной методике облучения значительно увеличилась нагрузка на гортань: средняя доза возросла с $35,20 \pm 6,1$ Гр для VMAT до $28,40 \pm 5,4$ Гр для IMRT ($p<0,001$).

Обсуждение

В данном исследовании мы оценили собственный опыт планирования ЛТ с использованием актуальных техник IMRT и VMAT. Ретроспективно были отобраны 20 пациентов с орофарингеальным раком, получивших радикальный курс лучевой терапии в ускоренном режиме фракционирования. Для каждого пациента было сформировано два плана: IMRT с 7–9 направлений и VMAT с использованием двух арок.

Из результатов сравнительного анализа следует, что VMAT лучше подходит для использования в рамках клинических исследований и рутинной клинической практики. Ротационный метод облучения позволяет увеличить пропускную способность установки в два раза по сравнению с IMRT, планирование лучевой терапии позволяет сильнее приблизиться к предписаниям ЛТ.

Важно отметить, что в обеих группах IMRT и VMAT полученные планы ЛТ соответствовали основным критериям качества. Большинство различий между техниками в пользу VMAT составляли не более 1–2 Гр. При снижении лучевой нагрузки на контралатеральные слюнные железы и улучшении гомогенности VMAT планов привлекает внимание статистически значимое повышение средней дозы на гортань. Данная особенность может быть обусловлена как техническими особенностями статического или ротационного метода лечения, так и личным опытом планирования медицинских физиков отдела лучевой терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Заключение

Таким образом, с точки зрения обеспечения гарантий качества лучевой терапии 7–9Ф-IMRT и VMAT с применением двух арок являются подходящими методиками лечения орофарингеального рака, способными обеспечить высокий уровень гомогенности дозы в мишени и резкий спад ее на границе опухоли и здоровых тканей. VMAT-техника с применением двух арок при этом в нашей клинической практике показала себя как оптимальный выбор для большинства больных с орофарингеальным раком с учетом временных затрат на одного пациента.

ЛИТЕРАТУРА

- Gosh G., Tallari R., Malviya A. Toxicity Profile of IMRT Vs. 3D-CRT in Head and Neck Cancer: A Retrospective Study. J Clin Diagn Res 2016; Vol. 10,9. P. 1-3
- Lambrecht M., Nevens D., Nuyts S. Intensity-modulated radiotherapy vs. parotid-sparing 3D conformal radiotherapy. Effect on outcome and toxicity in locally advanced head and neck cancer. Strahlenther Onkol 2013 Vol. 189 № 3. P. 223-9
- Biau J., Lapeyre M., Troussier I. et al. Selection of lymph node target volumes for definitive head and neck radiation therapy: a 2019 Update. Radiother Oncol 2019; № 134. P. 1-9

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУЛА ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ РАКА ГОРТАНИ

Е.А. Сиденко^{1,2}, И.В. Кондакова¹, О.В. Черемисина¹

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия²

Аннотация

Рак гортани является одним из наиболее распространённых злокачественных новообразований верхних дыхательных путей. Убиквитин-протеасомная система представляет собой систему специфического внутриклеточного протеолиза, которая вовлечена в развитие и прогрессирование опухолей гортани. **Целью** исследования явились определение уровня экспрессии мРНК генов β -субъединиц протеасом (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) и оценка активности внутриклеточного пула протеасом в тканях гортани. В работу были включены 29 пациентов с диагностированным плоскоклеточным раком гортани (ПРГ). Уровень экспрессии мРНК определяли методом ПЦР-РВ, активность протеасом определялась с использованием коммерческих флуорогенных субстратов. Обнаружены значимые различия в уровне экспрессии β -субъединиц протеасом в зависимости от размера опухоли, получены данные об увеличении химотрипсинподобной и каспазаподобной активности внутриклеточных протеасом в тканях ПРГ. Также было показано, что химотрипсинподобная и каспазаподобная активность протеасом увеличивается при большом размере новообразования.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак гортани, внутриклеточный пул протеасом, активность протеасом.

THE ROLE OF THE INTRACELLULAR PROTEASOME POOL IN THE DEVELOPMENT OF LARYNX CANCER

Е.А. Sidenko^{1,2}, I.V. Kondakova¹, O.V. Cheremisina¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Abstract

Larynx cancer is one of the most common malignant neoplasms of the upper respiratory tract. The ubiquitin-proteasome system is a specific intracellular proteolysis system that is involved in the development and progression of larynx tumors. The aim of the study was to determine the level of expression of mRNA genes of β -subunits of proteasomes (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) and to assess the activity of the intracellular pool of proteasomes in the tissues of the larynx. The work included 29 patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the larynx. The level of mRNA expression was determined by real-time PCR, the activity of proteasomes was determined using commercial fluorogenic substrates. Significant differences were found in the level of expression of β -subunits of proteasomes depending on the size of the tumor, data were obtained on an increase in CTP and CP activities of intracellular proteasomes in squamous cell carcinoma of the larynx tissues. It has also been shown that CTP and PC proteasome activity increases with a large neoplasm.

Key words: squamous cell carcinoma of the larynx, intracellular pool of proteasomes, proteasome activity.

Актуальность. Одной из наиболее распространённых патологий среди заболеваний органов верхних дыхательных путей является рак гортани. Согласно цифрам мировой онкологической статистики, число впервые выявленных новообразований гортани в 2020 г. составило 184 615 случаев, число летальных исходов – 99 840 [1, 2]. Опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем метаболизма, связанным с неконтролируемой пролиферацией и нарушением регуляции многих клеточных процессов. Быстрый обмен белков обеспечивается их деградацией протеолитическими системами, которые играют ключевую роль в сохранности клеточного протеома [3]. Убиквитин-протеасомная система ответствен-

на за деградацию более 80 % короткоживущих, неправильно свёрнутых и второстепенных внутриклеточных белков. Протеасомы в организме человека представлены внутриклеточным и циркулирующим пулами [4, 5]. Они участвуют во многих биологических процессах, включая транскрипцию, трансляцию и репарацию генов, клеточный цикл, пролиферацию клеток и апоптоз. Таким образом, убиквитин-протеасомная система способна участвовать в регуляции множества функций, нарушение которых может стать критичным для организма человека, дисфункция системы приводит к различным заболеваниям, в том числе и к развитию опухолевых процессов [6, 7, 8]. Протеасомы в организме человека представлены двумя типами: 20S-протеасома, так называемая коровая (core) частица, и 26S-протеасома, содержащая в своём составе две регуляторные частицы 19S. Комплекс 26S протеасомы состоит из 20S субъединицы, включающей 4 гептамерных кольца (α 1-7; β 1-7; β 1-7; α 1-7). Каждое из двух внутренних β -колец образовано 7 различными β -субъединицами и отвечает за протеолиз. Три из этих β -субъединиц (β 1, β 2 и β 5, кодируемые генами *PSMB6*, *PSMB7* и *PSMB5*, соответственно) проявляют специфическую субстратную каталитическую активность: каспазаподобную, трипсинподобную и химотрипсинподобную соответственно [7, 9]. **Целью** исследования являлось определение уровня экспрессии мРНК генов β -субъединиц протеасом (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) и оценка активности внутриклеточного пула протеасом в тканях пациентов с плоскоклеточным раком гортани (ПРГ).

Материал и методы

В исследование было включено 29 пациентов с плоскоклеточным раком гортани (T1–T3N0M0). Группа сравнения была представлена образцами условно-нормальной ткани. Материалом для исследования послужила ткань, полученная путём биопсии. Анализ экспрессии генов протеасом (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) проводился методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Праймеры для ПЦР-РВ были подобраны с использованием специализированных программ Vector NTI Advance 11,5 и базы данных NCBI. Химотрипсинподобную (ХТП) активность протеасом определяли с использованием коммерческого флуорогенного субстрата для ХТП центров – N-Succinyl-leu-leu-val-tyr-7-amido-4-methylcoumarin. Каспазаподобную (КП) активность – с использованием коммерческого флуорогенного субстрата для КП центров – Z-leu-leu-glu-amido-4-methylcoumarin. Для исключения активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132.

Результаты. На первом этапе исследования были получены данные об уровне экспрессии мРНК β -субъединиц протеасом (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) в зависимости от размера опухоли (рис.1). В зависимости от увеличения размера опухоли возрастает экспрессия *PSMB5*, а для остальных генов характерна тенденция к увеличению от стадии T1N0M0 к T3N0M0. Известно, что в основе трансформации опухолевых клеток лежат такие механизмы, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, а убиквитин-протеасомная система является непосредственным регулятором этих процессов [7].

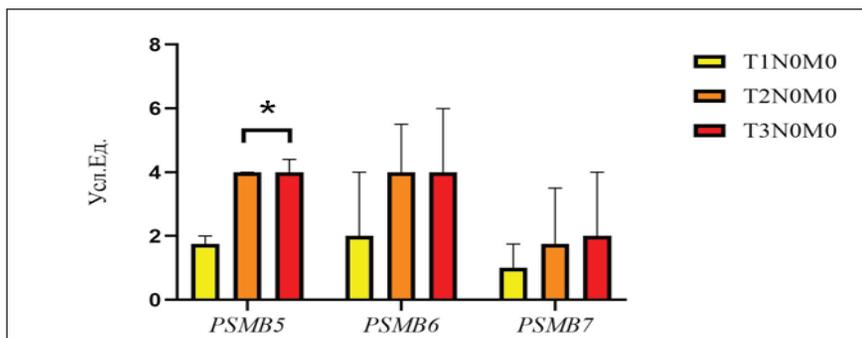


Рис.1. Экспрессия β -субъединиц протеасом (*PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) в тканях рака гортани в зависимости от критерия Т, Ме (Q1-Q3). Примечание: * – значимость различий по сравнению с T1N0M0 $p < 0,05$

На следующем этапе была проведена оценка активности внутриклеточного пула протеасом в сравнении с условно-нормальной тканью, полученной от пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак гортани (рис. 2 А). ХТП и КП активности протеасом в тканях ПРГ выше, чем в условно-нормальной ткани в 2,4 и 3,4 раза соответственно. На рис. 2 (Б) продемонстрировано изменение активности протеасом в зависимости от размера опухоли. Так, ХТП

и КП активности возрастают в 2 раза при увеличении опухолевого процесса. Полученные результаты согласуются с литературными источниками, которые подтверждают увеличение активности протеасом в опухолевых тканях различных локализаций [10, 11].

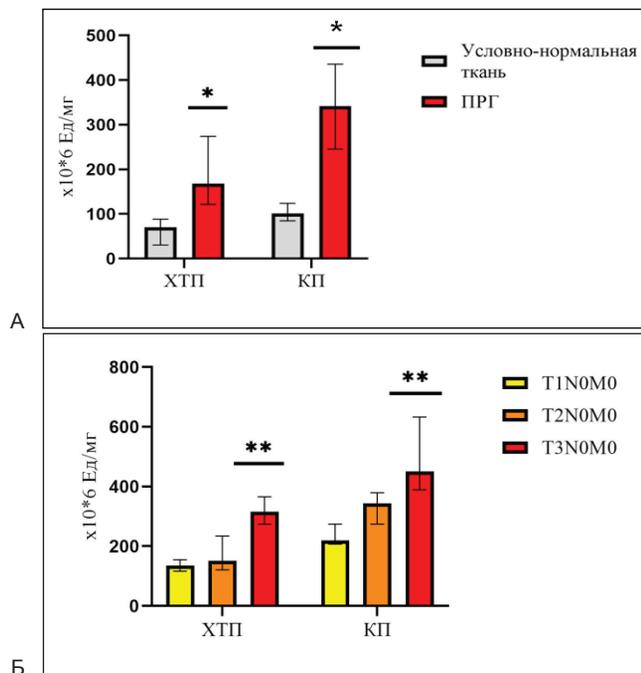


Рис. 2. А – ХТП и КП активности внутриклеточных протеасом в группах пациентов с условно-нормальной тканью и ПРГ, Ме (Q1-Q3); Б – ХТП и КП активности протеасом в зависимости от критерия Т, Ме (Q1-Q3). Примечания: * – значимость различий по сравнению с условно-нормальной тканью; ** – значимость различий по сравнению с T1N0M0 $p < 0,05$

Заключение

Обнаружены значимые различия в уровне экспрессии β -субъединиц протеасом в зависимости от размера опухоли, получены данные об увеличении ХТП и КП активности внутриклеточных протеасом в тканях ПРГ. Также было показано, что ХТП и КП активность протеасом увеличивается при большем размере новообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Megwalu U. C., Sikora A. G. Survival outcomes in advanced laryngeal cancer //JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 2014. Т. 140. № 9. С. 855–860.
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries //CA: a cancer journal for clinicians. 2021. Т. 71, №. 3. С. 209-249.
3. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи //Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – №. 1. – С. 26-32.
4. Какурина Г.В., Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В. Циркулирующие протеасомы в патогенезе плоскоклеточного рака головы и шеи //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. – №. 1. – С. 108-111.
5. Sidenko E. A., Mikhalev D. E., Kakurina G. V., Cheremisina O. V., Baidik O. D., Choinzonov E. L., Kondakova I. Vol. The activity of circulating proteasomes in tumor and precancerous diseases of the head and neck organs //Siberian journal of oncology. 2021. Т. 20. №. 2. С. 46-52.
6. Varshavsky A. The ubiquitin system, autophagy, and regulated protein degradation //Annual review of biochemistry. 2017. Т. 86. С. 123-128.
7. Сиденко Е. А., Какурина Г. В., Черемисина О. В., Шашова Е. Е., Колегова Е. С., Кондакова И. В. Функционирование протеасом при предопухолевых и неопластических изменениях эпителия человека //Молекулярная медицина. 2020. Т. 18, №. 2. С. 11-16.
8. Wang J., Li J., Zhang L., Qin Y., Zhang F., Hu R., Zhang X. Comprehensive analysis of ubiquitin-proteasome system genes related to prognosis and immunosuppression in head and neck squamous cell carcinoma //Aging (Albany NY). 2021. Т. 13, №. 16. С. 20277.
9. Chen S., Wu J., Lu Y., Ma Y. B., Lee B. H., Yu Z., Mao Y. Structural basis for dynamic regulation of the human 26S proteasome //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. Т. 113, №. 46. С. 12991-12996.
10. Иванова Э.В., Кондакова И.В., Спирина Л.В., Афанасьев С.Г., Августиневич А.В., Черемисина О.В. Химотрипсинподобная активность протеасом и общая активность кальпаинов при раке желудка и толстой кишки //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157, №. 6. С. 753-756.
11. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Шашова Е.Е., Коваль В.Д., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Слонимская, Е.М. Активность протеасом в опухолях женской репродуктивной системы //Биоорганическая химия. 2012. Т. 38, №. 1. С. 106.

РАДИКАЛЬНАЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ГИПЕРТЕРМИЯ В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ КОСТЕЙ

П.К. Ситников^{1,2}, И.И. Анисеня¹, А.В. Богоутдинова¹, Х.И. Хакимов¹,
Р.В. Зельчан¹, С.А. Табакаев¹, Д.О. Пахмурин^{2,3}, В.В. Пахмурина²

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

ТУСУР «Томский университет систем управления и радиоэлектроники», г. Томск, Россия²

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия³

Аннотация

Разработана методика радикальной интраоперационной гипертермии, которая использована для лечения 10 пациентов со злокачественными опухолями костей диафизарной локализации. Проводились контрольные обследования (остеосцинтиграфия, МСКТ, УЗИ) и оценка функциональных результатов (шкалы MSTS и Карновского) в течение 12 мес. Установлено, что методика позволяет провести термическую обработку опухоли абластично, минимально повреждая окружающие ткани, не требует реконструктивного этапа лечения, а размер опухоли не ограничивает ее применение. Функциональные результаты оценены как хорошие. За период наблюдения отсутствовали клинические и рентгенологические признаки продолженного роста и рецидива в зоне гипертермического воздействия.

Ключевые слова: злокачественные опухоли костей, костные метастазы, гипертермия, термическая абляция.

RADICAL INTRAOPERATIVE HYPERTHERMIA IN THE TREATMENT OF BONE TUMORS

P.K. Sitnikov^{1,2}, I.I. Anisenja¹, A.V. Bogoutdinova¹, H.I. Hakimov¹,
R.V. Zelchan¹, S.A. Tabakaev¹, D.O. Pakhmurin^{2,3}, V.V. Pakhmurina²

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Science,
Tomsk, Russia¹

Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics, Tomsk, Russia²

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia³

Annotation

A method of radical intraoperative hyperthermia was developed, which was used to treat 10 patients with malignant bone tumors of the diaphyseal localization. Control examinations (osteoscintigraphy, MSCT, ultrasound) and assessment of functional results (MSTS and Karnovsky scales) were carried out for 12 months. It has been established that the technique allows thermal treatment of the tumor ablastically, minimally damaging the surrounding tissues, does not require a reconstructive stage of treatment, and the size of the tumor does not limit its use. Functional results are rated as good. During the observation period, there were no clinical and radiographic signs of continued growth and recurrence in the area of hyperthermic exposure.

Key words: malignant bone tumors, bone metastases, hyperthermia, thermal ablation.

Актуальность. Опухоли костей – это множество новообразований с различной патоморфологической и клинико-рентгенологической картиной, 1,5 % из них представляют первичные злокачественные опухоли [1]. Доброкачественные опухоли костей встречаются в 2–3 раза чаще, чем злокачественные. Метастазы в кости занимают 96 % от всех новообразований костной системы [2]. Основным методом лечения является хирургический [1–3]. В большинстве случаев это травматичные широкие резекции с дорогостоящим реконструктивным этапом (эндопротезирование). С целью уменьшения объема резекции и количества рецидивов применяются дополнительные виды цитостатического воздействия (химио- и лучевая терапия), в том числе и интраоперационного [2–4]. Одним из перспективных методов, обладающих противоопухолевой активностью, является метод локальной интраоперационной гипертермии [5, 6]. Оригинальность методики заключается в возможности подведения

высокотемпературного агента непосредственно к опухолевому очагу. Изменение температурного режима в реальном времени позволяет сохранить сегмент кости, пораженный опухолью, в сочетании с тотальной элиминацией опухолевых элементов [5, 6]. Несмотря на большое количество методов интраоперационного гипертермического воздействия на первичные или метастатические опухоли костей, все они ограничены размерами опухоли и зачастую дают лишь паллиативный эффект [7]. Еще одним их недостатком является дорогостоящее оборудование. Разработка методики, позволяющей устранить имеющиеся недостатки интраоперационных гипертермических методов воздействия на костные опухоли, является актуальной задачей.

Цель исследования – разработать основы методики радикальной интраоперационной гипертермии при лечении опухолей костей и оценить ее эффективность.

Материал и методы

Материалом для нашего исследования являлось обследование 10 взрослых пациентов с морфологически верифицированными злокачественными опухолями костей диафизарной локализации. Средний возраст пациентов составил $47,4 \pm 4,6$ года. У 7 пациентов на момент оперативного вмешательства отсутствовали отдаленные метастазы, у 3 пациентов имелись единичные или множественные метастатические очаги в легких. Всем пациентам выполнялось хирургическое лечение с радикальной интраоперационной гипертермией аппаратом «Феникс-2» (разработка ТУСУР, г. Томск). Оценка зоны гипертермического воздействия проводилась путем проведения компьютерной томографии и остеосцинтиграфии после операции и через 3, 6, 9, 12 мес. Также проводились СКТ органов грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости и лимфоузлов. Оценка функциональных результатов проводилась с использованием шкал MSTS и Карновского в сроки динамического наблюдения. В послеоперационном периоде 3 пациентам проводилось химиотерапевтическое лечение согласно существующим стандартам.

Результаты. Хирургическим путем выполнялось выделение области гипертермического воздействия, включающей зону кости, пораженной опухолью, и не менее 1 см здоровой костной ткани единым блоком. Далее на область гипертермического воздействия кости накладывались соединенные с блоком стабилизации температуры аппарата «Феникс-2» поверхностные нагреватели (один или несколько), охватывая эту область кости со всех сторон. Мягкие ткани, сосуды и нервы, окружающие область гипертермического воздействия, отграничивались от нагревателей с помощью термоизоляционного материала. После этого осуществлялся нагрев области гипертермического воздействия кости до значений температуры не менее 60°C . В течение первых 8–12 мин температуру поднимали до величины не менее 60°C , а общее время высокотемпературного воздействия составляло не менее 30 мин, при этом необходимую температуру стабилизировали в течение всего времени высокотемпературного воздействия на заданном уровне. Контроль температуры в зоне гипертермии осуществлялся посредством внутрикостного интраканально введенного термодатчика через зону кости, не пораженную опухолью. Страхочный металлоостеосинтез выполнялся по показаниям.

За весь период наблюдения (12 мес) у всех пациентов отсутствовали клинические и рентгенологические признаки продолженного роста или рецидива опухоли. У пациентов, имевших на момент оперативного вмешательства метастазы в легких, размеры последних не увеличились. Появления новых отдаленных метастатических очагов также не было выявлено. У 4 пациентов в период наблюдения произошли переломы диафизов костей в области гипертермического воздействия, что повлекло необходимость проведения у них интрамедуллярного металлоостеосинтеза. Данные пациенты не были исключены из исследования и продолжили наблюдаться согласно плану. У всех пациентов отмечено улучшение, или, по крайней мере, не ухудшение функциональных показателей оперированных конечностей.

Заключение

Предлагаемая методика радикальной интраоперационной гипертермии позволяет провести термическую обработку опухоли абластично, в пределах радикального объема, минимально повреждая окружающие ткани, и не требует реконструктивного этапа лечения. При этом размер опухоли не имеет значения, поскольку можно использовать неограниченное количество поверхностных нагревателей. Высокотемпературное интраоперационное воздействие позволяет уничтожить опухолевые клетки, не оказывая при этом повреждающего действия на целостность кости, что, в свою очередь, позволяет сохранить основные прочностные характеристики и условия для ревитализации костной ткани в области гипертермического воздействия. У всех пациентов отмечался хороший противоопухолевый эффект: не было

выявлено рецидива и продолженного роста опухоли в зоне гипертермического воздействия, а также отмечалась стабилизация в отношении имеющихся отдаленных метастатических очагов в легких и отсутствие появления новых. Планируется оптимизировать температурный режим воздействия на очаг и определить сроки регенерации костной ткани. Исследование продолжается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andreou D., Henrichs M.P., Gosheger G., Nottrott M., Streitbürger A., Harges J. Neue. Operationsverfahren bei Knochenentumoren. Der Pathologe. 2014 Nov. 35(2): 232-236. doi: 10.1007/s00292-014-2004-1
2. Coleman R.E., Croucher P.I., Padhani A.R., Clézardin P., Chow E., Fallon M., Guise T., Colangeli S., Capanna R., Costa L. Bone metastases. Nat Rev Dis Primers. 2020 Oct 15;6(1):83. doi: 10.1038/s41572-020-00216-3. PMID: 33060614.
3. Brown H.K., Schiavone K., Gouin F., Heymann M.F., Heymann D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. Calcif Tissue Int. 2018 Feb;102(2):174-195. doi: 10.1007/s00223-017-0372-2. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29238848; PMCID: PMC5805807.
4. Han K., Dang P., Bian N., Chen X., Yang T., Fan Q., Zhou Y., Zhao T., Wang P. Is Limb Salvage With Microwave-induced Hyperthermia Better Than Amputation for Osteosarcoma of the Distal Tibia? Clin Orthop Relat Res. 2017 Jun;475(6):1668-1677. doi: 10.1007/s11999-017-5273-1. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28194714; PMCID: PMC5406345.
5. Патент № 2695305 С1 Российская Федерация, МПК А61В 18/12, А61В 6/00, А61В 8/00. Способ интраоперационного гипертермического воздействия на костную ткань : № 2018126045 : заявл. 13.07.2018 : опубл. 22.07.2019 / Д. О. Пахмурин, А. А. Федоров, А. В. Кобзев [и др.].
6. Pakhmurin D., Pakhmurina V., Kashin A., Kulkov A., Khlusov I., Kostyuchenko E., Sidorov I., Anisenya I. Compressive Strength Characteristics of Long Tubular Bones after Hyperthermal Ablation. Symmetry 2022, 14, 303. <https://doi.org/10.3390/sym14020303>
7. Kok H.P., Cressman E.N.K., Ceelen W., Brace C.L., Ivkov R., Grill H., Ter Haar G., Wust P., Crezee J. Heating technology for malignant tumors: a review. Int J Hyperthermia. 2020;37(1):711-741. doi: 10.1080/02656736.2020.1779357. PMID: 32579419; PMCID: PMC7781160.

СИСТЕМНАЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

О.С. Слукинова, И.И. Алентов, М.А. Поляк

МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Москва, Россия

Аннотация

Рак молочной железы (РМЖ) на сегодняшний день занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований среди женщин. Неоадъювантная химиотерапия (НАХТ) при РМЖ позволяет увеличить количество органосохраняющих операций и улучшить прогноз заболевания. Прогноз эффективности НАХТ является важным фактором при выборе оптимальной тактики лечения больных, и поиск надежных предикторов ответа опухоли на неоадъювантное лечение остается актуальным направлением клинических исследований. В последние годы привлекает особое внимание системное воспаление, индуцированное противоопухолевым лечением, как особый вид опухоль-промотирующего воспаления. Вызванный гибелью клеток системный воспалительный ответ (СВО) способен оказывать на опухоль стимулирующее действие. **Цель исследования** – оценить степень выраженности СВО у больных РМЖ до начала и в процессе НАХТ и установить связь развития данной реакции с ответом опухоли. Уровни ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α и СРБ в сыворотке периферической крови были исследованы до начала лечения у 15 больных раком молочной железы (РМЖ) с Her2/неу-негативным статусом и у 9 из них – в процессе НАХТ. У некоторых больных исходные значения ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α были значительно повышены, однако это не было ассоциировано с выраженностью патоморфологического ответа опухоли на лечение. Выявлена положительная корреляция между начальными концентрациями ИЛ-6 и ИЛ-8 ($r=0,9395$). У больных с полным или выраженным ответом на ХТ ($n=4$) на большей протяженности химиотерапевтического лечения уровни ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α оставались в пределах референсных значений. Напротив, у больных в группе со слабым ответом или с отсутствием ответа на лечение ($n=5$) наблюдалось транзиторное или устойчивое возрастание уровней цитокинов на фоне химиотерапии. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной прогностической значимости мониторинга маркеров системного воспалительного ответа у больных в динамике НАХТ.

Ключевые слова: рак молочной железы, системная воспалительная реакция, неоадъювантная химиотерапия, цитокины, эффективность противоопухолевого лечения.

DETECTION OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH BREAST CANCER DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

O.S. Slukinova, I.I. Alentov, M. A. Polyak

P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Annotation

Breast cancer (BC) brings great oncological disease and mortality associated with cancer burden in women. Neoadjuvant chemotherapy in BC cases gives opportunity to perform more organ-preserving surgeries and improve prognosis of disease. Prognosis of NACT efficiency is important factor for choosing treatment strategy, thus searching of reliable predictors of response to NACT is of current interest for clinical trials. Last years emergence of systematic inflammatory response induced by antitumor therapy attracts much attention presenting a special type of tumor-promoting inflammation. The aim of the study is to assess the extent of expressiveness of SIR in BC patients before and during NACT and pathological response to chemotherapeutics. Levels of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and CRP in serum of peripheral blood were examined at the start of treatment in 15 patients with BC of Her2/neu-negative type receiving NACT and in 9 of them during NACT. Levels of IL-6, IL-8 and TNF- α were significantly elevated in some patients at the beginning of treatment, although it was not associated with degree of response of tumor to the treatment. Positive correlation between start levels of IL-6 and IL-8 was observed ($r=0,9395$). Concentrations of IL-6, IL-8 and TNF- α were normal during NACT in patients with better response ($n=4$) most of the time. It was opposite in patients with poor response ($n=5$): levels of abovementioned cytokines were transiently or steadily increased during NACT. Results display potential prognostic value of monitoring of inflammation markers dynamics in patients under NACT.

Key words: breast cancer, systemic inflammation response, neoadjuvant chemotherapy, cytokines, efficiency of antitumor treatment.

Актуальность. Рак молочной железы (РМЖ) на сегодняшний день занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и наиболее частой причиной смерти от злокачественных новообразований среди женщин [1]. Сегодня при РМЖ все чаще применяется неoadъювантная химиотерапия (НАХТ) [2]. Поиск надежных предикторов ответа опухоли на неoadъювантное лечение остается актуальным направлением клинических исследований.

По современным представлениям, в патогенезе злокачественных новообразований существенную роль играет состояние хронического воспаления. [3]. Системный воспалительный ответ, который отражается в изменении соотношения клеток периферической крови либо в увеличении содержания в крови провоспалительных цитокинов и белков острой фазы, регистрируется у 20–80 % первичных онкологических больных и коррелирует с распространенностью опухолевого процесса, с более короткой выживаемостью, а также с ответом опухоли на лекарственную терапию [3]. Воспалительная реакция, индуцированная противоопухолевым лечением, как особый вид опухоль-прототирующего воспаления, в последние годы привлекает особое внимание. Считается, что вызванный гибелью клеток воспалительный ответ может оказывать иммуностимулирующее действие («вакцинация *in situ*») и усиливать противоопухолевый эффект лечения [4]. Однако развитие местного и системного воспаления может оказывать на опухолевые клетки и стимулирующее действие [5].

подавляющее большинство клинических исследований, посвященных роли СВО в реализации непосредственного эффекта НАХТ или влиянии СВО на отдаленные результаты лечения у больных РМЖ, рассматривает клеточные или гуморальные показатели системного воспаления, регистрируемые до начала противоопухолевой терапии.

Цель исследования – оценить степень выраженности СВО у больных РМЖ до начала и в процессе НАХТ и установить связь развития воспалительной реакции с ответом опухоли на лекарственное лечение.

Материал и методы

В исследование включены 15 пациенток с подтвержденным диагнозом HER2/neu-негативного РМЖ, проходивших лечение в МНИОИ им. П.А. Герцена в 2021 г. Медиана

возраста больных составила 51 год (34–67 лет). У 9 (60 %) пациенток диагностирован РМЖ I–II стадии; у 6 (40 %) пациенток – III стадии; инвазивный протоковый РМЖ – у 12 (80 %) пациенток, инвазивный дольковый – у 3 (20 %) больных; люминальный А подтип опухоли установлен в 8 случаях (53 %), тройной негативный – в 7 (47 %). Все пациентки получали 8 курсов НАХТ по одной из двух схем: 4АС+4Т (4 курса доксорубицин+циклофосфамид и 4 курса таксаны; n=12) или 4Т+4АС (n=3). После завершения НАХТ всем пациенткам была выполнена радикальная хирургическая операция. Выраженность ответа на лечение оценивали по данным патоморфологического исследования.

Содержание ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α и С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке периферической крови у всех больных исследовали до начала лечения, у 9 пациенток – в динамике на фоне лечения, перед каждым циклом НАХТ. Измерение сывороточных концентраций ИЛ-6 проводили на анализаторе Access 2, (Beckman Coulter) методом хемилюминесцентного анализа с использованием коммерческого набора реактивов. Для измерения концентраций ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α был использован метод твердофазного ИФА на коммерческих наборах Invitrogen. Измерение уровня СРБ проводили иммунотурбидиметрическим методом на анализаторе Beckman Coulter AU680.

Статистическую обработку проводили с помощью программы STATISTICA, построение графиков и диаграмм осуществляли в программе Excel 2013.

Результаты

По данным исследования операционного материала у 7 больных зарегистрирован полный или выраженный ответ опухоли на НАХТ (RCB-0 или RCB-I), у 8 больных – слабый ответ или отсутствие ответа на химиотерапию (RCB-II или RCB-III). Показатели СВО у большинства больных до начала лечения не превышали референсных значений, характерных для нормы (табл.1).

Таблица

Исходные значения маркеров СВО у больных РМЖ

Параметр	ИЛ-6, пг/мл (<7 пг/мл)*	ИЛ-8, пг/мл (<62 пг/мл)*	ИЛ-10, пг/мл (<9,1 пг/мл)*	ФНО- α , пг/мл (<8 пг/мл)*	СРБ, мг/л (<5 пг/мл)*
Min-max значения	0,27-92,91	0-239,6	0-2,4	0-91,6	0,18-34,1
Медиана (25-й и 75-й перцентили)	1,79 (1,49;4,32)	53,6 (0;67)	0,6 (0;1,3)	0 (0;1,2)	1,8 (0,61;3,31)
Среднее значение $\pm m$	9,46 \pm 5,55	51,98 \pm 13,89	0,74 \pm 0,19	8,50 \pm 5,43	3,81 \pm 1,74

При мечание: * – в скобках указаны среднестатистические референсные уровни в норме.

Исключение составили отдельные случаи, в которых у больных наблюдалось значительное повышение уровней ИЛ-6, ФНО- α или СРБ. Выраженная положительная корреляция отмечена между стартовыми уровнями ИЛ-6 и ИЛ-8 ($r=0,9395$). Зависимости между исходными уровнями исследованных показателей СВО и патоморфологическим ответом опухоли на лечение не выявлено.

В группе больных, прослеженных в динамике (n=9), в случаях полного или выраженного ответа на НАХТ (n=4) на большей протяженности циклов химиотерапевтического лечения уровни ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α оставались в пределах референсных значений (рис.1).

При этом уровни ИЛ-8 за все время мониторинга изменялись незначительно, в то время как концентрации ИЛ-6 или ФНО- α в отдельных точках наблюдения превышали пределы соответствующих референсных значений.

Напротив, в случаях слабого ответа или отсутствия ответа опухоли на лечение (n=5) на фоне химиотерапии наблюдалось транзитное или устойчивое, многократно превышающее референсные значения возрастание уровня цитокинов (рис. 2).

Колебания уровней цитокинов были более выраженными, чем в группе случаев с полным и выраженным ответом опухоли на НАХТ, а их пиковые концентрации превышали стартовые значения на несколько порядков. Как правило, повышение уровней ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α происходило на фоне введения таксанов, несмотря на проводимую премедикацию, однако у некоторых пациенток резкое возрастание уровней цитокинов отмечалось и на курсах НАХТ с введением доксорубицина и циклофосфамида. При этом наблюдалось сочетанное повы-

шение уровней двух или трех цитокинов, что соответствует представлениям о возможности развития «цитокинового шторма» на фоне химиотерапии.

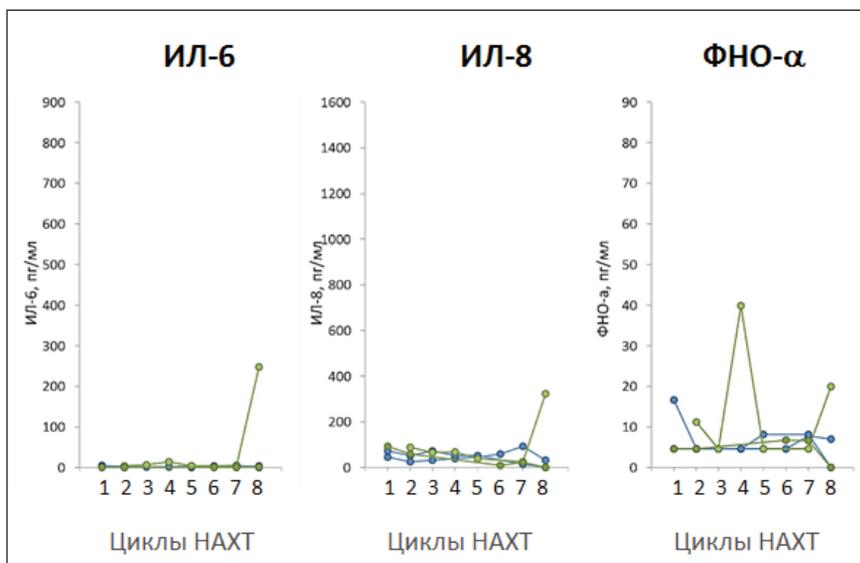


Рис. 1. Динамика изменения уровней ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α в процессе НАХТ у пациенток с выраженным ответом на лечение

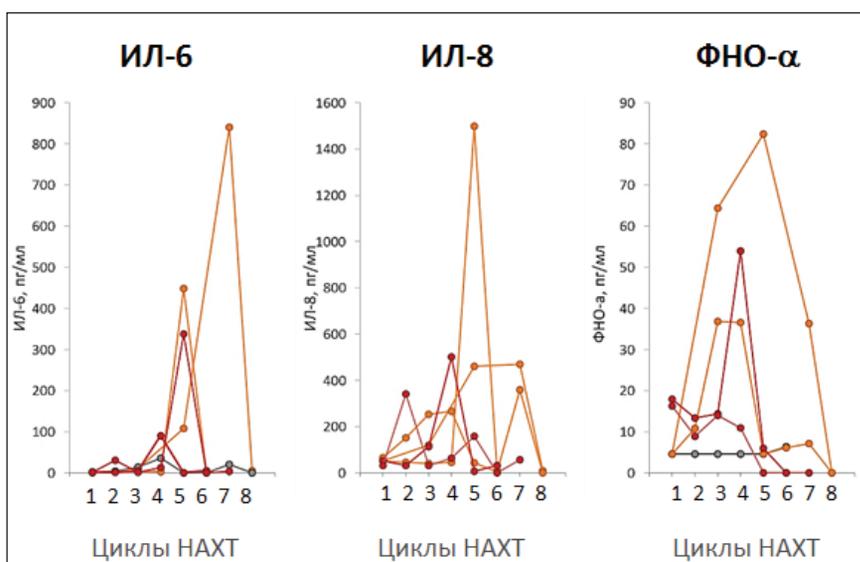


Рис. 2. Динамика изменения уровней ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α в процессе НАХТ у пациенток со слабым ответом на лечение

Концентрации ИЛ-10 и СРБ практически не изменялись в процессе НАХТ, по сравнению с исходными значениями.

Выводы

Результаты нашего пилотного исследования согласуются с экспериментальными данными о существовании СВО на введение цитостатиков. Повышение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО-α на фоне лекарственного лечения было ассоциировано со слабым ответом опухоли на НАХТ. Увеличение числа наблюдений позволит установить закономерности развития СВО у больных, получающих НАХТ, и в перспективе предложить схемы его купирования с целью улучшения отдаленных результатов лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Liu H., Li L., Gao H., Cheng M. Pathologic Complete Response and Its Impact on Breast Cancer Recurrence and Patient's Survival after Neoadjuvant Therapy: A Comprehensive Meta-Analysis. *Comput Math Methods Med.* 2021 Dec 31;2021:7545091. doi: 10.1155/2021/7545091.

3. Dolan R.D., Lim J., McSorley S.T., et al. The role of the systemic inflammatory response in predicting outcomes in patients with operable cancer: Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):16717. doi: 10.1038/s41598-017-16955-5.

4. Opzoomer J.W., Sosnowska D., Anstee J.E., et al. Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer. *Front Immunol.* 2019 Jul 17;10:1654. doi: 10.3389/fimmu.2019.01654.

5. Karagiannis G.S., Condeelis J.S., Oktay M.H. Chemotherapy-induced metastasis: Molecular mechanisms, clinical manifestations, therapeutic interventions. *Cancer Res.* 2019;79(18):4567-4576. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1147.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИННОВАЦИОННОГО КОСТНО-ЗАМЕЩАЮЩЕГО МАТЕРИАЛА В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ КОСТЕЙ

В.Ю. Соловьев, А.А. Жеравин

Институт онкологии и нейрохирургии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия

Аннотация

Цель работы – изучение возможности использования костно-замещающего материала «Рекост-М» в лечении опухолей костей. **Материал и методы.** Представлен первый опыт использования костно-замещающего материала «Рекост-М». За период с 2016 по 2021 г. проведено лечение 9 пациентам с опухолями костей в отделении онкологии ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ. Всем пациентам выполнены хирургические вмешательства в объеме внутриочаговой резекции. Реконструкция выполнялась одномоментно с использованием костно-замещающего материала. Послеоперационный период проводился стандартно, пациенты получали антибактериальную профилактику, осуществлялись перевязки. Внешняя иммобилизация в послеоперационном периоде не использовалась. Активизация пациентов осуществлялась с первых суток, вертикализация на 2-е сут. Сроки наблюдения за пациентами от 6 мес до 6 лет. **Результаты.** Интраоперационных осложнений не было. Заживление первичным натяжением, восстановление функции конечностей у всех пациентов. Осложнение послеоперационного периода выявлено в 1 случае – дислокация пластического материала в полость плечевого сустава. Повторное малоинвазивное хирургическое вмешательство по поводу дислокации позволило полностью устранить эту проблему. **Заключение.** Первый опыт использования костно-замещающего материала «Рекост-М» демонстрирует весьма положительные результаты и может быть транслирован в клиническую практику. В то же время физико-химические особенности материала требуют дальнейшего изучения результатов и проведения сравнительного анализа с традиционными методами реконструкции.

Ключевые слова: опухоли костей, костно-замещающие материалы, «Рекост-М», замещение дефектов.

THE FIRST EXPERIENCE OF USING INNOVATIVE BONE-SUBSTITUTE MATERIAL IN THE TREATMENT OF BONE TUMORS

V.Y. Solovyov, A.A. Zheravin

«E. Meshalkin National medical research center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia, Novosibirsk

Annotation

The purpose of the work. Study the possibility of using bone replacement material “Recost-M” in the treatment of bone tumors. **Material and methods.** The first experience is presented of using bone replacement material “Recost-M”. During the period from 2016 to 2021, 9 patients with bone tumors were treated at the oncology department of the “E. Meshalkin National medical research center” Ministry of Health of the Russian Federation. All patients underwent surgical interventions in the volume of intra-focal resection. Reconstruction was performed one-stage using bone replacement material. The management of the postoperative period was carried out as standard, were given antibacterial prophylaxis, bandages were carried out. External immobilization was not used in the postoperative period. Activation of patients was carried out from the first day, verticalization on the second day. The follow-up period for patients is from 6 months to 6 years. **Results.** There were no intraoperative complications. Healing by primary tension, restoration of limb function in all patients. The complication of the postoperative period was revealed in 1 case – plastic material getting into the cavity of the shoulder joint. Repeated minimally invasive surgical intervention made it possible to

completely eliminate this problem. **Conclusion.** The first experience of using bone replacement material "Recost-M" demonstrates positive results and can be transmit into clinical practice. At the same time, the physicochemical features of the material require further study of the results and comparative analysis with traditional reconstruction methods.

Key words: bone tumors, bone-substitute materials, "Recost-M", defect replacement.

Актуальность. Проблема замещения послеоперационных костных дефектов остается актуальной на протяжении многих лет. В течение последних десятилетий наиболее рациональным решением данного вопроса является замещение аутотрансплантатом, который является золотым стандартом в ортопедической практике и при лечении доброкачественных образований костей. При этом на мировом рынке существует большое количество как биологических, так и синтетических материалов, применяемых для замещения костной ткани. Из биологических материалов используются лиофилизированная костная ткань, деминерализованный костный матрикс, материалы на основе кораллов [1]. К синтетическим имплантируемым материалам относятся металлы (титан), полимеры (протакрил, палакос), пористоуглеродные соединения, керамические имплантаты. Одним из факторов, влияющих на выбор материала, является биосовместимость. Применение аутопластического материала имеет ограничение при замещении обширных дефектов. Биологические материалы склонны к резорбции и воспалительным реакциям. При этом использование синтетических материалов может способствовать снижению хирургической травмы и сокращению сроков реабилитации. В то же время имеются отрицательные стороны применения синтетических материалов, которые ограничивают их применение в практике. Так, керамика в 5 % случаев дает трофические нарушения мягких тканей и требует удаления. Титановые изделия, обладающие высокой прочностью и биосовместимостью, в то же время не решают проблему восстановления естественного рельефа дефекта [2]. Костный цемент (ПММА) на протяжении многих лет зарекомендовал себя как универсальный материал для заполнения сложных пострезекционных дефектов и для фиксации эндопротезов в кости. Материал обладает высокими прочностными характеристиками, не изменяющимися после имплантации. В то же время костный цемент из ПММА обладает определёнными недостатками:

1. Процесс полимеризации сопровождается нагревом до 70⁰ и выше, что может повредить близлежащие биологические ткани;
2. Мономер и контрастное вещество из ПММА костного цемента обладает определенной токсичностью;
3. Не является биологически активным и не подвергается деградации;
4. Добавление различной объемной доли дополнительных компонентов в костный цемент ПММА (антибиотики, серебро, гиалуроновая кислота и др.) может снизить модуль упругости Юнга, что пропорционально снижает твердость костного цемента.

Также следует сказать о грозном осложнении при цементной пластике – синдроме имплантации костного цемента (BCIS), который характеризуется гипоксией, гипотензией и потерей сознания, возникающими во время цементирования кости [3–6]. Все сказанное объясняет, почему проблема создания материала для закрытия костных дефектов, не имеющего перечисленных недостатков, остается крайне актуальной. На сегодняшний день, несмотря на обилие костно-замещающих материалов, единого подхода к выбору оптимального варианта не существует.

На отечественном рынке представлен новый костно-замещающий материал на основе полимера полиуретанового ряда «Рекост-М». Материал является отечественной разработкой. Материал отличают высокая пластичность на этапе полимеризации и низкая температурная реакция. Физико-химические свойства материала «Рекост-М» (прочность и расширение) являются более близкими к нативной костной структуре и превосходят аналогичные показатели ПММА и титана. Экспериментальные исследования продемонстрировали отсутствие выраженной воспалительной реакции в окружающих тканях, ускорение процессов репаративной регенерации и трансформации соединительной ткани в костную без стадии формирования хряща [7]. Опыт клинического применения материала ограничивается малыми выборками. Представлены результаты пластики дефектов костных стенок околоносовых пазух 33 пациентам с различной ЛОР-патологией. При анализе контрольных томограмм в послеоперационном периоде получены данные о стабильном положении имплантатов, сохранении анатомического рельефа и воздушности пазух, отсутствии переимплантного остеолитизиса [8]. Имеются положительные данные использования пластин из данного полимера для краниопластики

[5]. В отечественной литературе практически отсутствуют данные о применении костного цемента «Рекост-М» при лечении пациентов ортопедического и онкологического профиля. В нашей работе мы использовали костный цемент «Рекост-М» – полимерный материал для замещения дефектов костей конечностей.

Цель работы – изучение возможности использования костно-замещающего материала «Рекост-М» в лечении опухолей костей.

Материал и методы

В отделении онкологии ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, г. Новосибирска с 2016 по 2021 г. проведено лечение 9 пациентам с опухолями костей с использованием костно-замещающего материала «Рекост-М». Все хирургические вмешательства выполнялись после получения информированного согласия пациентов. Планирование оперативного вмешательства осуществлялось по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) пациентов. Среди пациентов – 5 мужчин, 4 женщины. Морфологические варианты: у всех пациентов первичные доброкачественные опухоли кости и опухолеподобные состояния. Локализация опухолевого поражения: метаэпифизы бедренных костей – 3 случая, плечевых костей – 2, плюсневой кости – 1, большеберцовой кости – 1, малоберцовой кости – 1, подвздошной кости – 1. Всем пациентам выполнены хирургические вмешательства в объеме внутриочаговой резекции. Во всех случаях кортикальная пластинка вне зоны доступа сохраняла свою целостность, что подтверждалось рентгенологическим контролем. Реконструкция выполнялась одновременно с использованием костно-замещающего материала. После осуществления тщательного гемостаза производилась подготовка материала путем смешивания компонентов (фторполимер, полиол в качестве отвердителя). Для придания пористой структуры материалу добавлялся ортофосфат кальция. После смешивания элементов и экспозиции в соответствии с рекомендациями изготовителя готовый материал помещался в зону дефекта. Введение материала выполнялось путем ручного заполнения или через шприц. Трепанационное отверстие временно тампонировалось для исключения выхода полимера из полости в окружающие ткани в процессе полимеризации. После визуального завершения расширения материала и уплотнения его структуры осуществлялось послойное ушивание раны. Ведение послеоперационного периода осуществлялось стандартно, пациенты получали антибактериальную профилактику, делались перевязки. Внешняя иммобилизация в послеоперационном периоде не использовалась. Активизация пациентов осуществлялась с первых суток, вертикализация – на 2-е сут. Разработка сустава на 2–3 сут, частичная опора на нижнюю конечность – через 2 нед после операции. Для осуществления контроля всем больным выполнялась рентгенография оперированного сегмента со смежным суставом. Все пациенты остаются под наблюдением онкоортопеда НМИЦ с проведением контрольных осмотров или заочного консультирования с периодичностью 1 раз в 3 мес.

Результаты и обсуждение

Все 9 пациентов находятся под наблюдением. Сроки наблюдения составляют от 6 лет до 6 мес (средний период наблюдения – 30 мес). Интраоперационных осложнений зафиксировано не было. В раннем послеоперационном периоде заживление первичным натяжением во всех случаях. Признаков воспалительной реакции в зоне оперативного вмешательства не наблюдалось ни в одном случае. Функция смежных суставов во всех случаях восстановлена полностью. Осложнения послеоперационного периода зафиксированы в одном случае из девяти (11 %). У пациентки с кистой головки плечевой кости после выполнения внутриочаговой резекции и заполнения полости материалом «Рекост-М» произошла внутрисуставная дислокация пластического материала, что было выявлено в отдаленном послеоперационном периоде. Особенностью этого случая явилось то, что рентгенологическое исследование не позволило своевременно выявить данную проблему. Пациентка в послеоперационном периоде предъявляла жалобы на сохранение болевого синдрома, что потребовало проведения ревизионного оперативного вмешательства. При артроскопии было выявлено наличие инородного тела в полости плечевого сустава. После его удаления болевой синдром был купирован, функция верхней конечности восстановлена полностью. Следует отметить ряд особенностей проведения рентгенологической оценки после реконструкции дефектов с помощью материала «Рекост-М»: рентген-прозрачность материала не позволяет в полной мере оценить степень заполнения полости, в то же время оценка состояния пограничной кости наиболее проста и удобна за счет отсутствия артефактов. Рентгенологическая динамика должна оцениваться в строгом соответствии с клинической картиной. Сохранение рентгенологических признаков остаточной полости при благополучном течении послеоперационного периода может свидетельствовать об успехе операции.

Заключение

Первый опыт использования костно-замещающего материала «Рекост-М» демонстрирует весьма положительные результаты и может быть транслирован в клиническую практику. В то же время физико-химические особенности материала требуют дальнейшего изучения результатов и проведения сравнительного анализа с традиционными методами реконструкции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровская Е.М. Использование полимерных имплантов в реконструктивной хирургии околоносовых пазух (экспериментальное исследование). Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16, № 5-4. С. 1415-1417.Т
2. Kolmogorov Yu.N., Uspensky I.V., Maslov A.N., Novikov A.E., Tarasov D.A., Myachin N.L., Goncharov A.Yu., Korzun A.S., Latypov T.F., Yadykov D.A., Balyazin-Parfenov I.V. Rekost-M bone replacement implants based on 3D modeling for closing postcraniotomy skull defects: pre-clinical and clinical studies. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 95–103, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.11>
3. Xu D., Song W., Zhang J., Liu Y., Lu Y., Zhang X., Liu Q., Yuan T., Liu R. Osteogenic effect of polymethyl methacrylate bone cement with surface modification of lactoferrin, *J. Biosci. Bioeng.*, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.04.006>
4. Теренин М.А., Ялонецкий И.З., Прасмыцкий О.Т., Тимова А.Д. Синдром имплантации костного цемента как мультидисциплинарная проблема с позиции врача-анестезиолога. *Военная медицина*. 2021. № 4 (61). С. 112-120.
5. Baig M.N., Curtin W., Callaghan M.A., Murphy C.G. Catastrophic cement reaction following cementation for megaprosthesis for proximal femoral fracture. *BMJ Case Rep.* 2017 Sep 23;2017:ber2017220158. doi: 10.1136/ber-2017-220158. PMID: 28942397; PMCID: PMC5747658.
6. Olsen F., Kotyra M., Houltz E., Ricksten S.E. Bone cement implantation syndrome in cemented hemiarthroplasty for femoral neck fracture: incidence, risk factors, and effect on outcome. *Br J Anaesth.* 2014 Nov;113(5):800-6. doi: 10.1093/bja/aeu226. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25031262.
7. Колмогоров Ю.Н., Успенский И.В., Слывяков А.Ю., Новиков А.Е. Костнозамещающий материал. Патент РФ RU 2518753. 2014. Kolmogorov Yu.N., Uspenskiy I.V., Slinyakov A.Yu., Novikov A.E. Filler material. Patent RU 2518753. 2014.
8. Покровская Е.М., Красножен В.Н. Применение материала «Рекост» для замещения послеоперационных костных дефектов стенок околоносовых пазух. *Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae*. 2015. Т. 21, № 2. С. 116-117.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ БОЛЮСОМ, ИЗГОТОВЛЕННЫМ НА 3D-ПРИНТЕРЕ

**А.А. Сорокина¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹, И.А. Милойчикова^{1,2},
С.Г. Стучебров¹**

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

В работе исследована возможность применения технологий трехмерной печати для изготовления пластиковых болюсов, пригодных для дистанционной гамма-терапии. Получены результаты по оценке эффективности поглощения гамма-излучения напечатанным пластиковым болюсом, включающим в себя элементы разной толщины, а также двумерное дозовое распределение гамма-излучения, сформированное объектом. Показано, что при увеличении толщины пластикового поглотителя растет эффективность поглощения гамма-излучения. Определено, что на границах изменения толщины объекта не возникает дополнительное рассеяние гамма-излучения. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что методы 3D-печати пригодны для изготовления болюсов для гамма-терапии.

Ключевые слова: гамма-терапия, болюс, 3D-печать, АБС-пластик, клиническая дозиметрия.

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC GAMMA RADIATION ABSORPTION EFFICIENCY BY A 3D-PRINTED BOLUS

**A.A. Sorokina¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹, I.A. Miloichikova^{1,2},
S.G. Stuchebrov¹**

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of
Sciences, Tomsk, Russia²

Abstract

This work investigates the possibility of using three-dimensional printing technologies for the manufacture of plastic boluses suitable for remote gamma therapy. The results were obtained to evaluate the efficiency of gamma radiation absorption by a printed plastic bolus, which includes elements of different thicknesses, as well as a two-dimensional dose distribution of gamma radiation formed by the object. It is shown that as the thickness of the plastic absorber increases, the absorption efficiency of gamma radiation increases. It is determined that there is no additional scattering of gamma radiation at the boundaries of the change in the thickness of the object. The results obtained allow us to conclude that 3D printing methods are suitable for the manufacture of boluses for gamma therapy.

Key words: gamma therapy, bolus, 3D-printing, ABS-plastic, clinical dosimetry.

Актуальность. На сегодняшний день онкологические заболевания являются одними из самых распространенных и опасных. [1]. Успешным методом лечения таких заболеваний является лучевая терапия пучками частиц. В данном методе используется ионизирующее излучение, которое взаимодействует с клетками злокачественного новообразования, что приводит к их гибели. Однако оказаться под разрушающим действием могут не только злокачественные клетки опухоли, но и здоровые клетки окружающих тканей. В связи с этим возникает необходимость в проведении дозиметрического планирования процедур лучевой терапии [2].

Главной целью дозиметрического планирования является создание оптимального дозного распределения в опухоли при уменьшении лучевого воздействия на здоровые ткани [1]. При лечении поверхностно расположенных новообразований необходимо использовать специальные устройства – болусы, предназначенные для формирования глубинного распределения дозы заданной конфигурации [3]. Данное устройство располагается на поверхности тела пациента и должно повторять контур его тела [4]. Болусы нашли применение при проведении фотонной лучевой терапии для уменьшения лучевых реакций кожи. Однако широкое распространения такого подхода ограничивается сложностью создания индивидуальных изделий сложной формы, изготавливаемых с учетом анатомических особенностей каждого пациента. В данной работе для изготовления таких болусов предложено использовать технологии трехмерной печати. Преимущества такого подхода заключаются в возможности быстрого изготовления изделия требуемой формы с высокой точностью, в относительно низкой стоимости используемых материалов, в простоте технологического процесса изготовления [5]. Применение подобных индивидуально изготовленных болусов позволит увеличить точность доставки дозы к очагу новообразования и снизить вероятность возникновения острых постлучевых реакций. Актуальным является исследование эффективности применения технологии послойного наплавления для изготовления индивидуальных пластиковых болусов для гамма-терапии.

Целью исследования стала оценка эффективности поглощения терапевтического гамма-излучения болусом, изготовленным на 3D-принтере.

Материал и методы

В работе с помощью метода послойного наплавления [6] на принтере Original Prusa i3 Mk3s [7] был напечатан образец из ABS-пластика, внешний вид которого изображен на рис. 1. Размеры образца 14x3x7 см, увеличение толщины на 1 см происходит с шагом в 2 см.

Облучение проводилось на гамма-терапевтическом аппарате Theratron Equinox 80, источником излучения которого является изотоп Co-60 (средняя энергия гамма-излучения – 1,25 МэВ) [8]. Размер поля облучения составил 20×10 см². Расстояние между источником излучения и поверхностью фантома (РИП) составило 78 см. Время облучения выбиралось таким образом, чтобы для открытого поля доза облучения составляла 2 Гр на глубине 2 см в фантоме. Тестовый образец пластикового болуса размещался на поверхности твердотельного тканеэквивалентного пластинчатого фантома SP33, изготовленного из ПММА [9]. Внешний вид экспериментальной установки представлен на рис. 2.

Для определения эффективности поглощения гамма-излучения пластиковым образцом использовался набор дозиметрического оборудования. Клинический дозиметр Dose-1 [10] в комплекте с цилиндрической ионизационной камерой FC65-P [11] использовались для определения изменения поглощенной дозы за элементами тестового образца разной толщины, изменяющейся от 1 до 7 см. Ионизационная камера располагалась в специальной адаптерной пластине на глубине 2 см в фантоме SP33. Для определения пространственного дозного распределения, сформированного напечатанным тестовым образцом болуса, ис-

пользовались пленочные дозиметры GafChromic EBT3 [12], которые также размещались на глубине 2 см в твердотельном фантоме. После облучения пленочные дозиметры были оцифрованы с помощью сканера EpsonPerfection V850 Pro [13]. Полученные данные были сохранены в формате TIF. Обработка данных, полученных с пленочного дозиметра, проводилась в программном обеспечении MatLab [14].

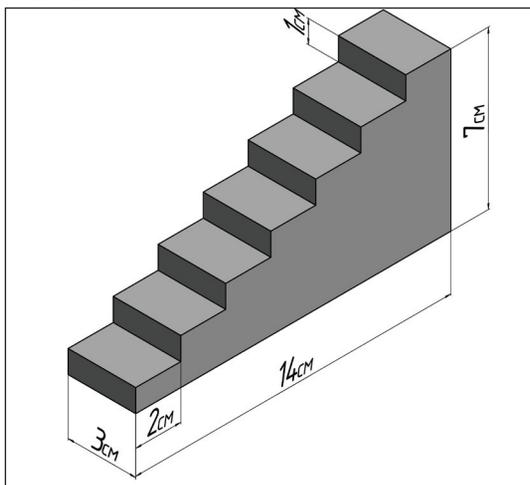


Рис. 1. Цифровая трехмерная модель пластикового тестового болюса



Рис. 2. Внешний вид экспериментальной установки

Результаты. Эффективность поглощения гамма-излучения оценивалась по изменению дозы облучения за элементами тестового образца разной толщины (рис. 3).

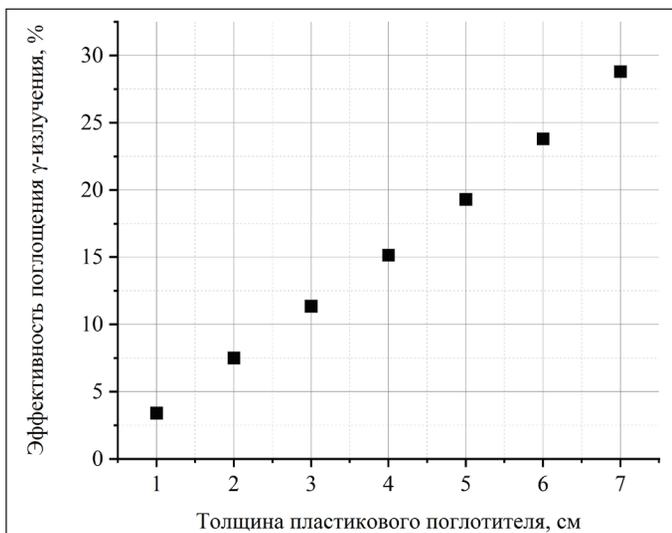


Рис. 3. Зависимость эффективности поглощения гамма-излучения от толщины элементов пластикового образца

Определено, что при увеличении толщины пластикового поглотителя эффективность поглощения гамма-излучения возрастает (рис. 3).

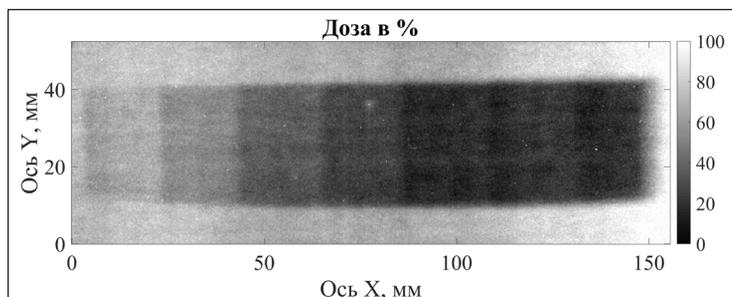


Рис. 4. Распределение дозы гамма-излучения, сформированное с помощью напечатанного тестового образца пластикового болюса

На рис. 4 представлено двухмерное распределение дозы гамма-излучения, сформированное напечатанным тестовым образцом пластикового болюса, полученное на глубине 2 см в твердотельном тканезквивалентном фантоме. Нормировка проводилась на значение дозы в открытом поле.

Из рис. 4 видно, что на границах изменения толщины объекта не возникает дополнительное рассеяние гамма-излучения.

Выводы

Показана возможность применения пластиковых болюсов, изготовленных с помощью технологии послойного наплавления, для формирования терапевтических полей гамма-излучения. Проведена оценка эффективности поглощения терапевтического гамма-излучения напечатанным болюсом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 19-79-10014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Мардынский Ю.С. Терапевтическая радиология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 704 с.
2. Климанов В.А., Крамер-Агеев Е.А., Смирнов В.В. Радиационная дозиметрия : монография / под ред. В. А. Климанова. М. : НИЯУ МИФИ, 2014. 648 с.
3. Mahdavi H., Jabbari K., Roayaei M. Evaluation of various boluses in dose distribution for electron therapy of the chest wall with an inward defect // Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India, 2016. Vol. 41, №. 1. P. 38
4. Климанов В.А. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии. Часть 1: Радиобиологические основы лучевой терапии. Радиобиологическое и дозиметрическое планирование дистанционной лучевой терапии пучками тормозного и гамма-излучения и электронами: Учебное пособие. М.: НИЯУ МИФИ, 2011. 500 с.
5. Преимущества 3D-печати для медицины [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blog.iqb.ru/3d-printing-medicine/>
6. Метод FDM [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://all3dp.com/2/fused-deposition-modeling-fdm-3d-printing-simply-explained/>
7. ORIGINAL PRUSA I3 MK3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://3dtoday.ru/3d-printers/prusa-research/original-prusa-i3-mk3>
8. Theratron Equinox 80 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.theratronics.ca/product_equinox.html
9. Фантом SP33 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://goo.su/aDMJ>
10. Клинический дозиметр Dose-1 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://all-pribors.ru/opisanie/26714-04-dose-1-25123>
11. Ионизационная камера FC65-P [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.iba-dosimetry.com/product/fc65-g-fc65-p-ionization-chambers/>
12. Пленочный дозиметр GafChromic EBT3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.gafchromic.com/gafchromic-film/radiotherapy-films/EBT/index.asp>
13. Сканер EpsonPerfection V850 Pro [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://epson.ru/catalog/scanners/epson-perfection-v850-pro/>
14. MatLab [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>

КТ-ДЕНСИТОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ ОТВЕТА ГИГАНТОКЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛИ КОСТИ НА ЛЕЧЕНИЕ ДЕНОСУМАБОМ

С.А. Табакаев, И.Г. Фролова, П.К. Ситников, А.В. Богоутдинова, Н.В. Васильев, И.И. Анисеня, Х.И. Хакимов, Д.А. Митриченко

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Существуют различные методики денситометрии костных структур. Однако не все из них применимы для оценки динамики изменения опухоли кости на этапах консервативной терапии. До настоящего времени продолжительность лечения остеомоделирующими агентами, которым является деносуаб, окончательно не определена. В исследование было включено 40 пациентов с гигантоклеточной опухолью кости до применения таргетного препарата деносуаб и на этапах реализации терапии через 3, 6 курсов. Данным пациентам была проведена визуальная оценка лучевыми методами исследования и количественная компьютерная томография с последующим сопоставлением полученных результатов с количественными данными морфологического исследования операционного материала. Показано, что на основе данных лучевых методов исследования можно судить об ответе гигантоклеточной опухоли кости на проводимую таргетную терапию деносуабом с чувствительностью 81,8 % и специфичностью 96,6 %.

Ключевые слова: денситометрия, КТ-денситометрия, гигантоклеточная опухоль кости, деносуаб.

CT-DENSITOMETRY IN ASSESSING THE RESPONSE OF A GIANT CELL TUMOR OF BONE TO TREATMENT WITH DENOSUMAB

S.A. Tabakaev, I.G. Frolova, P.K. Sitnikov, A.V. Bogoutdinova., N.V. Vasil'ev, I.I. Anisenja, H.I. Hakimov, A.D. Mitrichenko

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Science, Tomsk, Russia

Abstract

There are various techniques for densitometry of bone structures. However, not all of them are applicable to assess the dynamics of bone tumor change during the stages of conservative therapy. To date, the duration of treatment with osteomodelling agents, which is denosumab, has not been definitively determined. The study included 40 patients with giant cell tumor of bone before the use of the target drug denosumab and in the stages of implementation of therapy after 3, 6 courses. These patients underwent visual assessment of radial methods of investigation and quantitative computed tomography with subsequent comparison of the results with quantitative data of morphological examination of the surgical material. It was shown that on the basis of the data of radiological methods of investigation one can judge the response of a gigantocellular bone tumor to the ongoing targeted therapy with denosumab with sensitivity of 81.8% and specificity of 96.6%.

Key words: densitometry, CT-densitometry, giant cell tumor of bone, denosumab.

Актуальность. Гигантоклеточная опухоль кости (ГКО) является наиболее часто встречаемой доброкачественной первичной костной опухолью, частота ее встречаемости достигает 20 % [1, 2].

В последнее время для лечения ГКО появился новый генноинженерный препарат деносумаб, который обладает способностью ингибировать образование, активацию и продолжительность существования остеокластов, тем самым замедлить прогрессирование опухолевого процесса [3, 4]. Для оценки изменений в опухоли под воздействием консервативной терапии разработаны критерии RECIST1, RECIST1.1, CHOI, основанные на измерении как размеров, так и плотности образования. Однако при костных опухолях, в частности при гигантоклеточной опухоли, не происходит значимого изменения размеров в процессе лечения, а плотность зачастую, наоборот, становится выше. До настоящего времени продолжительность лечения остеомоделирующими агентами, которым является деносумаб, окончательно не определена [5]. На сегодняшний день нет разработанных методик динамического наблюдения за пациентами с гигантоклеточной опухолью кости с помощью лучевых методов исследования. Наиболее информативным методом, позволяющим оценить костную структуру, является рентгеновская компьютерная томография. Многие авторы считают, что появление периферического ободка склероза при рентгенологическом исследовании, образованного реактивной костью, служит показанием к резекции опухоли после терапии деносумабом [6–8]. Однако при визуальном анализе данных КТ порой невозможно однозначно высказаться о динамике изменений в кости.

Цель исследования – изучить возможности КТ-денситометрии у пациентов с гигантоклеточной опухолью кости для оценки динамики изменений при лечении таргетным препаратом деносумаб.

Материал и методы

Материалом для исследования явились данные результатов обследования 40 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом гигантоклеточной опухоли, получающих комбинированное лечение таргетным препаратом деносумаб с последующим хирургическим этапом. Исследования проводились до получения препарата, через 3 и 6 курсов лечения. Возраст пациентов находился в диапазоне от 27 до 59 лет, средний возраст составил $41,6 \pm 1,9$ года. Все исследования проводились на мультиспиральном компьютерном томографе Somatom Emotion 6 «Siemens». Зонами исследования был средний отдел опухоли с определением денситометрической плотности. Базовые точки располагались в каждой исследуемой зоне в следующем порядке: на уровне самой передней точки опухоли в аксиальной проекции, на уровне самой задней точки опухоли и 2 промежуточные точки в самых латеральных

отделах опухоли. Путем построения закрытых многоугольников ROI через эти точки будет исследована средняя плотность внутри многоугольника на указанных уровнях опухоли, а также рассчитан индекс относительной плотности опухоли в виде отношения среднего значения плотности опухоли к среднему значению плотности здоровой конечности на аналогичном уровне. Далее при морфологическом исследовании определялся удельный вес костной ткани в препарате и наличие/отсутствие резидуальной опухолевой ткани.

Результаты

Наиболее информативными по данным визуальной оценки компьютерной томографии были такие признаки, как: появление ободка склероза различной толщины (в 100 % случаев после 6 введений деносумаба) и ограничение мягкотканого компонента за счет формирования четких контуров. В большинстве случаев была выявлена консолидация патологического перелома (90 %). При этом изменение размеров ГКО было незначительным на этапах применения деносумаба и составило всего 2,9 %.

При КТ-денситометрии определялось увеличение среднего значения плотности от 60,8(51,4;70,4) до начала лечения до 171,1(145;201,3) после 6 введений ($p < 0,001$). Динамика изменения индекса относительной плотности опухоли была от 0,49(0,4;0,57) до 1,14(0,98;1,34) ($p < 0,001$). При сравнительном анализе денситометрических показателей и данных морфологического исследования выявлена наиболее сильная прямая связь между средним значением плотности и индексом относительной плотности опухоли после 6 введений деносумаба и количеством костной ткани ($r = 0,903$ и $r = 0,876$ соответственно, $p < 0,001$).

Для оценки клинической информативности полученных значений денситометрической плотности опухоли на этапах лечения деносумабом, которые могут служить прогностическими критериями оценки терапевтического патоморфоза с позиций лучевых методов исследования, был применен индекс Юдена. Для среднего значения плотности опухоли после 6 введений деносумаба он был максимальным в точке 139,5 HU, а для индекса относительной плотности опухоли после 6 введений – в точке 0,97. С учетом этих данных для прогнозирования степени лечебного патоморфоза, основанного на учете наличия резидуальной опухолевой ткани, чувствительность методики КТ-денситометрии составила 81,8 %, специфичность 96,6 %, а точность составила 92,5 %. Прогностическая ценность положительного результата, таким образом, составила 90 %, отрицательного результата 93 %.

Выводы

Таким образом, применение метода компьютерной томографии позволяет оценивать динамику изменений участка поражения кости гигантоклеточной опухолью под воздействием таргетного препарата деносумаб. При этом, учитывая визуальные изменения в виде полностью сформированного ободка склероза и изменение измеренных денситометрических показателей опухоли и рассчитанных индексов, возможна оценка ожидаемого терапевтического патоморфоза. Наиболее значимыми из денситометрических показателей оказались: среднее значение плотности и индекс относительной плотности опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huh A. et al. Denosumab Treatment for a Residual Giant Cell Tumor of the Clivus: A Case Report and Review of the Literature // *World Neurosurgery* 118: 98-101, October 2018.
2. Блудов А.Б., Неред А.С., Замогилина Я.А., Кочергина Н.В. Гигантоклеточная опухоль кости // *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи*. 2014. № 1. С. 16-34.
3. Герштейн Е. С., Тимофеев Ю. С., Зуев А. А., Кушлинский Н. Е. Лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG и ее роль при первичных новообразованиях костей (анализ литературы и собственные результаты). // *Успехи молекулярной онкологии*. 2015. Т.2, №3. С.51-59.
4. Дыдыкина П.С., Петрова Е.В., Дыдыкина И.С. Динамика клинико-рентгенологических показателей на фоне терапии деносумабом у больных ревматоидным артритом, получающих глюкокортикоиды: предварительные результаты. *Научно-практическая ревматология*. 2015. Т.4, №53, С.397–402. DOI: 10.14412/1995-4484-2015-397-402.
5. Манзюк Л.В., Базрова С.Г., Конт М.В., Кутукова С.И., Семиглазова Т.Ю. Использование остеомодифицирующих агентов для профилактики и лечения патологии костной ткани при злокачественных новообразованиях. // *RUSSCO Практические рекомендации*. – 2017. – Т.7 (3). – С.477-485. DOI:10.18027 / 2224-5057-2017-7-3s2-477-485.
6. Branstetter D.G., Nelson S.D., Manivel J.C., Blay J.Y., Chawla S., Thomas D.M. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. // *Clin Cancer Res*. 2012, №18, P.4415–4424.
7. Rekhi B., Verma V., Gulia A., Jambhekar N.A., Desai S., Juvekar S.L. Clinicopathological features of a series of 27 cases of post-denosumab treated giant cell tumors of bones: a single institutional experience at a tertiary cancer referral centre, India. // *Pathol Oncol Res*. 2017. №23. P.157–164. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0123-0>.
8. Rutkowski P., Gaston L., Borkowska A., Stacchiotti S., Gelderblom H., Baldi G.G. Denosumab treatment of inoperable or locally advanced giant cell tumor of bone - multicenter analysis outside clinical trial. // *Eur J Surg Oncol*. 2018, №44, P.1384–1390. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.03.020>.

ВЛИЯНИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА НА УРОВЕНЬ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЖИВОТНЫХ С АЛЬВЕОЛЯРНЫМ РАКОМ ПЕЧЕНИ

С.В. Трофимова, Л.К. Лисаченко

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

Аннотация

В работе изучен уровень эндогенной интоксикации в крови и моче интактных животных и животных с экспериментальным альвеолярным раком печени после воздействия плазмы искрового разряда. Установлено, что воздействие излучением плазмы не вызывает значимых изменений концентрации веществ низкой и средней молекулярной массы в организме интактных животных. В плазме крови и моче крыс с экспериментальным раком печени РС-1 концентрация веществ низкой и средней молекулярной массы снижалась на 38–50 % после воздействия.

Ключевые слова: излучение плазмы искрового разряда, эндогенная интоксикация, вещества низкой и средней молекулярной массы, рак печени.

EFFECT OF SPARK DISCHARGE PLASMA RADIATION ON THE LEVEL OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN INTACT ANIMALS AND ANIMALS WITH ALVEOLAR LIVER CANCER

S.V. Trofimova, L.K. Lisachenko

National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

Annotation

The level of endogenous intoxication in the blood and urine of intact animals and animals with experimental alveolar liver cancer after exposure of spark discharge plasma was studied in this work. It has been established that exposure of plasma radiation does not cause significant changes in the concentration of substances of low and medium molecular weight in the body of intact animals. In the blood plasma and urine of rats with experimental liver cancer RS-1, the concentration of substances of low and medium molecular weight decreased by 38-50% after exposure.

Key words: spark discharge plasma radiation, endogenous intoxication, substances of low and medium molecular weight, liver cancer.

Актуальность. В последние два десятилетия интерес ученых к биологическим эффектам газоразрядной плазмы неуклонно растет. Одним из перспективных направлений является использование плазменных технологий в качестве противоопухолевой терапии. К настоящему моменту показан цитотоксический эффект плазмы в отношении различных опухолевых клеточных линий: рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, папиллярный рак щитовидной железы и др. [1] В процессе формирования разряда происходит генерация активных форм кислорода и азота: H_2O_2 , HO_2^\bullet ; ионов NO_3^- и NH_4^+ , пероксинитрит [2]. Результатом действия этих молекул является окислительное повреждение липидов, белков и нуклеиновых кислот, увеличение концентрации кальция в цитозоле, нарушение работы митохондрий, гиперпродукция ими АФК, дисфункция митохондриального дыхательного комплекса [3]. Можно предположить, что воздействие газоразрядной плазмы на организм может не только оказывать цитотоксическое действие на малигнизированные клетки, но и усугублять процессы эндогенной интоксикации, которыми сопровождается развитие опухоли, обусловленное усилением катаболических процессов, активацией протеолиза, накоплением продуктов окисления биомолекул, на фоне нарушения процессов детоксикации и экскреции.

Цель исследования – изучение уровня эндогенной интоксикации в организме intactных крыс и крыс с трансплантированной опухолью желчных протоков печени после воздействия излучением плазмы искрового разряда.

Материал и методы

Генерация искрового разряда (излучения плазмы разряда) проводилась импульсным устройством, имеющим следующие характеристики: 100 мкс – длительность одного импульса, 11 кВ – напряжение, 5.9×10^{-2} Дж – энергия в одном импульсе, 10 Гц – частота импульсов. Плазменный шнур искрового разряда излучал в широком оптическом диапазоне 200–800 нм с максимумом при 220 нм. Эксперимент проведен на 15 белых беспородных крысах: 6 intactных крыс и 9 крыс с трансплантированной экспериментальной опухолью линии РС-1, которые были разделены на 4 экспериментальные группы: intactные крысы без обработки (n=3); intactные крысы, обработанные излучением плазмы искрового разряда (n=3); крысы с трансплантированной экспериментальной опухолью линии РС-1 без обработки (n=3); крысы с трансплантированной экспериментальной опухолью линии РС-1, обработанные излучением плазмы искрового разряда (n=6). Обработка животных излучением плазмы (ИР-10) проводилась в одном помещении, в одно и то же время и в одинаковых условиях. В экспериментальных группах животных обрабатывали в течение 5 мин на 31, 32 и 33-и сут после трансплантации опухолевых клеток. Через 2 сут после окончания серии обработок гепаринизированных животных декапитировали под эфирным наркозом. Для анализа забирали кровь и мочу. Для получения плазмы и эритроцитов гепаринизированную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Содержание веществ средней и низкой молекулярной массы (ВНиСММ) определяли в моче, эритроцитах и плазме по методу М.Я. Малаховой [4]. Спектрофотометрирование экстрактов выполняли при длинах волн 254, 260 и 280 нм. При длине волны 254 нм определяется токсическая фракция, состоит из гидрофобных токсинов, обладающих высоким сродством к биологическим структурам, содержит небелковые продукты различной природы. Нуклеарная фракция (260 нм) представлена продуктами разрушения нуклеопротеидов (белки-гистоны, продукты разрушения ДНК). Ароматическая фракция определяется при длине волны 280 нм и состоит из продуктов неполного распада белков, содержащих ароматические аминокислоты (ароматические аминокислоты, гормоны) [5]. Концентрацию ВНиСММ выражали в условных единицах (усл.ед.) оптической плотности.

Результаты

По результатам исследований установлено, что после воздействия на intactных животных излучением плазмы искрового разряда уровень ВНиСММ в моче, эритроцитах и плазме значительно не изменялся (рис. 1–3). После воздействия излучения плазмы на крыс с раком печени наиболее значимые изменения были выявлены в моче и плазме крови. В моче относительная концентрация ВНиСММ снижалась на 40 % (рис. 1), в плазме крови на 38–50% (рис. 3). Максимальное снижение выявлено во фракции, состоящей из ароматических аминокислот.

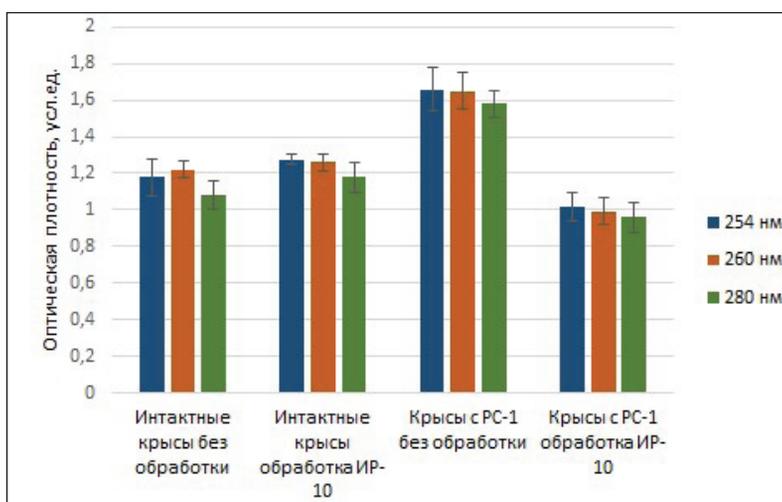


Рис. 1 Показатели веществ низкой и средней молекулярной массы в моче intactных животных и животных с РС-1 до и после обработки излучением плазмы искрового разряда

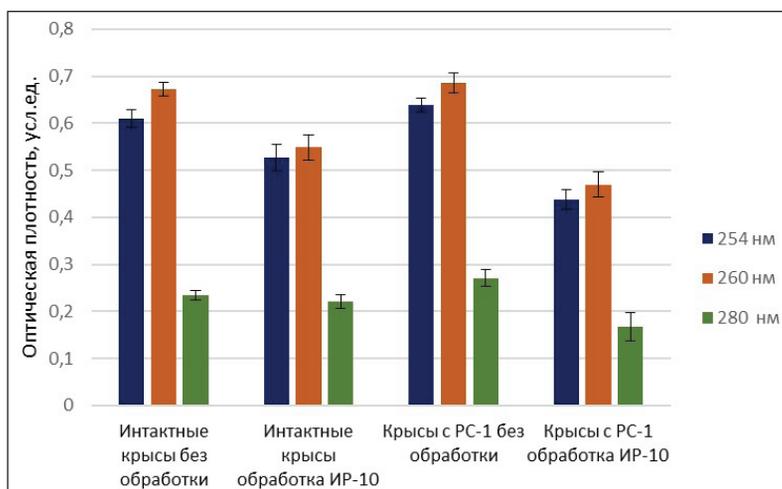


Рис. 2 Показатели веществ низкой и средней молекулярной массы в эритроцитах intactных животных и животных с РС-1 до и после обработки излучением плазмы искрового разряда

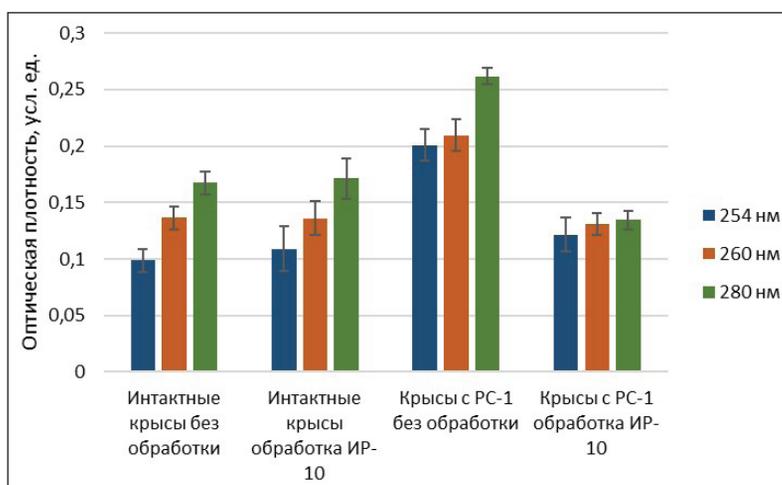


Рис. 3 Показатели веществ низкой и средней молекулярной массы в плазме крови intactных животных и животных с РС-1 до и после обработки излучением плазмы искрового разряда

Заключение

Таким образом, влияние излучения плазмы искрового разряда с изученными характеристиками и схемой воздействия не приводит к увеличению концентрации веществ низкой и средней молекулярной массы в организме intactных животных и животных с экспериментальным раком печени РС-1. Зарегистрировано снижение уровня эндогенной интоксикации в организме животных с неопластическим процессом после воздействия плазмы искрового разряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubuc A., Monsarrat P., Virard F., Merbahi N., Sarrette J.P., Laurencin-Dalricieux S., Cousty S. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review // Ther Adv Med Oncol. 2018. Vol. 10
2. Иванова И.П., Трофимова С.В., Карпель Вель Лейтнер Н., Аристова Н.А., Архипова Е.В., Бурхина О.Е., Сысоева В.А., Пискарев И.М. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках // Современные технологии в медицине. 2012. №2. С. 20-30
3. Semmler M.L., Bekeschus S., Schafer M., Bernhardt T., Fischer T., Witzke K., Seebauer C., Rebl H., Grambow E., Vollmar B., et al. Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (CAP) in cancer treatment // Cancers. 2020. Vol. 12. С. 269
4. Малахова М.Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме // Эфферентная терапия. 2000. Т. 6, № 4. С. 3–14.
5. Акименко М.А., Колмакова Т.С., Оксенко О.С., Калмыкова Ю.А., Смирнова О.Б. Особенности развития эндогенной интоксикации при экспериментальной обструкции мочевыводящих путей // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2019. № 3. С. 297-305.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕПОСРЕДСТВЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ПЕРЕНОСИМОСТИ ПРЕОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ВЕРХНЕАМПУЛЯРНОГО ОТДЕЛА ПРЯМОЙ КИШКИ

У.З. Тураханов, А.С. Тарасова, А.Ю. Добродеев, Д.Н. Костромицкий

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Колоректальный рак в настоящее время является третьим наиболее часто диагностируемым раком. У одной трети пациентов рак расположен в прямой кишке. Основным методом лечения рака прямой кишки на сегодняшний день является неoadъювантная химиотерапия на основе фторпиримидинов с лучевой терапией, с последующей операцией тотального мезоректального иссечения плюс адъювантная химиотерапия. Хотя лучевая химиотерапия снижает риск местного рецидива, она не улучшает безрецидивную или общую выживаемость. Кроме того, химиотерапия в комбинации с лучевой терапией вызывает нарушения мочеполовой функции. В связи с частыми осложнениями после предоперационной химиолучевой терапии при местно-распространенном верхнеампулярном раке прямой кишки авторы данного исследования предлагают альтернативный вариант лечения в виде 3 курсов предоперационной химиотерапии по схемам XELOX или FOLFOX-4. В рамках исследования, где 12 пациентов получили 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме XELOX и 24 пациента получили 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме FOLFOX-4, помимо эффективности проведенной химиотерапии, оценивались частота и варианты возникающих осложнений. По результатам проведенного исследования была показана высокая эффективность предлагаемых вариантов лечения местнораспространенного верхнеампулярного рака прямой кишки и относительно редкая частота осложнений. Сравнение эффективности и частоты возникших осложнений предоперационной химиотерапии показало, что 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме FOLFOX-4 оказались более эффективными и реже вызывали осложнения, чем 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме XELOX.

Ключевые слова: рак прямой кишки, предоперационная химиотерапия, комбинированное лечение.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY AND TOLERABILITY OF PREOPERATIVE CHEMOTHERAPY IN RECTAL CANCER.

U.Z. Turakhanov, A.S. Tarasova, A.Yu. Dobrodeev, D.N. Kostromitsky

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

Annotation

Colorectal cancer is currently the most commonly diagnosed cancer. In 1/3 cases, the cancer was located in the rectum. The main method of treatment for rectal cancer today is neoadjuvant chemotherapy based on fluoropyrimidines with radiotherapy, with total mesorectal excision plus adjuvant chemotherapy. Although radiochemotherapy identifies the risk of recurrence, it does not improve relapse-free or extended survival. In addition, chemotherapy as a result of radiation therapy caused complications such as impaired genitourinary function. Due to frequent complications after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced upper ampullar rectal cancer, the authors of this study propose an alternative treatment option in the form of three courses of preoperative chemotherapy according to XELOX or FOLFOX-4 regimens. In the framework of the study, where 12 patients received 3 courses of preoperative chemotherapy according to the XELOX and 24 patients received 3 courses of preoperative chemotherapy according to the FOLFOX-4, in addition to the effectiveness of chemotherapy, the frequency and variants of emerging complications were evaluated. According to the results of the study, the proposed options for the treatment of locally advanced upper ampullar rectal cancer and relatively rare frequent complications were shown to be highly effective. As a result of comparing the efficacy and incidence of complications of preoperative chemotherapy, three courses

of preoperative chemotherapy according to the FOLFOX-4 were more effective and less likely to cause complications than 3 courses of preoperative chemotherapy according to theXELOX.

Key words: rectal cancer, preoperative chemotherapy, combination therapy.

Актуальность. Рак прямой кишки – распространенное заболевание и составляет 4–6 % всех злокачественных опухолей человека [1]. Во всем мире отмечается рост заболеваемости раком прямой кишки, наиболее выраженный в экономически развитых странах. В связи с бессимптомным течением на ранних стадиях в большинстве случаев диагноз устанавливается на поздних стадиях, которые требуют комбинированных методов лечения [2, 3]. При местнораспространенном раке прямой кишки в последние годы используется предоперационная химиолучевая терапия (ХЛТ) [4], которая позволяет сократить частоту местных рецидивов и улучшить выживаемость больных [5, 6]. Однако в случае поражения верхнеампулярного отдела прямой кишки применение ХЛТ ограничено из-за высокого риска развития лучевых реакций и осложнений [7, 8], что побуждает к поиску новых вариантов комбинированного лечения [9, 10].

Цель – изучить и сравнить непосредственную эффективность и переносимость предоперационной химиотерапии (ХТ) по схемам FOLFOX-4 и XELOX у больных раком верхнеампулярного отдела прямой кишки.

Материал и методы

С 2018 г, в НИИ онкологии Томского НИМЦ проводится пилотное проспективное исследование, в которое было включено 34 больных раком верхнеампулярного отдела прямой кишки. Общее состояние больных по шкале ECOG 0–1. Средний возраст больных составил 59,5 лет. Соотношение мужчин и женщин 7 : 3. Распространенность опухолевого процесса: mT4AN1M0 – 22 (64,7 %), mT4AN0M0 – 5 (14,7 %) и mT4N1M0 – 3(8,8 %), mT3N0M0 (при наличии негативных факторов прогноза – поражение мезоректальной фасции (CRM+) или низкая степень злокачественности опухоли) – 4 (11,8 %). В рамках комбинированного лечения 24 больным проводилось 3 курса предоперационной ХТ по схеме FOLFOX-4 и радикальная операция и 12 больным – 3 курса предоперационной ХТ по схеме XELOX и радикальная операция. Интервал между курсами ХТ составлял 2 нед, хирургическое лечение после завершения предоперационной ХТ выполнялось через 3–4 нед.

Результаты

Предоперационную ХТ в запланированном объеме получили все больные. В результате ХТ по схеме FOLFOX-4 по данным МРТ отмечено снижение стадии заболевания (downstaging) у 16 (67,2 %) больных. Общая токсичность предоперационной ХТ по схеме FOLFOX-4 составила 54,6 % и включала: лейкопению I–II ст. – 8 (33,6 %), тошноту/рвоту – 4 (16,8 %) и стоматит I ст. – 1 (4,2 %). В результате ХТ по схеме XELOX по данным МРТ отмечено снижение стадии заболевания (downstaging) у 7 (58,3 %) больных. Общая токсичность предоперационной ХТ по схеме XELOX составила 50,1 % и включала: лейкопению I ст. – 2 (16,8 %), тошноту/рвоту – 4 (33,6 %). Медиана времени от завершения ХТ до начала хирургического лечения – 25 дней (22–28). Операции у всех больных проведены в объеме лапароскопической передней резекции прямой кишки (R0). У пациентов, получивших 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме XELOX, в послеоперационном периоде осложнения I–IIIb ст. по Clavien–Dindo возникли у 2 (16,8 %) больных: атония мочевого пузыря – 1 (8,4 %), пневмония – 1 (8,4 %). У пациентов, получивших 3 курса предоперационной химиотерапии по схеме FOLFOX-4, в послеоперационном периоде осложнения I–IIIb ст. по Clavien–Dindo возникли у 2 (8,4 %) больных: недостаточность анастомоза – 1 (4,2 %) и внутрибрюшинное кровотечение – 1 (4,2 %). Послеоперационной летальности не было.

Выводы

Предоперационная ХТ по схеме FOLFOX-4 при раке верхнеампулярного отдела прямой кишки оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, характеризуется более удовлетворительной переносимостью, чем предоперационная ХТ по схеме XELOX. Обе схемы ХТ не оказывают отрицательного влияния на течение периоперационного периода. Непосредственные показатели при использовании предоперационной ХТ по схеме FOLFOX-4 являются более обнадеживающими, однако отдаленные результаты лечения требуют дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с.
2. McCarthy K., Pearson K., Fulton R., Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer // *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012;12:CD008368. DOI: 10.1002/14651858.CD008368.pub2
3. Ferrari L., Fichera A. Neoadjuvant chemoradiation therapy and pathological complete response in rectal cancer // *Gastroenterol. Rep.* 2015; 3(4): 277–88. DOI: 10.1093/gastro/gov039
4. Расулов А.О., Мамедли З.З., Кузьмичев Д.В. с соавт. Органосохраняющее лечение рака прямой кишки // *Онкологическая колопроктология*. 2016; 6(4): 13-17. doi.org/10.17650/2220-3478-2016-6-4-13-17
5. Peeters K.C., van de Velde C.J., Leer J.W. et al. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients – a Dutch colorectal cancer group study // *J. Clin. Oncol.* 2005 Sep 1;23(25):6199-206. DOI: 10.1200/JCO.2005.14.779
6. Stephens R.J., Thompson L.C., Quirke P. et al. Impact of short-course preoperative radiotherapy for rectal cancer on patients' quality of life: data from the Medical Research Council CR07/National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group C016 randomized clinical trial // *J. Clin. Oncol.* 2010 Sep 20;28(27):4233-9. doi: 10.1200/JCO.2009.26.5264
7. Koizumi M., Yamada T., Shinji S. et al. Feasibility of Neoadjuvant FOLFOX Therapy Without Radiotherapy for Baseline Resectable Rectal Cancer // *In Vivo*. 2018 Jul-Aug;32(4):937-943. doi: 10.21873/invivo.11332
8. Rödel C., Graeven U., Fietkau R. et al. German Rectal Cancer Study Group. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial // *Lancet Oncol.* 2015. - Vol.16(8).-P. 979-989. doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00159-X
9. Schrag D., Weiser M.R., Goodman K.A. et al. Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: a pilot trial // *J. Clin. Oncol.* 2014 Feb 20;32(6):513-8. doi: 10.1200/JCO.2013.51.7904
10. Cercek A., Weiser M.R., Goodman K.A. et al. Complete pathologic response in the primary of rectal or colon cancer treated with FOLFOX without radiation // *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28:15 suppl, 3649-3649.

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ПЛАЗМЕННЫХ СТРУЙ НА ОПУХОЛЕВЫЕ И НОРМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

А.А. Фролова^{1,2}, В.О. Нехорошев³

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Институт сильноточной электроники СО РАН, г. Томск, Россия³

Аннотация

Использование низкотемпературной плазмы в терапии рака становится все более актуальным, поскольку она обладает противоопухолевым эффектом и не требует соблюдения специальных условий. Данные литературы показали, что низкотемпературная плазма способна избирательно подавлять пролиферативную активность опухолевых клеток как *ex vivo*, так и *in vivo*, не затрагивая нормальные ткани. Однако данные о механизмах действия низкотемпературной плазмы на опухолевые и нормальные клетки не изучены, понимание возможных механизмов действия позволит определить сигнальные пути, вовлеченные в клеточный ответ на плазменную обработку, что может открыть новые перспективы в исследованиях терапии злокачественных новообразований. В настоящей работе было изучено влияние низкотемпературной плазмы на опухолевые клетки рака шейки матки и простаты, а также нормальные клетки – фибробласты китайского хомячка. Было показано, что после плазменной обработки гибель опухолевых клеток достигала 85 % в отличие от 5 % у нормальных клеток. При этом преимущественным типом клеточной гибели являлся процесс апоптоза. Уровень активных форм кислорода в опухолевых клетках после воздействия плазменными струями увеличивался уже через 5 мин и не восстанавливался до исходного значения. У нормальных клеток уровень активных форм кислорода возвращался к исходному состоянию через 60 мин, что свидетельствует о высокой активности их антиоксидантной системы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения низкотемпературных плазменных струй в терапии рака, а также необходимости дальнейших исследований в данной области.

Ключевые слова: опухолевые клетки, плазменные струи, низкотемпературная плазма, АФК, апоптоз.

SELECTIVE EFFECT OF LOW-TEMPERATURE PLASMA JETS ON TUMOR AND NORMAL CELLS

A.A. Frolova^{1,2}, V.O. Nechoroshev³

Cancer Research Institute Tomsk NRC RAS, Tomsk, Russia¹

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Institute of High Current Electronics SB RAS, Tomsk, Russia³

Annotation

The use of low-temperature plasma in cancer therapy is becoming increasingly relevant, since it has an antitumor effect and does not require compliance with special conditions. Literature data have shown that low-temperature plasma is able to selectively suppress the proliferative activity of tumor cells both *ex vivo* and *in vivo*, without affecting normal tissues. However, data on the mechanisms of action of low-temperature plasma on tumor and normal cells have not been studied, an understanding of the possible mechanisms of action will allow us to determine the signaling pathways involved in the cellular response to plasma treatment, which may open up new prospects in research on the therapy of malignant neoplasms. In this work, the effect of low-temperature plasma on tumor cells of cervical and prostate cancer, as well as normal fibroblast cells of the Chinese hamster was studied. It was shown that after plasma treatment, the death of tumor cells reached 85%, as opposed to 5% in normal cells. At the same time, the predominant type of cell death was the process of apoptosis. The level of reactive oxygen species in tumor cells after exposure to plasma jets increased after 5 minutes and did not recover to the initial value. In normal cells, the level of reactive oxygen species returned to its initial state after 60 minutes, which indicates a high activity of their antioxidant system. The results obtained indicate the prospects of using low-temperature plasma jets in cancer therapy, as well as the need for further research in this area.

Key words: tumor cells, plasma jets, low-temperature plasma, ROS, apoptosis.

Актуальность. Рак – одна из основных причин смертности населения как РФ, так и других стран мира [1]. Как правило, для лечения злокачественных новообразований используют радиацию как в комплексе с химиотерапией или с хирургическим вмешательством, так и отдельно. Радиация приводит к продукции активных форм кислорода (АФК), которые могут индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, однако от действия радиации страдают и нормальные ткани, окружающие опухоль, а также клетки кровяной и лимфатической системы. С этой точки зрения, необходимо использовать другой физический фактор воздействия, позволяющий контролировать концентрацию АФК в организме, оказывая противоопухолевое действие. Таким фактором является низкотемпературная плазма, с помощью которой можно получить ионизованный газ, богатый различными соединениями кислорода, азота и другими, в зависимости от рабочего газа.

В последние десятилетия активно исследуется действие низкотемпературной плазмы в биомедицине, в частности в онкологии. В плазме могут образовываться АФК, способные усиливать состояние окислительного стресса. Недавние исследования показали, что опухолевые клетки продуцируют больше АФК и, следовательно, больше подвержены влиянию окислительного стресса по сравнению с нормальными клетками, что делает их более подходящими для воздействия через АФК [2]. Изменения уровней внутриклеточных АФК после воздействия плазмой могут модифицировать или активировать сигнальные пути, связанные с оксидативным стрессом, аутофагией, лекарственной устойчивостью и клеточной гибелью [3].

Исследования противоопухолевого действия низкотемпературной плазмы продемонстрировали снижение роста опухолевых клеток рака молочной железы, яичников, кожи, предстательной железы, легких и мозга в исследованиях *ex vivo* и *in vivo* [4]. Кроме того, было отмечено повышение чувствительности опухолей к химиотерапевтическим препаратам после плазменной обработки [3].

Таким образом, низкотемпературная плазма обладает большим потенциалом для использования в качестве терапевтического средства в онкологии. Однако к настоящему моменту времени не установлен оптимальный режим работы генератора плазмы, оказывающий максимальный противоопухолевый эффект. Кроме того, остается неясным механизм избирательного действия плазменных струй, связанный с уничтожением опухолевых клеток и высокой выживаемостью нормальных клеток.

Цель исследования – изучение механизма действия низкотемпературной плазмы атмосферного давления на опухолевые и нормальные клетки.

Материал и методы

Для реализации цели исследования была использована установка, созданная в ИСЭ СО РАН, удовлетворяющая следующим условиям: отсутствие электромагнитных полей, ультрафиолетового излучения и нагрева на выходе из системы. В качестве опухолевых клеточных линий были использованы клетки HeLa (рака шейки матки), РС-3 (рака простаты), а в качестве нормальных – СНО-К1 (фибробласты китайского хомячка). Обработка клеток производилась в ранее подобранных режимах воздействия [5], а именно: частота следования импульсов напряжения 2 кГц, время экспозиции 120 с. Клетки культивировались в стандартных условиях в чашках Петри, обработка производилась через 24 ч после посадки.

Для оценки пролиферативной активности клеток на 1, 5 и 7-е сут после плазменной обработки использовался метод МТТ-теста. Значения оптической плотности растворов были получены на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Индукция апоптоза в культивируемых опухолевых клетках анализировалась с помощью набора для детекции апоптоза *in situ* Аннексин V (ThermoFisher). Исследование проводилось с помощью проточного цитофлуориметра через 24 ч после плазменной обработки клеток. Наличие внутриклеточных АФК оценивалось с помощью набора для определения АФК (Invitrogen), анализ проводился также на проточном цитофлуориметре через 5, 30 и 60 мин после плазменной обработки.

Результаты

Результаты проведенных экспериментов показали ингибирование пролиферативной активности опухолевых клеток в ответ на воздействие плазменными струями атмосферного давления. При проведении МТТ-теста наблюдалось снижение пролиферации клеток HeLa до 75 % по сравнению с группой контроля, данный эффект был наиболее выражен на 5-е сут и составил 80 %. Снижение роста опухолевых клеток РС-3 было максимальным на 5-е сут после воздействия, исследуемый показатель достигал 85 %. У клеток СНО-k1 не наблюдалось снижения их пролиферативной активности, клеточная гибель не превышала 5 %, что свидетельствует о способности нормальных клеток противостоять действию активных форм кислорода.

При изучении типа клеточной гибели было показано, что процент апоптотических клеток среди фибробластов, как и в МТТ-тесте, не превышал 4–5 % через 24 ч после облучения. В то же время в опухолевых клетках HeLa и РС-3 количество апоптотических клеток достигало 80 и 85 % соответственно (рис. 1).

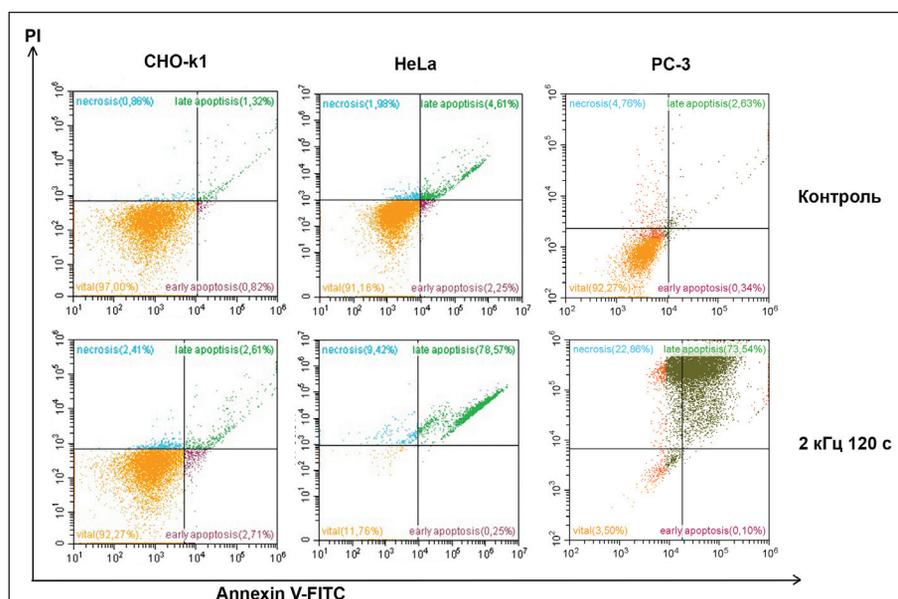


Рис. 1. Процент апоптотических и некротических клеток HeLa, РС-3, СНО-k1 через 24 ч после обработки низкотемпературной плазмой, подсчитанный методом проточной цитометрии

Для изучения механизма действия плазменных струй проводился анализ уровня АФК внутри опухолевых и нормальных клеток. Было обнаружено, что после плазменной обра-

ботки опухолевые клетки HeLa, и PC-3 не способны справиться с высокой концентрацией АФК и восстановить ее до первоначального уровня. Однако нормальные клетки CHO-k1 выводят лишние АФК уже через 30 мин после облучения, а через 60 мин данный показатель достигает значений контрольной группы. Это подтверждает избирательное действие низкотемпературной плазмы на опухолевые клетки.

Заключение

Таким образом, мы показали, что низкотемпературная плазма ингибирует пролиферацию опухолевых клеток на 85 % за счет активации в них процесса апоптотической гибели, но при этом не оказывает существенного влияния на нормальные клетки. Полученные данные свидетельствуют о том, что низкотемпературная плазма является потенциальным противоопухолевым агентом, поскольку влияет на важные этапы роста и развития опухолевых клеток.

Работа поддержана грантом УМНИК (№16126ГУ/2020).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sung H., Ferlay J. [et al.] Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021. Vol. 71(3). P. 209–249.
2. Zhou, Y., Hileman E.O. [et al.] Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents // Blood. 2003. Vol. 101. P. 4098–4104.
3. Hirst A.M., Frame F.M., Arya M. [et al.] Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future // Tumor Biology. 2016. Vol. 37. P. 7021–7031.
4. Keidar M., Walk R., Shashurin A. [et al.] Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy // British journal of cancer. 2011. V.105(9). P. 1295–1301.
5. Евтина А.А., Булдаков М.А., Нехорошее В.О. [и др.] Влияние низкотемпературных плазменных струй на пролиферацию опухолевых клеток // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. Т. 6, № 3. С. 464–471.

ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ КАРКАСА ГРУДНОЙ СТЕНКИ

Х.И. Хакимов, И.И. Анисеня, А.В. Богоутдинова, П.К. Ситников, Е.Б. Топольницкий, С.А. Табакаев

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Представлен клинический опыт хирургического лечения с реконструкцией каркаса грудной стенки при обширных поражениях грудной клетки сверхэластичными каркасными 3D-модулями и искусственными ребрами из никелида титана, а также случай без каркасной пластики.

Ключевые слова: опухоли грудной стенки, торакальная хирургия, каркасная пластика, 3D-импланты, сверхэластичность, эндопротез ребра из никелида титана.

ONCOLOGICAL AND FUNCTIONAL RESULTS IN THE RECONSTRUCTION OF THE THORAX FRAME

Kh. I. Khakimov, I.I. Anisenya, A.V. Bogoutdinova, P.K. Sitnikov, E.B. Topolnitskiy, S.A. Tabakaev

Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Russia, Tomsk

Annotation

The article presents the clinical experience of surgical treatment with the reconstruction of the chest wall framework for extensive lesions of the chest wall, who underwent operations with the framework reconstruction of a postoperative defect with superelastic 3D framework modules and artificial titanium nickelide ribs, as well as a case with no framework plastics.

Key words: chest wall tumors, thoracic surgery, frame plastic, 3-D implants, superelasticity, titanium nickelide rib endoprosthesis.

Актуальность. Первичные злокачественные опухоли грудной стенки встречаются достаточно редко и составляют от 1 до 3 % от всех опухолей, из них до 45 % – это саркомы мягких тканей, до 55 % – костные саркомы; гораздо большая часть злокачественных образований (до 97 %) вторичные – метастазы и опухоли из прилегающих анатомических образований, распространившиеся на грудную стенку [1]. И те и другие опухоли обладают инвазивным ростом, сопровождаются выраженным болевым синдромом, а нередко и кровотечением, приносят страдания пациентам и требуют комбинированного лечения, основным компонентом которого является хирургический [2, 3]. При резекции трех ребер и более или по площади более 100 см² возникает выраженная флотация, что приводит к парадоксальному дыханию. Формируется фрагмент грудной стенки в виде нестабильного реберного окна удерживаемого только кожей и мягкими тканями, не участвующего в её физиологических движениях. Такое реберное окно западает при вдохе и выбухает при выдохе [4]. Нарушение каркасности грудной клетки является причиной неполного расправления легкого на стороне повреждения. Маятникообразное движение воздуха в лёгких приводит к увеличению «мёртвого» пространства и нарастанию гипоксии. Длительная флотация ведет к сдвигу средостения, вызывает смещение его органов. В результате возникает недостаточность дыхательной и сердечно-сосудистой системы [4, 5]. В таких случаях образовавшийся дефект требует пластического замещения кожи, мягких тканей, восстановления герметичности плевральной полости и обязательной реконструкции каркаса грудной стенки с использованием специальных материалов, имитирующих функцию ребер или грудины [6, 7]. Кроме опоры для покровных и мягких тканей, защиты органов грудной полости, реконструкция каркаса должна обеспечивать восстановление биомеханики дыхания и физиологической подвижности грудной стенки [8,9]. Вопросы о том, что использовать для такой реконструкции, из каких материалов должны быть изготовлены импланты, какими характеристиками они должны обладать, по-прежнему, остаются актуальными [10, 11].

Цель – улучшить результаты каркасной пластики грудной стенки.

Материал и методы

Проанализированы амбулаторные карты 3 пациентов, которым проведено хирургическое лечение в объеме реконструкции обширных пострезекционных дефектов грудной стенки с реконструкцией каркаса грудной стенки с использованием сверхэластичных каркасных 3D-модулей и искусственных ребер с двухлопастным сетчатым имплантатом из никелида титана, а также без каркасной пластики.

Результаты

Пациент А., объем операции: широкая блок-резекция грудной стенки справа с резекцией 5 ребер. Площадь дефекта 192 см². Каркасная реконструкция грудной стенки сверхэластичными 3D-модулями из никелида титана. Через 15 мин после окончания операции интубационная трубка удалена, пациент переведен на самостоятельное дыхание. На контрольной рентгенограмме грудной клетки размер плевральных полостей адекватный, флотации в зоне реконструкции не отмечено, патологии со стороны легких и органов средостения не отмечено. Клинически западения тканей в зоне операции и одышки также не наблюдается. Дренажи удалены на 3-и сут после операции, начаты активные занятия лечебной физкультурой. Заживление раны первичным натяжением, швы сняты на 13-е сут. На 14-е сут спирометрические показатели в пределах нормы, при вдохе и выдохе движения грудной стенки симметричны. На 15-е сут пациент выписан домой. По данным контрольного обследования в 2021 г., жалоб со стороны дыхания и зоны реконструкции не отмечено. Пациент выполняет все виды бытовых нагрузок

Пациентка Б., объем операции: широкая сегментарная резекция 5-го ребра. Микрохирургическая пластика мягкими тканями. Площадь дефекта 63 см². Через 15 мин после окончания операции интубационная трубка удалена, пациентка переведена на самостоятельное дыхание. На контрольной рентгенограмме и УЗИ грудной клетки визуализируется участок флотации в зоне дефекта 80x20 мм, патологии со стороны легких и органов средостения не отмечено. Клинически определяются западения тканей в зоне операции, признаки одышки не наблюдаются. Дренажи удалены на 3-и сут после операции, начаты активные занятия лечебной физкультурой. Заживление раны первичным натяжением, швы сняты на 13-е сут. На 14-е сут спирометрические показатели в пределах нормы, при вдохе и выдохе в зоне оперативного вмешательства видна флотация. На 15-е сут пациентка выписана домой. По данным контрольного обследования в 2022 г., жалоб со стороны дыхания и зоны реконструкции не отмечено. Пациентка выполняет все виды бытовых нагрузок.

Пациент В. Операция: расширенная комбинированная верхняя лобэктомия справа с резекцией передних отрезков ребер II, III, IV; использовали 2 слоя трикотажной сетки и 3 ленты, помещенные между слоями и фиксированные к сетке. Площадь дефекта 98 см² Экстубация в ближайшие часы после операции. Клинических признаков дыхательной недостаточности не наблюдалось. Пациент активизирован с первых суток после операции. Заживление операционной раны происходило первичным натяжением. При контрольных рентгенологических исследованиях признаков смещения конструкции ребер относительно первичной имплантации не выявлено. Мультипланарная КТ свидетельствовала, что имплантаты были хорошо интегрированы в тканях, деформация грудной клетки была минимальной.

Обсуждение и выводы

Выбор способа реконструкции грудной стенки после обширных блок-резекций представляет сложную задачу, связанную с проблемами не только восстановления послеоперационного дефекта, но и с сохранением биомеханики дыхания в послеоперационном периоде. В литературе представлен опыт имплантации различных конструкций, но они имеют свои недостатки. Как правило, это изделия, предназначенные изначально для иных целей и локализаций. Представленный нами опыт хирургического лечения объемных образований с обширным поражением грудной стенки с реконструкцией пострезекционных дефектов с использованием конструкций из никелида титана имеют запатентованные разработки, специализированы для реконструкции каркаса грудной стенки, являются эффективными [12, 13]. Конструкция обеспечивает восполнение дефекта, нормализацию биомеханики дыхания за счет восстановления костно-хрящевого каркаса. Полученные онкологические и функциональные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного метода и расширяют возможности лечения пациентов с опухолями грудной стенки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 г./ под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2018.
2. Wen X., Gao S., Feng J., Li S., Gao R., Zhang G. Chest-wall reconstruction with a customized titanium-alloy prosthesis fabricated by 3D printing and rapid prototyping. J Cardiothorac Surg 2018;13(1):4.
3. Aragón J., Pérez Méndez I. Dynamic 3D printed titanium copy prosthesis: a novel design for large chest wall resection and reconstruction. J Thorac Dis 2016;8: E385-9.
4. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Ясенчук Ю.Ф., Чекалкин Т.Л., Овчаренко В.В. Никелид титана. Материал нового поколения. Томск, 2006. 295 с.
5. Жеравин А.А., Гюнтер В.Э., Анисеня И.И., Гарбуков Е.Ю., Жамгарян Г.С., Богоутдинова А.В. Реконструкция грудной стенки с использованием никелида титана у онкологических больных. 2015.
6. Simal J., Garcia-Casillas M.A., Cerda J.A., Riquelme Ó., Lorca-García C., Pérez-Egido L., et al. Three-dimensional custom-made titanium ribs for reconstruction of a large chest wall defect. European J Pediatr Surg Rep 2016;4(1):26–30.
7. Sanna S., Brandolini J., Pardolesi A., et al. Materials and techniques in chest wall reconstruction: a review. J Vis Surg 2017; 3:95.
8. Bagheri R., Haghi S.Z., Kalantari M.R., Sharifian Attar A., Salehi M., Tabari A., Soudaneh M. Primary malignant chest wall tumors: analysis of 40 patients // J. Cardiothorac. Surg. 2014. Vol. 9. P. 106. doi: 10.1186/1749-8090-9-106.
9. Chudacek J., Bohanes T., Szkorupa M., Klein J., Stasek M., Zalesak B., Stehlik D., Cvrtilik F., Neoral C. Strategies of treatment of chest wall tumors and our experience // Rozhl. Chir. 2015. Vol. 94 (1). P. 17–23.
10. Xin-Long Ma, PhD, Dong-bin Wang. Custom-made Prosthesis Reconstruction after Radical for Chondrosarcoma of Manubrium. Orthopaedic Surgery. 2018; 10:272-275. DOI: 10.1111/os.12388 (Импакт фактор 1.718)
11. Anisena I. I. Improving the reliability of the chest frame in plastics of chest wall defects during tumor resection / I. I. Anisena // AIP Conference Proceedings, Tomsk, 05–09.10.2020. Tomsk, 2020. P. 020019. – DOI 10.1063/5.0035278.
12. Анисеня И.И., Прокурин А.В., Богоутдинова А.В., Марченко Е.С., Гюнтер В.Э. Модуль для каркасной реконструкции грудной клетки. // Патент на изобретение RU 2694213 C1, 09.07.2019. Заявка № 2018108284 от 06.03.2018.
13. Топольницкий Е.Б., Гюнтер В.Э., Дамбаев Г.Ц., Ефтеев Л.А., Прокурин А.В., Жеравин А.А. Способ укрытия обширных окончатых торакоабдоминальных дефектов. // Патент на изобретение RU 2393808 C1, 10.07.2010. от 27.10.2016.

ИММУНО-ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО РАКА ЭНДОМЕТРИЯ

**В.О. Цхай¹, Л.А. Коломиец^{1,2}, М.Н. Стахеева¹, В.Г. Сисакян³,
Н.М. Чернорубашкина⁴, В.Н. Журман⁵, А.А. Гречкина⁵**

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

СибГМУ, г. Томск, Россия²

ГБУЗ НСО Новосибирский областной клинический онкологический диспансер,
г. Новосибирск, Россия³

Иркутский областной онкологический диспансер, г. Иркутск, Россия⁴

Приморский краевой онкологический диспансер, г. Владивосток, Россия⁵

Аннотация

Впервые проведен ретроспективный анализ 18 историй болезни больных прогрессирующим раком эндометрия, которым была проведена иммуно-таргетная терапия препаратами леватиниб и пембролизумаб в онкологических учреждениях на территории Сибири и Дальнего Востока. В большинстве случаев больные имели III и IV стадии. Все они получили комбинированное лечение, включающее хирургическое лечение, которое дополнялось адьювантной ЛТ, ХТ. Рецидивы заболевания возникли в сроки от 1 мес до 33 мес. Противорецидивная терапия включала 2 и больше линий ХТ. Перед назначением иммуно-таргетной терапии всем пациенткам проводилось тестирование на MSI-H. Медиана ответа на терапию составила 5,38 мес. Частичный ответ был достигнут в 27 % случаев, стабилизация процесса наблюдалась в 55 % случаев.

Ключевые слова: прогрессирующий рак эндометрия, леватиниб, пембролизумаб, онкологические учреждения Сибири и Дальнего Востока

IMMUNO-TARGETED THERAPY OF PROGRESSIVE ENDOMETRIAL CANCER

V.O. Tskhai¹, L.A. Kolomiets^{1,2}, M.N. Stakheyeva¹, V.G. Sisakyan³,
N.M. Chernorubashkina⁴, V.N. Jurman⁵, A.A. Grechkina⁵

Tomsk Cancer research institute, NRMC, Tomsk, Russia¹

SSMU, Tomsk, Russia²

State budgetary healthcare institution of the Novosibirsk region «Novosibirsk regional oncological clinic», Novosibirsk, Russia³

Irkutsk regional cancer clinic, Irkutsk, Russia⁴

Primorsk regional cancer clinic, Vladivostok, Russia⁵

Annotation

For the first time, a retrospective analysis of 18 case histories of patients with advanced endometrial cancer who underwent immuno-targeted therapy with lenvatinib and pembrolizumab in oncological institutions in Siberia and the Far East was carried out for the first time. In most cases, patients had stages III and IV. All patients received combined treatment, including surgical treatment, which was supplemented by adjuvant RT, CT. Relapses of the disease occurred within the period from 1 month to 33 months. Anti-relapse therapy included 2 or more lines of chemotherapy. Before the appointment of immunotargeted therapy, all patients were tested for MSI-H. The median response to therapy was 5.38 months. A partial response was achieved in 27% of cases, stabilization of the process was observed in 55% of cases.

Key words: Progressive endometrial cancer, lenvatinib, pembrolizumab, oncological institutions of Siberia and Far Eastern Federal District.

Актуальность. Рак эндометрия – один из немногих раков, заболеваемость и смертность от которого растет в развитых странах. В 2019 г. рак эндометрия был выявлен у 27 151 пациентки, 6280 женщин погибли от этого заболевания [1]. Показатели заболеваемости и смертности от рака эндометрия за последние 10 лет находятся на стабильно высоком уровне. При этом в 14,4 % случаев рак эндометрия был диагностирован на III и IV стадиях [2]. На данный момент «золотым стандартом» химиотерапии рака эндометрия считается комбинация Паклитаксела и Карбоплатина. Эта комбинация доказала свою эффективность в исследованиях III фазы NRG Oncology GOG 0209 [3]. Медиана выживаемости без прогрессирования составляет 13 мес, объективный ответ наблюдается у 50 % пациенток. При рецидивном и метастатическом раке эндометрия длительное время химиотерапия была единственным методом лечения, при этом результаты ее оставались неудовлетворительными, частота ответа составляет 27,3 % на паклитаксел и 7,7% на доцетаксел [4–5]. В течение последних нескольких лет появились данные о положительных изменениях в этой сфере. Проведенные исследования в области иммунотерапии позволили выявить группу больных с высоким уровнем микросателитной нестабильности (MSI-high), чувствительных к терапии пембролизумабом, а также некоторыми другими антагонистами PD-L1/PD-1. Наличие MSI-high отмечается приблизительно у 25 % пациенток [6]. Дальнейшие исследования показали,

что добавление Ленватиниба к терапии Пембролизумабом позволяет достичь значительного терапевтического эффекта у пациенток без MSI-high.

Цель исследования – оценить эффективность применения комбинации ленватиниба и пембролизумаба на основании обобщенных данных больных с прогрессирующим раком эндометрия, получивших лечение в онкологических учреждениях на территории Сибири и Дальнего Востока.

Материал и методы

Впервые проведен ретроспективный анализ 18 историй болезни больных, которым проводилась иммуно-таргетная терапия по поводу прогрессирующего рака эндометрия в различных онкологических учреждениях Сибири и Дальнего Востока: НИИ онкологии ТНИМЦ, г. Томск, Новосибирском областном клиническом онкологическом диспансере, Иркутском областном онкологическом диспансере и в Приморском краевом онкологическом диспансере. Всем больным проведено генетическое исследование микросателлитной нестабильности. Морфологически у 95 % больных была выявлена эндометриоидная аденокарцинома высокой степени злокачественности (high grade), в 5 % – серозный рак. Возраст больных варьировался от 45 до 74 лет (средний возраст составил 62,5 + 2,8 года). РЭ I стадии наблюдался в 44 % случаев, II стадии – в 11%, III стадии – в 11% и IV – в 33 % случаев. Все больные получили комбинированное лечение, включающее хирургическое лечение, которое в 66 % дополнялось адьювантной ЛТ, а в 50 % – ХТ. Рецидивы заболевания у пролеченных больных возникали в сроки от 1 до 33 мес. Все больные получили противорецидивную платиносодержащую химиотерапию. При прогрессировании на фоне химиотерапии больные РЭ (MSS) получили иммуно-таргетную терапию (ленватиниб 20 мг + пембролизумаб 200 мг один раз в 3 нед).

Результаты

Проведенный анализ клинических параметров показал, что среди больных, получающих иммуно-таргетную терапию, отмечается высокий удельный вес распространенных стадий РЭ. Третья и IV стадии РЭ составили 44 %. В 68 % случаев выявлялось тотальное поражение полости матки опухолью. У всех больных в плане комбинированного лечения проведено хирургическое лечение в объеме экстирпации матки с придатками. Лимфодиссекция проведена только в 22,2 % случаев. Адьювантную ХТ получили 50 % больных, в том числе в 27 % случаев были платиносодержащие схемы. Лучевую терапию получили 66 % пациенток с РЭ. Из них ДЛТ получили 25 %, брахитерапию+ДЛТ – 58 % больных. Метастазы наблюдались преимущественно в тазовых (44 %), парааортальных лимфоузлах (44 %), легких (55 %), в 33 % случаев поразились кости. Около половины пациенток перед назначением иммуно-таргетной терапии получили ≥ 2 линий противоопухолевой терапии. Длительность приема иммуно-таргетных препаратов составила от 1 до 11 мес. Медиана ответа на терапию составила 5,38 мес. Оценка эффективности иммуно-таргетной терапии показала, что частичный ответ был достигнут в 27 % случаев, стабилизация процесса наблюдалась в 55 % случаев. Половина больных продолжают получать иммуно-таргетную терапию.

Нежелательные явления отмечались у 77 % пациенток, в основном I–II степени. Токсичность контролировалась назначением поддерживающей терапии. Редукция дозы ленватиниба была проведена у одной больной. Прерывания или прекращения лечения не отмечалось. Наиболее частыми НЯ были: повышение артериального давления (44 %), слабость (44 %), снижение аппетита (27 %). Гипертензия II степени (артериальное давление 140–159 мм рт. ст.) наблюдалась в 27 % случаев и требовала коррекции гипотензивными препаратами. Гипертензия III степени (систолическое артериальное давление выше 160 мм рт. ст.) наблюдалась в 5 % случаев и также была скорректирована медикаментозной терапией, гипотиреоз был выявлен в 11 % случаев, больным была назначена заместительная гормонотерапия.

Таким образом, по данным исследования, медиана ответа на терапию комбинацией ленватиниба и пембролизумаба у больных прогрессирующим раком эндометрия составляет 5,38 мес при сохранении удовлетворительного качества жизни.

Заключение

Проведенное исследование показало, что иммуно-таргетная терапия является достаточно доступной терапевтической опцией для лечения прогрессирующего РЭ в реальной клинической практике врача-онколога на всей территории Сибири и Дальнего Востока, позволяющая долговременно контролировать прогрессирующий рак эндометрия после платиносодержащей ХТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2019 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»; 2020. 252 с. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shahzadova A.O. Malignant neoplasms in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Moscow: Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Center; 2020. 252 p. (In Russ.).
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. (ред.) Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»; 2020. 239 с. Режим доступа: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shahzadova A.O. (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2019. Moscow: Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Center; 2020. 239 p. (In Russ.) Available at: https://glavonco.ru/cancer_regis ter/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf.
3. Miller D., Filiaci V., Fleming G. et al. Late-breaking abstract 1: Randomized phase III noninferiority trial of first line chemotherapy for metastatic or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2012;125(3):771.
4. Lincoln S., Blessing J.A., Lee R.B., Rocereto T.F. Activity of paclitaxel as second-line chemotherapy in endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2003;88(3):277–281. [https://doi.org/10.1016/S0090-8258\(02\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0090-8258(02)00068-9).
5. Miller D., Filiaci V., Fleming G. et al. Late-breaking abstract 1: Randomized phase III noninferiority trial of first line chemotherapy for metastatic or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2012;125(3):771.
6. Hause R.J., Pritchard C.C., Shendure J., Salipante S.J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med.* 2016 Nov; 22(11): 1342–1350. doi: 10.1038/nm.4191.

ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЕНОВ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ И ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ В ОПУХОЛИ ЖЕЛУДКА, КАНЦЕРОМАТОЗЕ И МЕТАСТАЗАХ В ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ

И.А. Цыденова^{1,2}, В.А. Маркович¹, М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}, С.А. Тузиков¹, Н.В. Литвяков^{1,2}

Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
НИ Томский государственный университет, Россия, г. Томск, Россия²

Аннотация

Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее злокачественных типов рака во всем мире из-за его быстрого прогрессирования, отдаленных метастазов и устойчивости к традиционной химиотерапии. В целом, объективные показатели ответа на химиотерапию варьируются от 20 до 40 %, что указывает на переменные клинические результаты. Одной из причин, объясняющих плохие клинические результаты терапии, является крайне неоднородная природа этого заболевания. Внутриопухолевая гетерогенность выходит на первый план при лечении первично-метастатических форм опухоли и является важной причиной низкой эффективности их лечения, поскольку даже при персонализированном подходе оказывается довольно сложно подобрать схему терапии, которая была бы эффективна и для лечения первичной опухоли, и метастазов. Цель исследования – сравнительная оценка экспрессионной гетерогенности генов АВС-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы. В исследование включен 41 больной с диссеминированным раком желудка IV стадии с канцероматозом брюшины. Для исследования был использован операционный материал: опухолевая ткань желудка, неизмененная ткань желудка, канцероматоз брюшины, метастаз в лимфатический узел. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit в соответствии с инструкцией производителя. Уровень экспрессии генов АВС-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Установлено, что уровень экспрессии исследуемых генов сильно варьирует. Для генов АВС-транспортеров наибольшее значение экспрессии характерно для генов *ABCG1*, *ABCC2*, *ABCG2*. Гиперэкспрессия среди генов химиочувствительности во всех трех точках была характерна только для *Top2A*. В соответствии с этим очевидно, что разработка молекулярно генетических подходов прогноза течения РЖ, персонализированного подхода к назначению терапии должна проводиться с учетом экспрессионной гетерогенности.

Ключевые слова: внутриопухолевая гетерогенность, персонализированное лечение, диссеминированный рак желудка, АВС-транспортеры, межсайтовая гетерогенность.

EXPRESSION HETEROGENEITY OF ABC-TRANSPORTER GENES AND CHEMOSENSITIVITY GENES IN GASTRIC TUMORS, CARCINOMATOSIS AND METASTASES TO THE LYMPH NODES

I.A. Tsydenova^{1,2}, V.A. Markovich¹, M.M. Tsyganov², M.K. Ibragimova^{1,2}, S.A. Tuzikov¹, N.V. Litviakov^{1,2}

Cancer Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Annotation

Gastric cancer (GC) is one of the most malignant types of cancer worldwide due to its rapid progression, distant metastases, and resistance to conventional chemotherapy. In general, objective response rates to chemotherapy range from 20% to 40%, indicating variable clinical outcomes. One of the reasons explaining the poor clinical results of therapy is the highly heterogeneous nature of this disease. Intratumoral heterogeneity comes to the fore in the treatment of primary metastatic forms of the tumor and is an important reason for the low efficiency of their treatment, since even with a personalized approach it is quite difficult to choose a therapy regimen that would be effective for the treatment of the primary tumor and metastases. The purpose of the study was a comparative assessment of the expression heterogeneity of ABC transporter genes and chemosensitivity genes in gastric tumors, carcinomatosis, and metastases to the lymph nodes. The study included 41 patients with stage IV disseminated gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. Surgical material was used for the study: tumor tissue of the stomach, unchanged stomach tissue, peritoneal carcinomatosis, metastasis to the lymph node. RNA was isolated using the RNeasy Plus mini Kit according to the manufacturer's instructions. The level of expression of ABC transporter genes: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* and chemosensitivity genes: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* was assessed using reverse transcriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR). It was found that the level of expression of the studied genes varies greatly. For the ABC transporter genes, the highest expression value is typical for the *ABCG1*, *ABCC2*, and *ABCG2* genes. Overexpression among chemosensitivity genes at all three points was typical only for *Top2A*. In accordance with this, it is obvious that the development of molecular genetic approaches to predicting the course of gastric cancer, a personalized approach to prescribing therapy should be carried out taking into account expression heterogeneity.

Key words. Intratumoral heterogeneity, personalized treatment, disseminated gastric cancer, ABC-transporter genes, intersite heterogeneity.

Актуальность. На сегодняшний день в качестве основного метода лечения больных диссеминированным РЖ рассматривается системная химиотерапия. Частота объективного ответа на лечение не превышает 20–40 %, а медиана выживаемости пациентов составляет 8–10 мес [1]. Одной из причин, объясняющих плохие клинические результаты терапии, является крайне неоднородная природа этого заболевания. Для метастатических опухолей характерна гетерогенность между первичной опухолью и метастазами (лимфогенными и отдаленными). Этот тип гетерогенности выходит на первый план при лечении первично-метастатических форм опухоли и является важной причиной низкой эффективности их лечения. Предыдущие исследования показали, что определенные опухолевые клетки в больших образцах гетерогенных опухолей являются предшественниками отдаленных метастазов. Таким образом, существует множество биологических различий между опухолевыми клетками в первичных и метастатических поражениях [2].

Цель исследования – сравнительная оценка экспрессионной гетерогенности генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы.

Материал и методы

В исследование включен 41 больной с диссеминированным РЖ IV стадии с канцероматозом брюшины. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.) и с разрешения локального этического комитета института, все пациенты подписали информированное согласие на исследование. Всем пациентам проведена операция в объеме паллиативной гастрэктомия по РУ. После хирургического вмешательства в зависимости от показаний больным проводилась химиотерапия по схемам: GemCap+C;

FOLFIRI+C; XELIRI+C; PC. Химиотерапия проводилась при удовлетворительном общем состоянии и лабораторных показателях пациентов без отклонений от нормы. Для исследования был использован операционный материал (опухолевая ткань желудка, неизменная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Уровень экспрессии генов ABC-транспортёров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). В качестве генов-рефери использовались два гена: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta), уровень экспрессии генов нормализовался по отношению к экспрессии генов-рефери и экспрессии в нормальной ткани желудка каждого пациента по методу Pfaffl. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0».

Результаты

В результате проведенного исследования был проанализирован уровень экспрессии шести генов ABC-транспортёров и 8 генов химиочувствительности в трех сайтах на каждого пациента: опухолевая ткань желудка, канцероматоз, метастаз в лимфатический узел. Уровень экспрессии исследуемых генов сильно варьирует. Так, для генов ABC-транспортёров наибольшее значение экспрессии характерно для генов *ABCG1* ($3,09 \pm 1,09$; max. 32,00), *ABCG2* ($7,95 \pm 2,29$; max. 54,11), *ABCG2* ($9,63 \pm 3,77$; max. 100,95), соответственно для опухолевой ткани желудка, канцероматоза и метастаза в л/у. Максимально повышенная экспрессия среди генов химиочувствительности во всех трех точках была характерна только для *Top2A* ($17,21 \pm 5,99$, max. 161,93; $10,85 \pm 4,07$, max. 105,15; $35,27 \pm 0,83$, max. 439,62 соответственно). Сравнение экспрессии между исследуемыми точками материала на каждого пациента показало статистически значимые различия в уровне экспрессии таких генов, как: *ABCC1*, *Top2A* и *BRCA1* (рис. 1).

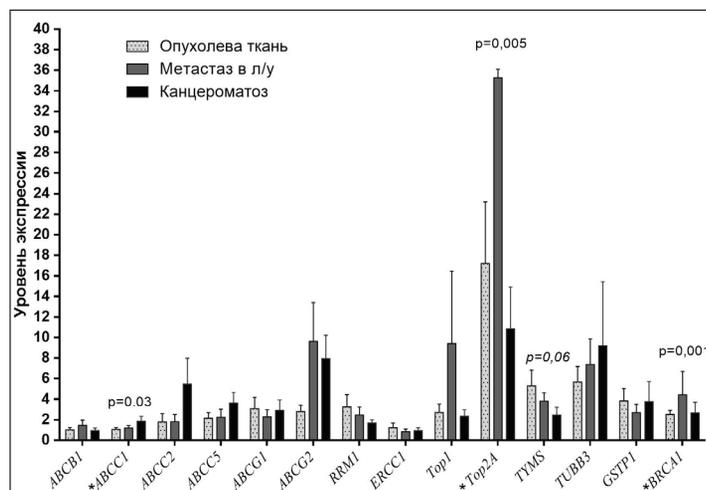


Рис. 1. Сравнение уровня экспрессии исследуемых генов. Примечание: звездой обозначены гены, уровень экспрессии которых статистически значимо отличается в исследуемых образцах

В частности, установлено, что уровень экспрессии генов *Top2A* и *BRCA1* выше в метастазе в лимфатическом узле по сравнению с опухолевой тканью желудка и канцероматозом (при $p=0,005$ и $p=0,001$), тогда как экспрессия гена *ABCC1* статистически значимо выше в канцероматозе ($p=0,03$).

Заклучение

Таким образом, при раке желудка наблюдается высокий уровень экспрессионной гетерогенности, что в дальнейшем будет способствовать персонализированному подходу в диагностике и лечении диссеминированного рака желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маркович В.А., Тузиков С.А., Родионов Е.О., Литвяков Н.В., Попова Н.О., Цыганов М.М., Левонян Л.В., Миллер С.В., Подолько Д.В., Цыденова И.А., Ибрагимова М.К. Рак желудка: современные подходы и перспективы лечения при канцероматозе брюшины (литературный обзор) // Сибирский онкологический журнал. 2021. 20(6): Р. 104-113.
2. Naruke A., Azuma M., Takeuchi, A. et al. Comparison of site-specific gene expression levels in primary tumors and synchronous lymph node metastases in advanced gastric cancer // Gastric Cancer. 2015. Vol. 18. P. 262-270.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОГО ПУЧКА С ТКАНЕЭКВИВАЛЕНТНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

О.С. Чернова¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹, И.А. Милойчикова^{1,2},
С.Г. Стучебров¹

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

В данной работе представлены результаты моделирования взаимодействия протонного пучка с мышечной тканью и пластиками, пригодными для использования в качестве материала для изготовления тканеэквивалентного дозиметрического фантома. Моделирование проводилось с помощью инструментария Geant4, позволяющего имитировать прохождение частиц через вещество, с использованием метода Монте-Карло. В ходе исследования были получены расчетные глубинные распределения протонного пучка в мышечной ткани и пластиках, пригодных для изготовления изделий методами трехмерной печати. С целью определения пластикового материала, эквивалентного мышечной ткани, был проведен сравнительный анализ результатов расчета поглощенной дозы в пластиках различной плотности и мышечной ткани. В результате исследования было определено, что для имитации мышечной ткани посредством трёхмерной печати могут быть использованы PLA-пластик плотностью 1,105 г/см³, HIPS-пластик плотностью 1,065 г/см³ и ABS-пластик плотностью 1,062 г/см³. При этом расхождения в положении пиков глубинного распределения поглощенной дозы в мышечной ткани и выбранных пластиках составляют менее 0,1 см.

Ключевые слова: протонная лучевая терапия, численное моделирование, метод Монте-Карло, технологии трехмерной печати.

NUMERICAL SIMULATION OF THE OF A PROTON BEAM INTERACTION WITH TISSUE-EQUIVALENT MATERIALS

O.S. Chernova¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹, I.A. Miloichikova^{1,2},
S.G. Stuchebrov¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Annotation

This paper presents the results of modeling the interaction of a proton beam with muscle tissue and plastics suitable for use as a material for manufacturing a tissue-equivalent dosimetric phantom. The simulation was carried out using the Geant4 toolkit, which allows simulating the passage of particles through matter, using the Monte Carlo method. During the study, the calculated depth distributions of the proton beam in muscle tissue and plastics suitable for the manufacture of products using 3D printing methods were obtained. In order to determine the plastic material equivalent to muscle tissue, a comparative analysis of the results of calculating the absorbed dose in plastics of various densities and muscle tissue was carried out. As a result, it was determined that PLA with a density of 1.105 g/cm³, HIPS with a density of 1.065 g/cm³ and ABS with a density of 1.062 g/cm³ can be used to simulate muscle tissue through 3D printing. At the same time, the discrepancies in the position of the peaks in the distribution of the absorbed dose in the muscle tissue and the selected plastics are less than 0.1 cm.

Key words: proton beam therapy, numerical simulation, Monte Carlo method, 3D printing technologies.

Актуальность. В современной России онкологические заболевания занимают второе место среди причин смертности. Согласно статистике, удельный вес смертности вследствие онкологии составляет примерно 14 % от общего числа летальных исходов [1]. Именно поэтому исследование и развитие новых методов лечения злокачественных образований

составляет основную задачу современной медицины. Одним из наиболее перспективных терапевтических методов на сегодняшний день является протонная лучевая терапия, поскольку позволяет эффективно воздействовать на опухолевые клетки, не нарушая при этом функциональность здоровых клеток.

Поскольку протоны высоких энергий, проходя через вещество, отдают большую часть своей энергии на некоторой глубине, создавая при этом максимальный повреждающий эффект, необходимым этапом эффективного лечения является планирование терапевтических процедур [2]. В противном случае – при отсутствии предварительного расчета – взаимодействие ионизирующего излучения с тканями организма может привести не только к потере функциональности, но и к гибели здоровых клеток.

Для экспериментального исследования радиационного воздействия ионизирующего излучения на живые организмы используются тканеэквивалентные фантомы, изготавливаемые методами трёхмерной печати, которые являются аналогом тканей человеческого организма. Применение 3D-печати имеет особую популярность в современной науке, в том числе потому, что позволяет изготавливать медицинские фантомы с высокой точностью имитации структуры тканей человека [3].

Для изготовления медицинских фантомов необходимо проводить исследования по подбору тканеэквивалентных материалов в отношении их взаимодействия с конкретным видом ионизирующего излучения. Поэтому существует необходимость проведения математического моделирования взаимодействия протонного пучка с тканями человека и пластиками, которые используются в 3D-печати.

Цель исследования – моделирование взаимодействия протонного пучка с тканеэквивалентными материалами для определения пластиков, пригодных для изготовления дозиметрического фантома методами трёхмерной печати.

Материал и методы

В данной работе математическое моделирование проводилось в инструментари Geant4 [4], позволяющем моделировать взаимодействие элементарных частиц с веществом. Характер испускания протонов является статистическим, поэтому в процессе моделирования применялся метод Монте-Карло.

В ходе исследования был смоделирован протонный пучок энергией 205 МэВ, число отслеживаемых первичных протонов составило 10^8 . Источник излучения радиусом 1 см расположен вплотную к одной из граней кубического расчетного объема размером $30 \times 30 \times 30$ см³, который, в свою очередь, разделен на воксели размером $0,475 \times 0,475 \times 0,1$ см³. Разделение на отдельные воксели необходимо для расчета поглощенной дозы в каждом из них. Геометрия экспериментальной установки представлена на рис. 1.

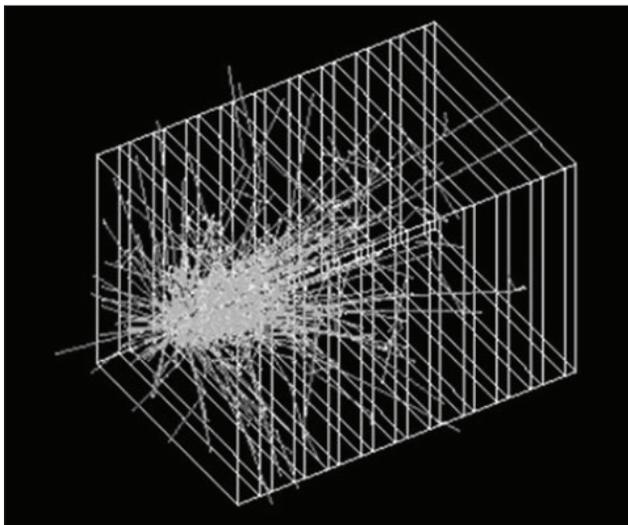


Рис. 1. Геометрия экспериментальной установки, смоделированная в инструментари Geant4

В качестве исследуемого биологического материала была выбрана мышечная ткань, а в качестве исследуемых тканеэквивалентных материалов – PLA- (Polylactic Acid), HIPS- (High-Impact Polystyrene) и ABS-пластики (Acrylonitrile Butadiene Styrene). Плотность PLA-пластика составляет $1,23-1,25$ г/см³ [5], плотность HIPS-пластика – $1,05-1,07$ г/см³ [6], а плотность

ABS-пластика – 1,02-1,08 г/см³ [7]. На практике плотность изготовленных изделий может изменяться в процессе 3D-печати посредством изменения расстояния в рисунке заполнения, то есть изменения коэффициента заполнения k (%).

В таблице приведены элементный состав и процентные соотношения элементов каждого исследуемого материала. Данные для мышечной ткани были взяты из базы данных NIST [8].

Таблица

Процентные соотношения элементов моделируемых материалов

	Элементный состав, %			
	Мышечная ткань	PLA	HIPS	ABS
H	10,1997	5,6000	7,7434	7,9263
C	12,3000	50,0000	92,2566	84,6826
N	0,3500	–	–	7,3912
O	72,9003	44,4000	–	–
Na	0,0800	–	–	–
Mg	0,0200	–	–	–
P	0,2000	–	–	–
S	0,5000	–	–	–
K	0,3000	–	–	–

Для обработки полученных экспериментальных данных применялся программный пакет Origin [9].

Результаты

В работе были смоделированы глубинные распределения доз протонного пучка в исследуемых материалах. Подбор плотностей пластиков осуществлялся таким образом, чтобы положение пиков Брэгга глубинных распределений доз протонного пучка в пластиках совпадало с пиком Брэгга глубинного распределения дозы протонного пучка в мышечной ткани. Рассчитанные значения были нормированы на максимальное значение поглощенной дозы в детекторе.

На рис. 2 представлены глубинные распределения поглощенной дозы протонного пучка в мышечной ткани и исследуемых пластиках с подобранными плотностями (рис. 2, а) и увеличенное изображение пиков полученных кривых (рис. 2, б), позволяющее провести более детальный сравнительный анализ результатов расчета.

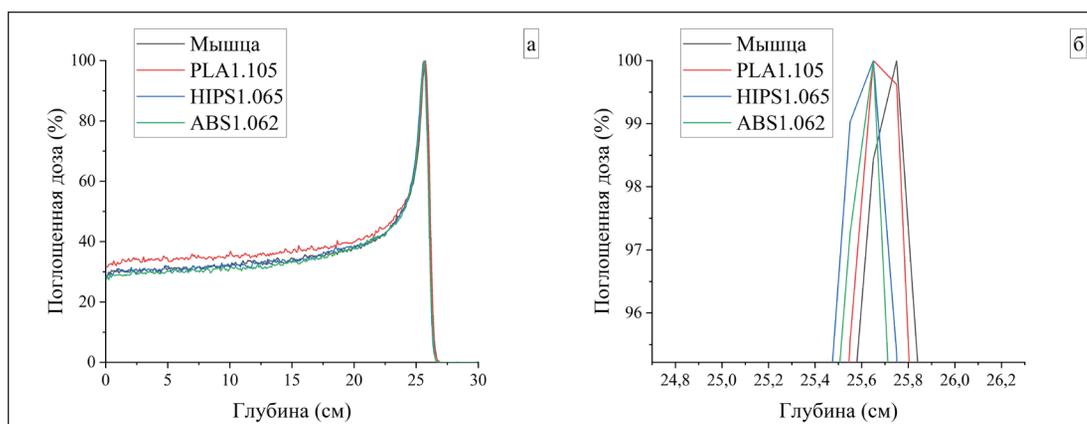


Рис. 2. Глубинные распределения поглощенных доз в мышечной ткани и исследуемых пластиках (а) и увеличенное изображение пиков полученных кривых (б)

Согласно полученным данным моделирования, были подобраны плотности пластиков, позволяющие имитировать мышечную ткань в отношении взаимодействия протонного пучка с материалами. Для PLA-пластика выбранная плотность составила 1,105 г/см³, для HIPS-пластика – 1,065 г/см³ и ABS-пластика – 1,062 г/см³. Расхождения в положении пиков составляют не более 0,1 см. Таким образом, выбранные пластики с заданной плотностью могут быть использованы для имитации мышечной ткани.

Заключение

В рамках данного исследования было показано, что для имитации мышечной ткани посредством трёхмерной печати могут быть использованы PLA-пластик плотностью 1,105 г/см³, HIPS-пластик плотностью 1,065 г/см³ и ABS-пластик плотностью 1,062 г/см³. При этом расхождения в положении пиков глубинного распределения поглощенной дозы в мышечной ткани и выбранных пластиках составляют менее 0,1 см.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 19-79-10014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Турсун-Заде П. Т. Оценка распространенности злокачественных новообразований в России с применением модели заболеваемость-смертность // Демографическое обозрение. 2018. № 3.
2. Mohan R., Grosshans D. Proton therapy – Present and future // Advanced Drug Delivery Reviews. 2017. Vol. 109. P. 26–44.
3. Solc J., Vrba T., Burianova L. Tissue-equivalence of 3D-printed plastics for medical phantoms in radiology // Journal of Instrumentation. 2018. Vol. 13.
4. Geant4. A simulation toolkit [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://geant4.web.cern.ch/>, свободный.
5. Gereá D., Cziganý T. Future trends of plastic bottle recycling: Compatibilization of PET and PLA // Polymer Testing. 2020. V. 81.
6. Oluwarotimi Olofinnade, Sarath Chandra, Paromita Chakraborty. Recycling of high impact polystyrene and low-density polyethylene plastic wastes in lightweight based concrete for sustainable construction // Materials Today: Proceedings. 2021. Vol. 38, №5. P. 2151-2156.
7. Kokshayskiy A. I., Volodarskii A. B., Shirgina N. V., Odina N. I., Korobov A. I. Elastic properties of ABS-plastic acoustic metamaterial produced by 3D-printing method // 2021 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). 2021. P. 1-2.
8. NIST ESTAR Database Program [Электронный ресурс] // National Institute of Standards and Technology (Physical Measurement Laboratory): [сайт] – Режим доступа: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR-ut.html>, свободный.
9. OriginLab [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.originlab.com/>, свободный.

МЕТИЛИРОВАНИЕ P53-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ МИКРОРНК MIR-129-2, MIR-203, MIR-34A И MIR-34B/C ПРИ ДИФFUЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

М.И. Чуркина¹, Е.Н. Воропаева², Т.И. Поспелова¹

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия¹
Институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия²

Аннотация

По данным литературных источников, существует несколько механизмов изменения уровня микроРНК при гемобластозах, одним из которых является aberrантное метилирование промоторов кодирующих их генов. **Цель** – оценить частоту, сочетанность и ассоциацию с особенностями клинического течения заболевания метилирования генов микроРНК MIR-129-2, MIR-203, MIR-34A и MIR-34B/C в опухолевой ткани больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). Исследование включало 73 образца ДНК, выделенных из опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ. Для контроля специфичности метилирования использовалась ДНК, выделенная из лимфоузлов с реактивной фолликулярной гиперплазией. Бисульфитную конверсию проводили с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Определение статуса метилирования генов осуществляли методами метилспецифичной ПЦР и метилчувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения. Частота метилирования MIR-129-2, MIR-203, MIR-34A и MIR-34B/C в опухолевой ткани ДВККЛ составила 67, 66, 27 и 62 % соответственно, при этом в образцах с реактивными изменениями лимфоузлов метилирование данных генов не было выявлено. Дальнейший анализ показал наличие ассоциации между метилированием MIR-203, MIR-129-2 и MIR-34B/C ($p=0,024$, $q=0,036$), а также пары MIR-34B/C и MIR-34A ($p=0,010$, $q=0,029$). Оценка ассоциации метилирования изученных генов микроРНК с клинико-лабораторными показателями пациентов выявила, что в подгруппе с метилированием MIR-34A 18/20 (90 %) пациентов имели высокий и промежуточный высокий риск, согласно Международному прогностическому индексу (МПИ), против 26/53 (49,1%, $p=0,002$) в подгруппе больных без метилирования данного гена. Также была выявлена ассоциация метилирования MIR-34B/C и MIR-203 с уровнем экспрессии Ki-67 более 45 % в опухолевой ткани: $p=0,026$, OR=3,819 (95% CI: 1,139; 12,804) и $p=0,011$, OR=4,457 (95% CI: 1,372; 14,481) соответственно.

Ключевые слова: диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, микроРНК, p53, метилирование.

METHYLATION OF GENES P53-RESPONSIVE *MIR-34B/C*, *MIR-34A*, *MIR-203* AND *MIR-129-2* IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

M.I. Churkina¹, E.N. Voropaeva², T.I. Pospelova¹

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia¹
Institute of Therapy and Preventive Medicine - Branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia²

Annotation

According to literature sources, there are several mechanisms for changing the level of microRNAs in hemoblastosis, one of which is aberrant methylation of promoters of the genes encoding them. The aim of study was to identify the frequency and specificity of p53-responsive oncosuppressive *MIR-34B/C*, *MIR-34A*, *MIR-203* and *MIR-129-2* genes methylation in Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL). **Methods:** Methylation status of the genes in tumor tissue (n=73) was studied by methyl-specific PCR and methyl-sensitive analysis of high-resolution melting curves. DNA isolated from lymph node biopsies with reactive polyclonal B-cell proliferation (n=11) was used to control the tumor-specificity of the detected methylation. The quantitative analysis of the combined methylation of the studied genes was carried out with the calculation of the one-sided Fisher exact criterion (p-value) and the frequency of false discoveries (FDR) (q-value) was calculated using the Benjamin-Hochberg procedure. **Results.** Aberrant methylation of the promoters of the studied genes can serve as a significant mechanism for reducing the miR-34b/c, miR-34A, miR-203 and miR-129 micro-RNAs expression in the tumor tissue of DLBCL. It is occurs in combination and is tumor-specific. Thus methylation of *MIR-129-2*, *MIR-203*, *MIR-34A* and *MIR34B/C* in lymphoma samples occurred with a frequency of 67%, 66%, 27% and 62%, respectively, and there was no reactive lymph node tissue. Combined methylation of *MIR-203*, *MIR-129-2* and *MIR-34B/C* genes (p<0.013, q<0.020), as well as pair of *MIR-34B/C* and *MIR-34A* genes (p=0.010, q=0.029) was detected.

Key words: Diffuse B-cell large cell lymphoma, microRNA, p53, methylation.

Актуальность. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – это гетерогенная группа лимфатических опухолей с различными клиническими, морфологическими, иммунофенотипическими, цитогенетическими характеристиками и с разным ответом на терапию. На ее долю приходится около 30–40 % всех неходжкинских лимфом, что делает ДВККЛ одним из наиболее распространенных гематологических злокачественных новообразований во многих западных странах [1].

При данном заболевании даже среди пациентов, входящих в одну и ту же группу риска по МПИ, существует высокая вариабельность результатов стандартного лечения, что может отражать молекулярную гетерогенность лимфомы. Перспективным направлением изучения ДВККЛ являются исследования, направленные на выявление биомаркеров, которые могут объяснять данное явление [2].

Исследования по профилированию экспрессии генов показывают, что дерегуляция микроРНК является распространенным событием при различных гемобластозах и ДВККЛ, в частности. В ряде работ показано снижение экспрессии при лимфомах hsa-miR-129, hsa-miR-203, hsa-miR-34a и hsa-miR-34b/c.

МикроРНК представляют собой класс небольших эндогенных некодирующих РНК длиной 21–25 нуклеотидов, которые имеют высококонсервативные последовательности и обычно кодируются в виде однокопийных или многокопийных генов, либо в виде кластера генов. Экспрессия их изменяется под воздействием ряда факторов, в том числе эпигенетических. И нарушение гомеостаза метилирования ДНК – одно из центральных звеньев в данном процессе

Другим важным механизмом регуляции экспрессии ряда онкосупрессорных микроРНК является влияние белка p53 на транскрипцию и процессинг данных молекул. В физиологических условиях точная и согласованная регуляция p53-индуцируемых микроРНК опосредует его противоопухолевые эффекты. Так, реализация p53-опосредованного ответа на генотоксический клеточный стресс во многом осуществляется за счет изменения спектра микро-РНК, а именно активации онкосупрессорных hsa-miR-129, hsa-miR-203, hsa-miR-34a и hsa-miR-34b/c [3,4,5].

Цель работы – оценить частоту, сочетанность и ассоциацию с особенностями клинического течения заболевания метилирования генов микроРНК *MIR-129-2*, *MIR-203*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных ДВККЛ.

Материал и методы

Проанализировано 73 образца опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ. Бисульфитную конверсию выделенной ДНК осуществляли с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Определение статуса метилирования генов осуществляли методами метилспецифичной ПЦР и метилчувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения. Для оценки полноты конверсии использовался набор Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit и метод прямого бисульфитного секвенирования на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer. Для контроля специфичности метилирования использовалась ДНК, выделенная из лимфоузлов с реактивной лимфоидной гиперплазией. Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов проводился путем вычисления Log₂ Odds Ratio и одностороннего точного критерия Фишера (p-value). С помощью процедуры Бенджамини – Хохберга была рассчитана частота ложных открытий (FDR) (q-value).

Результаты

Частота метилирования *MIR-129-2*, *MIR-203*, *MIR-34A* и *MIR34B/C* в опухолевой ткани ДВККЛ составила 67, 66, 27 и 62 % соответственно, при этом в образцах с реактивными изменениями лимфоузлов метилирование данных генов не выявлено. Дальнейший анализ выявил наличие ассоциации между метилированием *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C* (p=0,024, q=0,036), а также пары *MIR-34B/C* и *MIR-34A* (p=0,010, q=0,029).

Оценка ассоциации метилирования изученных генов микроРНК с клинико-лабораторными показателями пациентов показала, что в подгруппе с метилированием *MIR-34A* 18/20 (90 %) пациентов имели высокий и промежуточный высокий риск, согласно Международному прогностическому индексу (МПИ), против 26/53 (49,1 %, p=0,002) в подгруппе больных без метилирования данного гена. Также была выявлена ассоциация метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203* с уровнем экспрессии Ki-67 более 45 % в опухолевой ткани: p=0,026, OR=3,819 (95% CI: 1,139; 12,804) и p=0,011, OR=4,457 (95% CI: 1,372; 14,481) соответственно.

Заключение

Метилирование промоторов генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* возникает сочетанно, носит опухоль-специфичный характер и может представлять собой один из важных механизмов снижения экспрессии онкосупрессорных микроРНК hsa-miR-129, hsa-miR-203, hsa-miR-34a и hsa-miR-34b/c при ДВККЛ. Показана ассоциация метилирования *MIR-34A* с неблагоприятным прогнозом по МПИ, а также метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203* с повышенной пролиферативной активностью опухоли. Поскольку данные микроРНК имеют общие мишени, а именно: C-MYC, CDK4, CDK6, MDM2, BCL2, MCL1, cyclin-D1 и другие, сочетанное aberrантное метилирование кодирующих их генов может иметь более активирующее влияние на пути лимфоомогенеза.

Таким образом, метилирование генов изученных микроРНК может являться как потенциальным дифференциально-диагностическим с реактивными изменениями лимфоузлов биомаркером, так и терапевтической мишенью при ДВККЛ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00222.

ЛИТЕРАТУРА

1. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. Frequency, spectrum and the functional significance of mutations in TP53 gene in patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Molekulyarnaya biologiya*. 2017. Vol. 51, № 13. P. 64-72.
2. Ворopaева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК XRCC1 с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности. *Гематология и трансфузиология*. 2013. Т. 58. № 1. С. 10-14.
3. Chim C.S., Wong K.Y. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies // *J Cell Mol Med*. 2011. V 15, N 12. P. 2760-2700. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01274.x.
4. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis // *Cell Death Differ*. 2010. Vol. 17. N 2. P. 193-199. doi: 10.1038/cdd.2009.56.
5. Wong K.Y., Yim R.L., Kwong Y.L., Leung C.Y., Hui P.K., Cheung F. Epigenetic inactivation of the MIR129-2 in hematological malignancies // *J Hematol Oncol*. 2013. Vol. 6. P. 16. doi: 10.1186/1756-8722-6-16

АЛЛОГЕННЫЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОТ НЕРОДСТВЕННЫХ ДОНОРОВ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

А.С. Шакенова, А.Н. Жұмбаева

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» МЗ РК, Республика Казахстан, город Нур-Султан

Аннотация

Метод трансплантации донорского костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) используется для лечения заболеваний кроветворной системы. Ежегодно в Республике Казахстан (РК) регистрируется от 200 до 250 случаев гемобластозов у детей. Наибольший удельный вес среди заболеваний кроветворной системы составляют лейкозы – 185–220 случаев, что составляет примерно 37–40 %. Среди взрослых ежегодно их регистрируется до 150 случаев. Особую озабоченность вызывает высокая летальность при данной патологии [1]. Одна из основных проблем, существующих в процессе лечения методом трансплантации, является необходимость подбора донора по системе лейкоцитарных антигенов, ответственных за иммунологическую совместимость донора и реципиента (HLA-система). При трансплантации ГСК необходим подбор по 5 локусам, в каждом из которых по 2 гена, имеющих до 60 аллельных вариантов. Поэтому вероятность подбора совместимого по HLA-системе донора варьирует от 1 : 10 000 до 1 : 10 000 000 в случае редкого HLA-фенотипа у пациента, что требует наличия огромного количества потенциальных доноров. В этой связи в последнее десятилетие в мировом сообществе гематологов и иммуногенетиков появилось понимание необходимости создания регистров доноров костного мозга, протипированных сразу по 5 локусам на высоком разрешении, что значительно ускоряет процесс поиска и выбора донора, а значит, и операции по трансплантации и, как следствие, увеличивает шанс на благоприятный исход. Исходя из этого, в мире уже более 30 лет идет постоянная работа по созданию и поддержанию Регистров потенциальных доноров ГСК, представляющих собой организации, управляющие специальными информационными базами данных о людях, давших согласие в случае необходимости стать донором ГСК. Помимо управления информацией о HLA-фенотипах потенциальных доноров эти структуры обеспечивают безопасность логистики передвижения биологического субстрата и его качество по всему миру, являясь обязательным посредническим звеном между донором и реципиентом. В данной статье описывается опыт проведения трансплантаций костного мозга от неродственных доноров в Республике Казахстан. Описано 4 клинических случая проведения трансплантации костного мозга (ТКМ).

Ключевые слова: трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, костный мозг, донор ГСК, типирование, запрос, поиск и активация донора ГСК.

ALLOGENEIC TRANSPLANTS FROM UNRELATED DONORS IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Shakenova A.S., Tolybaeva A.N.

RSE on REM «Research and Production Center for Transfusiology» of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Republic of Kazakhstan, Nur-Sultan

Annotation

The method of transplantation of donor bone marrow or hematopoietic stem cells (hereinafter referred to as HSC) is used to treat diseases of the hematopoietic system. Annually, from 200 to 250 cases of hemoblastoses are registered in children in the Republic of Kazakhstan (hereinafter referred to as the RK). The largest proportion among diseases of the hematopoietic system is leukemia - 185-220 cases, which is approximately 37-40%. Among adults, up to 150 cases are registered annually. Of particular concern is the high mortality in this pathology [1]. One of the main problems that exist in the process of transplantation treatment is the need to select a donor according to the system of leukocyte antigens responsible for the immunological compatibility of the donor and recipient (HLA system). HSC transplantation requires selection of 5 loci, each of which has 2 genes with up to 60 allelic variants. Therefore, the probability of selecting an HLA-compatible donor varies from 1:10,000 to 1:10,000,000 in the case of a rare HLA phenotype in a patient, which requires a huge number of potential donors. In this regard, in the last decade in the world community of hematologists and immunogenetics, an understanding has emerged of the need to create registers of bone marrow donors, typed at once for 5 loci at high resolution, which significantly speeds up the process of searching and choosing a donor, and hence transplantation operations and, as a result, increases the chance of a favorable outcome of a serious illness. Based on this, for more than 30 years the world has been constantly working to create and maintain Registers of potential HSC donors, which are organizations that manage special information databases about people who have agreed to become a HSC

donor if necessary. In addition to managing information about the HLA phenotypes of potential donors, these structures ensure the safety of the logistics of the movement of the biological substrate and its quality around the world, being an obligatory intermediary link between the donor and the recipient. This article describes the experience of bone marrow transplantation from unrelated donors in the Republic of Kazakhstan. 4 clinical cases of bone marrow transplantation (hereinafter referred to as BMT) are described.

Key words: transplantation, hematopoietic stem cells, bone marrow, HSC donor, typing, request, search and activation of HSC donor.

Актуальность. Применение аллогенной трансплантации ГСК позволяет достичь 5-летнюю общую выживаемость у 63 % детей с хроническим миелолейкозом и у 39 % с хроническим миеломоноцитарным лейкозом [2]. Кроме того, трансплантация ГСК является более эффективной в финансовом отношении для системы здравоохранения. Ежегодно в мире проводится около 50 000 трансплантаций ГСК.

Цель исследования – описание клинических случаев неродственной аллогенной трансплантации в РК.

Материал и методы

Приводится описание 4 клинических случаев проведения трансплантаций от неродственных доноров в РК. Подбор доноров проводился совместно с Национальным регистром доноров костного мозга, а также Научно-производственным центром трансфузиологии.

При подборе доноров проводилось дотипирование потенциального донора на высоком разрешении для минимизирования несовпадений с фенотипом пациента. Повторное типирование проводится HLA-лабораторией.

Сбор ГСК периферической крови проводится методом афереза на аппарате Spectra Optia.

Результаты

Для успешной трансплантации необходима максимальная иммунологическая совместимость пересаживаемой ткани, и далеко не во всех случаях ГСК даже кровные родственники могут быть подходящими для этих целей. Развитые страны формируют собственные базы данных потенциальных доноров ГСК, насчитывающие от десятков тысяч до нескольких миллионов, где почти каждый четвертый гражданин является донором.

Национальный регистр доноров костного мозга (далее – Регистр) начал создаваться на базе Научно-производственного центра трансфузиологии (НПЦТ) в 2012 г. [3].

Казахстанский Регистр потенциальных доноров насчитывает более 8000 и уже показал свою состоятельность. Все доноры Регистра протипированы по 5 локусам на высоком разрешении в соответствии с рекомендациями Европейской федерации иммуногенетиков (EFI). В Регистре зарегистрировано более 30 национальностей.

Аллогенные неродственные трансплантации в Казахстане составляют 0,04 % (в мировой практике – 0,01–0,06 %) от общего числа регистра. Потребность в неродственных трансплантациях в Казахстане, исходя из числа обращений, составляет порядка 10–15 случаев в год.

В 2018 г. в Казахстане произошло весьма значимое событие в области трансплантации тканей: выполнена первая неродственная трансплантация ГСК казахстанского донора казахстанскому реципиенту, страдающего раком крови. С тех пор были проведены 4 неродственные аллогенные трансплантации для казахстанских и российского пациентов. Все пациенты являются детьми.

10 октября 2017 г. поступил запрос в Регистр из Национального научного центра материнства и детства (ННЦМД) о поиске и активации донора TSE 17518 для пациента 2006 г. р., с диагнозом: Острый лимфобластный лейкоз. Вес пациента составлял 36 кг.

Донором явилась женщина, 1962 г. р., на момент сбора ГСК возраст 56 лет. Старшая медицинская сестра городской поликлиники г. Нур-Султан, которая поступила в национальный Регистр доноров костного мозга в 2014 г.

Группа крови – A(II) Rh+ вторая положительная.

Акушерский анамнез: 2 детей.

Вес на момент сбора составил 100 кг.

При обследовании и сборе анамнеза противопоказаний к проведению аллогенной трансплантации не обнаружено.

Наряду с донором TSE 17518 выявлено три российских донора, типированных на малом и среднем разрешении, и один казахстанский донор, типированный на высоком разрешении с одним несовпадением по A локусу:

При дотипировании российских доноров на высоком разрешении определено несовпадение по нескольким локусам.

Второй казахстанский донор, также с одним несовпадением по А локусу, 1967 г.р., (50 лет) отказался от донорства по причине плохого состояния здоровья (онкогинекологическая патология и кардиоваскулярные нарушения).

Для подготовки и стимуляции костного мозга донор был госпитализирован в ННЦМД.

Сбор ГСК периферической крови – 12.01.2018 г.

Продукт: ГСК периферической крови.

Аппарат: Spectra Optia.

Общий объем: $CD34+ 10^6/кг = 5,1$.

22 января 2018 г. выполнена аллогенная трансплантация костного мозга от неродственного донора, совпадение по HLA типированию 9/10. На +3 +4 день проводилась Т-деплеция *in vivo*. В первые дни отмечались признаки острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – кожная форма.

После проведения трансплантации группа крови пациента сменилась на А(II) – вторую положительную. Самочувствие реципиента на настоящий момент удовлетворительное.

13 мая 2019 г. в Регистр поступил запрос из Научного центра педиатрии и детской хирургии (НЦПДХ) о поиске и активации донора TSE 16419 для пациента, 2017 г. р., с диагнозом: Миелодиспластический синдром. Состояние после аллогенной трансплантации ГСК, полное отторжение трансплантата. Вес пациента составлял 6 кг.

Донором явился мужчина, 1990 г. р., на момент сбора ГСК возраст составил 29 лет. Врач городской больницы г. Шымкент, который вступил в национальный Регистр в 2014 г.

Группа крови – О (I) Rh+ первая положительная. Вес – 82 кг.

При сборе анамнеза противопоказаний к проведению аллогенной трансплантации не обнаружено. При обследовании были выявлены IgG к цитомегаловирусной инфекции. После проведения консилиума врачами из НЦПДХ было принято решение о проведении трансплантации 27 августа 2019 г.

Для подготовки и стимуляции костного мозга донор был госпитализирован в Национальный научный онкологический центр (ННОЦ).

Сбор ГСК периферической крови – 25.08.2019 г.

Продукт: ГСК периферической крови.

Аппарат: Spectra Optia.

Общий объем: $CD34+ 10^6/кг = 17,2$.

26 августа 2019 г. выполнена аллогенная трансплантация костного мозга от неродственного донора совпадение по HLA типированию 9/10. Была проведена Т-деплеция *in vivo*. После проведения трансплантации пациент находился в тяжелом состоянии.

Реципиент на настоящий момент направлен на повторное проведение трансплантации за рубежом.

25 ноября 2019 г. поступил запрос в Регистр из Научного центра педиатрии и детской хирургии (НЦПДХ) о поиске и активации донора TSE 27425 для пациента, 2009 г. р., с диагнозом: Острый лимфобластный лейкоз. Вес пациента составлял 23 кг.

Донором явилась женщина, 1979 г. р., на момент сбора ГСК возраст составил 40 лет.

Группа крови – А (II) Rh+ первая положительная.

Акушерский анамнез: 2 детей. Вес – 74 кг.

При обследовании донора и сборе анамнеза противопоказаний к проведению аллогенной трансплантации не обнаружено. После проведения переговоров сотрудников из НЦПДХ и ННЦТ было принято решение о проведении трансплантации 27 декабря 2019 г.

Для подготовки и стимуляции костного мозга донор был госпитализирован в ННОЦ.

Сбор ГСК периферической крови – двукратно, 25 и 26.12.2019 г.

Продукт: ГСК периферической крови.

Аппарат: Spectra Optia.

Общий объем: $CD34+ 10^6/кг = 7,1$.

27 декабря 2019 г. выполнена аллогенная трансплантация костного мозга от неродственного донора, совпадение по HLA типированию 10/10. Была проведена Т-деплеция *in vivo*. После проведения трансплантации пациент чувствовал себя удовлетворительно, состояние соответствовало посттрансплантационному периоду.

Результат химеризма через 30 дней составил 99,2 %. После выписки пациент находился под наблюдением врачей. К середине 2020 г. начались признаки острой РТПХ, и пациент умер.

21 августа 2020 г. поступил запрос в Регистр из ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» МЗ РФ (Москва, Россия) о поиске и активации донора TSE 15685 для пациента, 2017 г. р., с диагнозом: Первичный иммунодефицит. Вес пациента составлял 15 кг.

Пациент ранее получал донорские ГСК от неродственного донора из Германии, где совпадение по HLA типированию 9/10.

Донором явился мужчина, 1991 г. р., на момент сбора ГСК возраст составил 29 лет. Сотрудник прокуратуры г. Павлодар.

Группа крови – O (I) Rh⁺ первая положительная. Вес – 86 кг.

Изначальная дата трансплантации была назначена на февраль 2021 г. В связи с пандемией коронавирусной инфекции и закрытием границ дата трансплантации была перенесена.

При обследовании донора и сборе анамнеза противопоказаний к проведению аллогенной трансплантации не обнаружено. После проведения переговоров сотрудников из НПЦТ и ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» было принято решение о проведении трансплантации 21 апреля 2021 г.

Для подготовки и стимуляции костного мозга донор был госпитализирован в ННОЦ.

Сбор ГСК периферической крови – 20.04.2021 г.

Продукт: ГСК периферической крови.

Аппарат: Spectra Optia.

Общий объем: CD34⁺ 10⁶/кг = 102,3.

21 апреля 2021 г. выполнена аллогенная трансплантация костного мозга от неродственного донора, совпадение по HLA типированию 10/10. Была проведена T-деплеция *in vivo*. После проведения трансплантации состояние пациента соответствовало посттрансплантационному периоду.

Результат химеризма через 30 дней составил 99,8 %. На сегодняшний день трансплантат функционирует, состояние пациента заметно улучшилось, отмечается прибавка в весе и росте.

Заключение

Метод аллогенной трансплантации от неродственного донора, бесспорно, является одним из основных действенных методов лечения заболеваний крови. Однако в Республике Казахстан было проведено незначительное количество трансплантаций, поэтому рано делать выводы о выживаемости после неродственной трансплантации.

Для улучшения ситуации с трансплантологией костного мозга в нашей стране и ее развития следует развивать и базу Регистра доноров костного мозга. Это намного увеличит шансы пациентов на поиск неродственного донора в РК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кайдарова Д.Р., Чингисова Ж.К., Шатковская О.В., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж., Лаурентьева И.К., Саги М.С. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год (статистические и аналитические материалы). Алматы, 2019. С.114-119.
2. Кайдарова Д.Р., Чингисова Ж.К., Шатковская О.В., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Жылкайдарова А.Ж., Лаурентьева И.К., Саги М.С. Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2018 год (статистические и аналитические материалы). Алматы, 2019. С.182.
3. Имашпаев Д.М. Организация регистра доноров ГСК в мире и Казахстане // Медицина. Алматы. 2018. №9 (195). С. 8-14.

КОНЦЕПЦИЯ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ ПОПЕРЕЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ПУЧКОВ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**А.Е. Шарыпова¹, А.А. Булавская¹, А.А. Григорьева¹,
И.А. Милойчикова^{1,2}, Ю.М. Черепенников¹, С.Г. Стучебров¹**

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

В данной работе представлена концепция метода измерения поперечного распределения медицинских пучков. Для возможности использования одного детектора при различных типах излучения предлагается конструкция универсального детектора на основе сцинтилляционного оптоволоконка. Проведен эксперимент на рентгеновской трубке, в результате которого была показана работоспособность предложенного детектора.

Ключевые слова: медицинский пучок, универсальный детектор, сетчатый детектор, профиль пучка, обратное преобразование Радона, сцинтилляционное оптоволоконно, кремниевый фотоэлектронный умножитель.

THE CONCEPTION OF THE METHOD FOR TRANSVERSE PROFILE MEASUREMENT OF THE IONIZING RADIATION MEDICAL BEAMS

A.E. Sharypova¹, A.A. Bulavskaya¹, A.A. Grigorieva¹, I.A. Miloichikova^{1,2}, Cherepennikov Yu.M¹, S.G. Stuchebrov¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Annotation

This paper presents the concept of a method for measuring the transverse distribution of medical beams. For the possibility of using one detector for different types of radiation, a design of a universal detector based on a scintillation fiber is proposed. An experiment was carried out on an X-ray tube, as a result of which the operability of the proposed detector was shown.

Key words: medical beam, universal detector, mesh detector, beam profile, inverse Radon conversion, scintillation fiber, silicon photomultiplier tube.

Актуальность. Применение ионизирующего излучения имеет широкую область, особое место занимает медицина. Одними из распространенных источников излучения являются ускорители. Для правильного использования и вывода пучка ускоренных частиц необходимо точно знать его характеристики. В настоящее время благодаря распространенности разных источников пучков ионизирующего излучения имеются различные формы лучевой терапии для борьбы с онкологическими заболеваниями. Это имеет очень большое значение в мире, так как заболеваемость онкологией возрастает. По данным онколога Минздрава РФ Андрея Каприна, число заболевших в России возросло на 23 % за последние 10 лет [1]. Под воздействием излучения в новообразованиях происходят изменения в молекулах клеток (ионизация или возбуждение), вследствие чего идут процессы расщепления опухоли. При проведении лучевой терапии поражаются не только опухоль, но и здоровые ткани [2]. Раковые клетки имеют высокую скорость деления, поэтому поглощают основную часть излучения [3]. Высокая точность доставки дозы предоставляет возможность меньшего поражения жизненно важных здоровых органов при терапии онкологических заболеваний. Важной задачей остается усовершенствование технологий и методов диагностики терапевтических пучков ионизирующего излучения. На данный момент существует несколько типов детекторов, которые позволяют измерить двумерный поперечный профиль пучка. Однако такие детекторы имеют ряд существенных недостатков, например, пленочные детекторы являются одноразовыми, а матричные детекторы обладают низким разрешением. Актуальным является вопрос наличия универсального метода для определения поперечного распределения, фотонных, протонных и ионных пучков, использующихся в медицине.

Целью исследования стала разработка концепции метода определения поперечного распределения медицинских пучков в поперечном сечении.

Материал и методы

Для измерения поперечного распределения необходимо разработать детектор. В работе предлагается использовать сетчатый детектор, состоящий из набора сцинтилляционных оптоволокон. На рис. 1 представлена схема такого детектора.

Предложенный детектор (рис. 1) позволит получить профиль пучка. При взаимодействии излучения со сцинтилляционным веществом происходит образование вторичного излучения [4]. Сцинтилляционный материал позволяет улавливать различные виды излучения (протоны, электроны, ионы, фотоны), поэтому данный детектор является универсальным. Преобразование вспышек в электрические импульсы происходит за счет кремниевого фотоэлектронного умножителя (ФЭУ PE3315-WB-TIA-TP производителя КЕТЕК, активная область детектора – 3x3 мм² [5]).

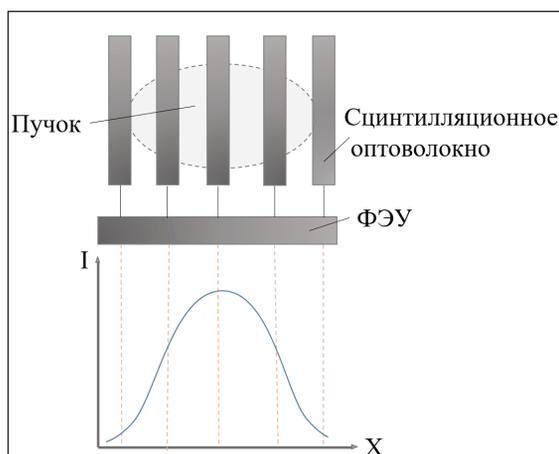


Рис. 1. Измерение профиля пучка предложенным сетчатым детектором

Результаты

На первом этапе работы была показана работоспособность предложенных узлов детектора. Для этого был проведен эксперимент на рентгеновской трубке UNIPOLAR 160KV X-RAY TUBES [6]. На расстоянии 1 см от источника было установлено сцинтилляционное оптоволокно, на которое попадало рентгеновское излучение. Сцинтилляционное оптоволокно соединялось с ФЭУ, сигнал с которого снимался с помощью осциллографа Tektronix 4 Series MSO [7]. В результате были получены напряжения на осциллографе при разных режимах работы рентгеновской трубки (таблица).

Таблица

Результаты эксперимента на рентгеновской трубке

Параметры рентгеновской трубки		Осциллограф
I, mA	U, kV	U, mV
1	60	40
2	60	80
4	60	160
8	60	320
8	120	400
4	160	200

По полученным данным (таблица) видно, что при повышении тока или напряжения на рентгеновской трубке наблюдается линейное повышение выходного напряжения на осциллографе. Это показывает, что предложенный детектор позволяет проводить абсолютные дозовые измерения.

В соответствии с полученными результатами была разработана концепция метода измерения поперечного распределения пучков. Схема предложенного метода представлена на рис. 2.

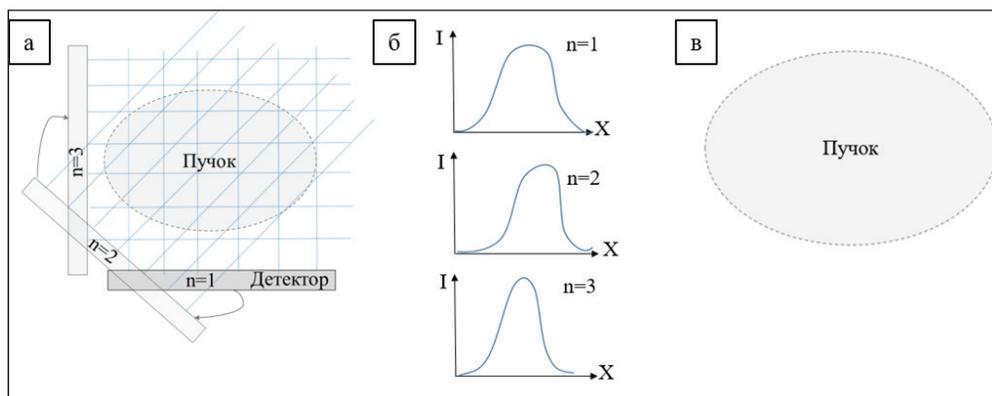


Рис. 2. Схема метода измерения поперечного распределения медицинских пучков: а) поворот детектирующей системы на n углов, б) набор профилей, в) поперечное распределение пучка

Получение информации о форме пучка достигается за счет поворота разработанной детектирующей системы на n -е количество углов [8, 9] (рис. 2,а). Таким образом, будет получен набор профилей пучка под разными углами (рис. 2,б). Далее проводится математическая реконструкция полученных данных, которая представляет собой задачу интегральной геометрии преобразования функции переменных x и y в двумерную (рис. 2,в). Обратное преобразование Радона позволяет решить данную задачу. Определяется интеграл от функции плоскостей x , y вдоль прямой, перпендикулярной на расстоянии от начала координат [10]. Преобразование Радона широко применимо к томографии и является качественным методом восстановления изображений по известным профилям пучков заряженных частиц [11].

Предложенный в рамках данной работы метод позволит измерить поперечное распределение пучка с высоким разрешением и относительно быстро. Подобранные узлы детектирующей системы позволят проводить измерения сложного распределения электронных, фотонных, протонных и ионных пучков, а также получать абсолютные дозовые характеристики пучков при облучении.

Выводы

В рамках данной работы была показана концепция метода определения поперечного распределения медицинских пучков ионизирующего излучения. Данный метод планируется реализовать с помощью универсального детектора на основе сцинтилляционного оптоволоконна и кремниевого ФЭУ. Полученная концепция может быть применена для дозиметрии медицинских пучков, что позволит увеличить точность проведения лучевой терапии и исключит необходимость использования нескольких типов детекторов для различных пучков.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 21-79-00252.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Статистика онкозаболеваемости* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://glavonco.ru/>
2. *Washington C. Leaver D. Principles and Practice of Radiation Therapy*. Elsevier Mosby, 2016.
3. *Fior R., Zilhão R. Molecular and Cell Biology of Cancer* // Learning Materials in Biosciences 2019. P.35.
4. *Knoll G.F. Radiation Detection and Measurement*. 2000. P. 219.
5. *Фотоэлектронный умножитель* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ketek.net/wp-content/uploads/KETEK-PE3315-WB-TIA-TP.pdf>
6. *Рентгеновская трубка UNIPOLAR 160KV X-RAY TUBES* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gulmay.com/x-ray-tubes/unipolar-160kv-x-ray-tubes/>
7. *Осциллограф Tektronix 4 Series MSO* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.tek.com/ru/products/oscilloscopes/4-series-mso>
8. *Stuchebrov S.G., Miloychikova I.A., Batranin A.V., Danilova I.B., Krasnykh A.A., Kudrina V.A.* Development of the method for the electron beam spatial distribution determination in the transverse plane // AIP Conference Proceedings. 2016. Vol. 1772, Article number 060016. P. 1-7.
9. *Данилова И.Б., Красных А.А., Милойчикова И.А.* Определение оптимального количества углов сканирования для измерения распределения плотности потока электронного пучка // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: в 7 т., Томск, 23–26 Апреля 2019. Томск: ТПУ, 2019. Т. 1: Физика. С. 124-126.
10. *Helgason, Sigurdur. Integral Geometry and Radon Transforms*. Springer, 2010.
11. *Ramm, A. G., Katsévich, A.I. The Radon Transform and Local Tomography*. 2020.

ВЕРОЯТНОСТЬ ДО- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РАСХОЖДЕНИЯ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.С. Шмидт¹, А.А. Кельн^{1,2}

ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России; Тюмень, Россия¹
 ГАУЗ ТО МКМЦ «Медицинский город» Тюмень, Россия²

Аннотация

Изменение степени дифференцировки опухоли по шкале Глисона при трактовке результатов исследования операционного материала после радикальной простатэктомии (РПЭ) по сравнению с результатами биопсии является известным феноменом, который зависит как от ряда субъективных (опыт патоморфолога), так и от объективных факторов (различия в количестве биопсийного и операционного материала и др.). **Целью** нашего исследования было изучение частоты расхождения до и после оперативного морфологического материала у пациентов с раком предстательной железы. Необходимо

установление взаимосвязи между частотой расхождения дифференцировки опухоли и клиническими предоперационными факторами прогноза.

Ключевые слова: радикальная простатэктомия, градация опухоли, биопсийные столбики, хирургический край.

THE PROBABILITY OF A PRE- AND POST-OPERATIVE DISCREPANCY IN THE DEGREE OF DIFFERENTIATION OF PROSTATE CANCER

S.S. Schmidt¹, A.A. Kelin^{1,2}

Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Tyumen, Russia¹
GAU TO MCMC "Medical City"; Tyumen, Russia²

Annotation

The change in the degree of tumor differentiation on the Gleason scale when interpreting the results of the examination of surgical material after radical prostatectomy (RPE) compared with the results of biopsy is a well-known phenomenon that depends on both a number of subjective (the experience of a pathologist) and objective factors (differences in the amount of biopsy and surgical material, etc.). The purpose of our study was to study the frequency of divergence before and after surgical morphological material in patients with prostate cancer. It is necessary to establish the relationship between the frequency of divergence of tumor differentiation and clinical preoperative prognostic factors.

Key words: radical prostatectomy, tumor grading, biopsy columns, surgical margin.

Актуальность. В России за 2020 г. взято на учет 33 707 больных с впервые в жизни установленным диагнозом рак предстательной железы (РПЖ), что составляет 183,4 на 100 тыс. населения. По данным Тюменского популяционного канцер-регистра, за 2020 г. зарегистрировано 444 случая РПЖ. Летальность в первом году с момента установления диагноза составила 3,2 % [1, 2]. В настоящее время перед онкологами ставится вопрос об определении прогноза при выборе объема хирургического лечения. Риск развития рецидива определяют по совокупности биомаркеров: уровню сывороточного простатического специфического антигена (ПСА), патологоанатомической стадии рака, сумме Глисона, характеру хирургического края, объему удаленной опухоли, лимфоваскулярной и периневральной инвазии [3, 4]. Одним из прогностических и важных факторов является расхождение степени дифференцировки опухоли по шкале Глисона на основании результатов биопсии и патоморфологического исследования операционного материала [5, 6]. В связи с этим необходимо установление взаимосвязи между частотой расхождения дифференцировки опухоли и клиническими предоперационными факторами прогноза.

Цель исследования – изучить частоту расхождения до- и послеоперативного морфологического материала у пациентов с раком предстательной железы.

Материал и методы

В базе данных ГАУЗ ТО МКМЦ «Медицинский город» г. Тюмень, в период с 2017 по 2021 г. были отобраны случаи морфологически подтвержденной аденокарциномы предстательной железы. Проведен ретроспективный анализ 406 медицинских карт пациентов с диагнозом РПЖ, которым была выполнена радикальная простатэктомия (РПЭ). Средний возраст больных составил 62,4 года (46–76 лет). Исследовали морфологическую структуру опухоли, уровень исходного ПСА, патологическую стадию РПЖ, количество пораженных биопсийных столбиков, объем опухоли в биоптате, характер хирургического края, степень дифференцировки биопсийного и операционного материала опухоли по шкале Глисона.

Результаты

Клиническая стадия T1b–1c верифицирована у 4 (0,98 %) пациентов, T2a–2c – у 165 (40,6%), T3a–3b – у 214 (52,7 %) пациентов, T4a – у 23 (5,72%) пациентов. Среднее число биоптатов с аденокарциномой составило 4,48 (от 1 до 12). При оценке по шкале Глисона в образцах тканей опухоли, сумма исходного Глисона составила: 6 баллов у 129 (31,8 %) пациентов, 7–8 баллов – у 255 (62,8 %) пациентов, 9–10 баллов – у 22 (5,4 %) пациентов. Показанием к выполнению биопсии простаты с последующей оценкой по шкале Глисона

послужило определение участков с плотностью, отклоняющейся от нормы, при выполнении ТРУЗИ и пальцевого ректального исследования, а также повышенный уровень ПСА. Медиана уровня ПСА составила 11,0 нг/мл (1,2–67 нг/мл). Сумма Глисона после РПЭ: 6 баллов у 74 (18,2%) пациентов, 7–8 баллов у 299 (73,6%) пациентов и 9 баллов у 33 (8,2%) пациентов. Занижение суммы исходного Глисона, полученного по результатам биопсии, отмечено у 36 (8,86 %) от общего числа пациентов: у 11 (2,71 %) с суммой Глисона 6–7 баллов, у 24 (5,9 %) с 8–9 баллами и у 1 (0,25 %) с суммой 10. Завышение суммы Глисона по результатам биопсии отмечено у 84 (20,7 %) больных: у 79 пациентов (19,5 %) с дифференцировкой опухоли по шкале Глисона сумма составила 6–7 баллов и у 5 (1,2 %) – 8 баллов. Соответствие суммы Глисона при анализе биопсийного и операционного материала отмечено у 286 пациентов (70,4 %). Высока (19,5 %) вероятность повышения градации опухоли при исследовании операционного материала после РПЭ в подгруппе пациентов с суммой Глисона 6–7 баллов при биопсии.

Выводы

К факторам, влияющим на несовпадение результатов исследований биопсийного и операционного материала, относились: малый объем опухоли, опухоли с высокой степенью дифференцировки, гетерогенность опухоли, погрешности при взятии материала, когда в биопсийном материале оказывается компонент с более высокой степенью дифференцировки, а вторичный в биоптатах не определяется; пограничные опухоли, степень дифференцировки которых установить затруднительно, занижение патологоанатомом степени дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований в Тюменской области в 2008–2018 гг.* / под редакцией Фёдорова Н.М., Зотова П.Б. Тюмень, 2021. С. 122-127.
2. *Кельн А.А., Зырянов А.В., Зотов П.Б., Пономарев А.В., Суриков А.С., Знобищев В.Г.* Роль сатурационной трансперинеальной биопсии в диагностике рака предстательной железы в «эру» таргетной fusion-биопсии. Креативная хирургия и онкология. 2018. Т. 8, № 2. С. 111-116.
3. *Partin A.* Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. JAMA. 2017;277(18):1445.
4. *Kattan M.W., Zelefsky M.J., Kupelian P.A. et al.* Pretreatment nomogram for predicting the outcome of three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer. J Clin Oncol. 2019; 18:3352-3359.
5. *Epstein J.* Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. JAMA. 2017; 271(5):368-374.
6. *Простатит и заболевания-имитаторы.* Клинические разборы / под редакцией Когана М.И., Ибишева Х.С., Белоусова И.И., Набока Ю.Л. М., 2019. С. 24-27.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВИЧНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВАМИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

А.О. Шумейкина¹, Е.А. Самойлова², К.В. Вавилов², С.Э. Красильников^{1,2}, Н.М. Пасман¹

Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия¹
Институт онкологии и нейрохирургии ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

Ретроспективно проанализировано 74 истории болезни пациенток за период 2011–2021 гг., которые получали лучевую терапию по поводу рецидивов РШМ в ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина». Основным методом лечения первичных больных – сочетанная лучевая терапия – 28 больных (38 %), хирургический метод – 17 больных (23 %), химиолучевая терапия – 14 больных (19 %), хирургия в сочетании с адъювантной лучевой терапией – 14 больных (19 %), полихимиотерапия (с паллиативной целью) – 1 больная (1 %), неoadъювантная химиотерапия – 5 пациенток (6,7 %), предоперационная лучевая терапия – 1 (1,3 %). В структуре типов рецидивов наиболее распространены локорегионарные рецидивы – 32 больных (43 %), местные рецидивы – 20 больных (27 %), метастатические гематогенные – 14 (19 %), метастатические лимфогенные – 8 (11 %). При этом чаще отмечаются поздние рецидивы (более 24 мес) – 48 случая (65 %), ранние (12–24 мес) – 15 (20 %), прогрессирование (до 6 мес) – 11 (15 %). Частые локализации для возникновения отдаленных метастазов РШМ – кости и легкие (по 35,8 %), головной мозг и печень (по 14,2 %), паховые и надключичные лимфоузлы. Учитывая, что у больных РШМ после первичного лечения в 65 % возникали поздние рецидивы, в 50 % – рецидивы возникают у больных с начальными стадиями, больным показано более частое и длительное наблюдение у он-

когинеколога. Вне зависимости от стадии, сроков возникновения, локализации рецидивов показано лечение у онколога, радиолога, нейрохирурга, химиотерапевта.

Ключевые слова: рак шейки матки, рецидивирующий и метастатический рак шейки матки, стереотаксическая лучевая терапия.

ANALYSIS OF THE RESULTS OF PRIMARY TREATMENT OF PATIENTS WITH RECURRENT CERVICAL CANCER

A.O. Shumeikina¹, E.A. Samoylova², K.V. Vavilov², S.E. Krasil'nikov^{1,2}, N.M. Pasman¹

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia¹
Institute of Oncology and Neurosurgery, E.N. Meshalkin. National Medical Research Center, Ministry of Health of Russia, Novosibirsk, Russia²

Annotation

We analyzed 74 cases of patients for the period 2011–2021 who received radiation therapy for recurrence of cervical cancer in the E.N. Meshalkin. National Medical Research Center. The main primary method of treating is combined radiation therapy - 28 (38%), surgical method - 17 (23%), chemoradiotherapy - 14 (19%), surgery in combination with adjuvant radiation therapy - 14 (19%), polychemotherapy - 1 (1%). Neoadjuvant chemotherapy - 5 (6.7%), preoperative radiation therapy - 1 (1.3%). In the structure of types of recurrences, the most common are locoregional recurrences - 32 (43%), local recurrences - 20 (27%), metastatic hematogenous - 14 (19%), metastatic lymphogenous - 8 (11%). More often - late recurrences (more 24 months) - 48 (65%), early (12–24 months) - 15 (20%), progression (up to 6 months) - 11 (15%). Considering that in patients with cervical cancer after primary treatment, late recurrences occurred in 65%, and in 50% recurrences occur in patients with initial stages, patients need more frequent and longer follow-up with an oncogynecologist. Regardless of the stage, timing, localization of recurrences, patients need the treatment by an oncologist, radiologist, neurosurgeon, chemotherapist.

Key words: cervical cancer, recurrences and metastases or cervical cancer, stereotactic radiotherapy.

Актуальность. Заболеваемость РШМ в мире составляет 500 000 новых случаев в год. В структуре смертности от злокачественных новообразований у женщин до 45 лет РШМ занимает 1-е место [1]. Частота рецидивов РШМ коррелирует с исходной распространенностью опухолевого процесса: при более запущенных стадиях – выше вероятность рецидива. [2] Одним из возможных методов лечения рецидивов РШМ является стереотаксическая лучевая терапия [3, 4], которая позволяет неинвазивно подвести радикальную дозу ионизирующего излучения без серьезных токсических осложнений [5]. **Цель исследования** – с целью выбора метода лечения рецидивов РШМ провести многофакторный анализ результатов первичного лечения больных РШМ.

Материал и методы

Проведен ретроспективный анализ 74 историй болезни пациентов с диагнозами рецидивов РШМ, которые получали лучевую терапию в ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» в период 2011–2021 гг. Пациентки были обследованы согласно международным стандартам и клиническим рекомендациям Минздрава РФ. Диагнозы рецидивов и метастазов были верифицированы морфологически, а также с применением дополнительных методов исследования: МРТ, КТ, ПЭТ-КТ, остеосцинтиграфия. У всех пациенток из этой группы (n=74) проводилась стереотаксическая конформная лучевая терапия на аппарате ELEKTAAXESSE, с методикой ротационного объемно-модулированного облучения (VMAT). Использовались следующие ограничения критических органов: $D_{0,1\text{см}^3}$ (спинной мозг) <18 Гр; $V_{15\text{Гр}}$ (почка) <35%; $V_{36\text{Гр}}$ (двенадцатиперстная кишка) <1%; $V_{36\text{Гр}}$ (желудок, тонкий кишечник) <3%; $V_{15\text{Гр}}$ (печень) <3%; $V_{23\text{Гр}}$ (ворота почки) <33%. Всем пациентам проводилось топометрическое КТ сканирование, при необходимости использовались данные МРТ и ПЭТ КТ. GTV определялся по фактическому макроскопическому объему на КТ снимках. Для получения PTV использовался отступ 3–7 мм в зависимости от локальной подвижности. Подвижность оценивалась в зависимости от положения очага при максимальном вдохе и выдохе.

Результаты

Основной метод лечения первичных больных – сочетанная лучевая терапия (СЛТ) – 28 больных (38 %), хирургический метод – 17 больных (23 %), химиолучевая терапия (ХЛТ) – 14 (19 %), хирургия в сочетании с адъювантной лучевой терапией – 14 (19 %), полихимиотерапия (с паллиативной целью) – 1 больная (1 %), неoadъювантная химиотерапия – 5 случаев (6,7 %), предоперационная лучевая терапия – 1 (1,3 %).

Возраст пациенток с рецидивами РШМ варьировал от 24 до 82 лет. Средний возраст составил $47,7 \pm 12,5$ лет. По результатам патоморфологического исследования: плоскоклеточный рак – у 66 пациенток (89,2 %), аденокарцинома – у 8 (10,8 %). Сопутствующая патология была выявлена у 50 больных (67,6 %). III стадия заболевания – у 35 больных (47,3 %), II – у 20 (27 %), I – у 17 (23 %), IV у 2 (2,7 %).

Таблица 1

Распределение больных с рецидивами РШМ по стадиям

Стадия	Количество больных (n = 74)	Процент (%)
I (T ₁ N ₀ M ₀)	17	23,0 %
II (T ₂ N ₀ M ₀)	20	27,0 %
III (T ₃ N _{x,0-1} M ₀)	35	47,3 %
IV (T ₄ N _{x,0-1} M ₀₋₁)	2	2,7 %

При применении хирургического метода лечения рецидив возникал в среднем через 37,6 мес. В случае сочетания хирургического метода с адъювантной лучевой терапией наблюдалось возникновение рецидива в среднем через 31,4 мес, при применении ХЛТ – через 23 мес, при СЛТ – в среднем через 29,8 мес. Более ранние сроки возникновения рецидивов наблюдаются у больных, получавших комбинированные методы лечения. Это объясняется исходной запущенностью заболевания.

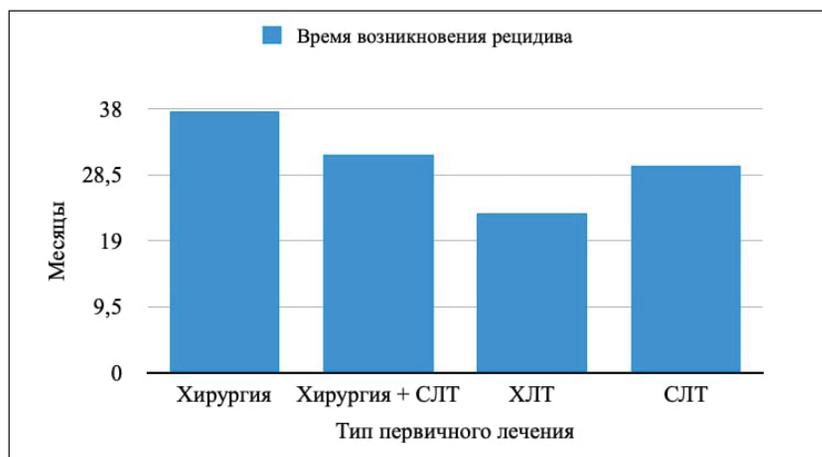


Рис. 1. Время до возникновения рецидива в зависимости от типа первичного лечения: СЛТ – сочетанная лучевая терапия; ХЛТ – химиолучевая терапия

Более ранние сроки возникновения рецидивов у больных, получавших комбинированные методы лечения, объясняются исходной запущенностью заболевания

В структуре типов рецидивов наиболее распространены локорегионарные рецидивы – 32 больных (43 %), местные рецидивы – 20 больных (27 %), метастатические гематогенные – 14 (19 %), метастатические лимфогенные – 8 (11 %) пациенток.

По времени возникновения наиболее часты поздние рецидивы (более 12 мес после первичного лечения) – 48 больных (65 %), ранние (6–12 мес) – 15 (20 %), прогрессирование (до 6 мес) – 11 (15 %). Локорегионарные рецидивы РШМ встречаются при ранних формах рецидивов и чаще – при поздних (65,6 % от всех локорегионарных рецидивов). Метастазы РШМ наиболее часто встречаются в позднем периоде наблюдения (более 12 мес) – 68,2 % от всех случаев метастазов РШМ. Местные рецидивы также наблюдаются в более отдаленном периоде (60 %).

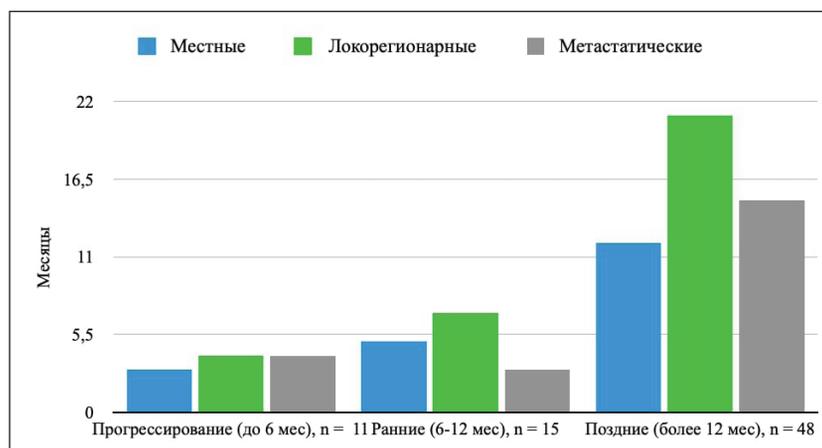


Рис. 2. Структура типов рецидивов в зависимости от времени возникновения

Локорегионарные рецидивы РШМ встречаются при ранних формах рецидивов, и более часто – при поздних (65,6 % от всех локорегионарных рецидивов). Метастазы РШМ наиболее часто встречаются в позднем периоде наблюдения (более 12 мес) – 68,2 % от всех случаев метастазов РШМ. Местные рецидивы также наблюдаются в более отдаленном периоде (60 %)

Заключение

1. Несмотря на ранние стадии заболевания и эффективность методов лечения, в 50 % случаев встречались рецидивы у больных с I (23 %) и II (27 %) стадиями заболевания, что говорит о необходимости более частого и длительного наблюдения за группой пациенток с начальными стадиями.

2. Местные рецидивы чаще всего возникали у больных с I стадией заболевания (55 % случаев). Локорегионарные рецидивы чаще возникали у больных с III стадией заболевания (62,5 %). Учитывая характер рецидивов, в период наблюдения необходимы: осмотр онкогинеколога, кольпоскопия, патоморфологическое исследование, УЗИ органов малого таза и брюшной полости, КТ.

3. Наиболее частые локализации отдаленных метастазов РШМ – кости и легкие (по 35,8 %), головной мозг и печень (по 14,2 %). Среди лимфогенных отдаленных метастазов – паховые и надключичные лимфоузлы (по 50 %).

4. Поздние рецидивы (более 12 мес) возникали в 65 % случаев вне зависимости от стадии заболевания, что диктует необходимость более длительного наблюдения пациенток после лечения РШМ.

5. Одним из методов лечения рецидивов РШМ является стереотаксическая конформная лучевая терапия, в данной выборке она применялась вне зависимости от возраста, стадии процесса, типа первичного лечения, результатов патоморфологического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии. М.: Медицина, 1989. 463 с.
2. Gadducci A., Cosio S. Pharmacological Treatment of Patients with Metastatic, Recurrent or Persistent Cervical Cancer Not Amenable by Surgery or Radiotherapy: State of Art and Perspectives of Clinical Research. *Cancers (Basel)*. 2020.
3. Чойнзонов Е.Л., Мусабаева Л.И., Лисин В.А., Тюкалов Ю.И., Новиков В.А. Новая технология интраоперационной лучевой терапии в сочетании с дистанционной гамма- терапией при комбинированном лечении онкологических больных // Онкохирургия. 2010. Т.2, №3. С.26-36
4. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Трущук Ю.М., Шпилева О.В., Денисов Е.В., Ларионова И.В., Старцева Ж.А., Чернов В.И., Марченко Е.С., Чекалкин Т.Л., Антипов В.А., Красильников С.Э. Современные подходы к выбору тактики лечения у больных раком шейки матки //Опухоли женской репродуктивной системы. 2021.17(3). С.128-133.
5. Красильников С.Э. Патоморфологическое обоснование неоадьювантной химио-, лучевой терапии в сочетании с индуктором интерферонотенеза в комплексном лечении рака шейки матки: дис. ... д-ра мед. наук, Новосибирск, 2004. 296 с.

ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СОЦИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ И ЛИЧНОСТНАЯ ТРЕВОЖНОСТЬ

А.Е. Абдрахманова¹, И.С. Ефремов²

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Уфа, Россия¹

ГБУЗ Республики Башкортостан «Республиканская клиническая психиатрическая больница»,
г. Уфа, Россия²

Аннотация

В работе приводятся данные исследования ассоциации зависимости от социальных сетей и пола, типа пользовательской активности в социальной сети, выраженности личностной тревожности. Были использованы психодиагностический метод и метод обработки статистических данных. В качестве методик были использованы Бергенская шкала зависимости от социальных сетей (Andreassen et al., 2016), шкала оценки уровня личностной тревожности Ч. Спилбергера – Ю.Ханина (1976). Исследуемым стал 771 русскоязычный Интернет-пользователь (506 женского пола, 265 мужского пола). В результате проведения пилотного исследования было выявлено, что признаки зависимости от социальных сетей характерны для лиц женского пола ($\chi^2=13,674$; $p=0,000$), а также для тех, кто использует социальные сети для выкладывания контента ($N=60,8$; $p=0,0000$). Была обнаружена статистически значимая положительная корреляционная связь между признаками зависимости от социальных сетей и признаками личностной тревожности ($R=0,47$; $p=0,000$).

Ключевые слова: социальные сети, зависимость, Интернет, тревожность, BSMAS.

SOCIAL MEDIA ADDICTION AND PERSONAL ANXIETY

A.E. Abdrakhmanova¹, I.S. Efremov²

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Medical University»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ufa, Russia¹
Republican Clinical Psychiatric Hospital, Ufa, Russia²

Annotation

The article presents the data of the research of the association of social media addiction and gender, the type of user activity in the social media, the severity of personal anxiety. The psychodiagnostic method and the statistical data processing method were used. The Bergen Social Media Addiction Scale (Andreassen et al., 2016), the Spielberger-Khanin personal anxiety inventory (1976). The subjects were 771 Russian-speaking Internet users (506 female, 265 male). As a result of the pilot research, it was revealed that signs of social media addiction are characteristic for women ($\chi^2=13.674$; $p=0.000$), as well as for those who use social media to post content ($N=60.8$; $p=0.0000$). A statistically significant positive correlation was found between signs of social media addiction and signs of personal anxiety ($R=0.47$; $p=0.000$).

Key words: social media, addiction, Internet, anxiety, BSMAS.

Актуальность. Социальные сети захватывают внимание и время пользователей по всему миру, проникая в самые разнообразные сферы повседневной жизни людей. По данным Digital 2021 October Global Statshot Report, 4,55 млрд человек являются активными пользователями социальных сетей – это составляет 93,2% всех пользователей сети Интернет и 57,6% населения планеты [1]. Показатели имеют тенденцию к непрерывному росту, что не может не вызывать обеспокоенность в научном сообществе.

На сегодняшний день существуют исследования, доказывающие связь между субъективным благополучием пользователей и различными типами поведения в социальных сетях [2, 3]. Проблемное использование социальных сетей имеет ряд признаков (заметность, изменение

настроения, толерантность, симптом отмены, конфликт и рецидив), являющихся общими для всех видов зависимости. Предполагается, что оно формируется несколькими факторами, включая диспозиционное, социокультурное и поведенческое подкрепление [4].

После включения в МКБ-11 [5] диагноза «игровое расстройство» споры о возможности выделения других видов нехимических зависимостей (в том числе интернет-зависимости и зависимости от социальных сетей) в самостоятельные нозологические единицы приобрели новый виток развития. Одни авторы предупреждают об опасности причисления таких поведенческих расстройств к числу болезненных патологий ввиду риска применения необоснованной психофармакотерапии и электросудорожной терапии с целью их купирования [6]. Другие считают: все аддиктивные расстройства имеют общие генетические и нейробиологические закономерности и, соответственно, все они могут быть признаны расстройствами [7].

Склонность к тревожности является характерной чертой лиц с зависимым поведением. У лиц, злоупотребляющих алкоголем, она может быть как признаком алкогольной абстиненции, так и коморбидным расстройством [8]. Активно изучается роль тревожности и в развитии нехимических зависимостей – однако большая часть исследований сконцентрирована на изучении взаимосвязи тревожности и проблемного использования смартфонов или Интернета. Социальные сети, ввиду тесного соприкосновения с разными аспектами жизни пользователей, требуют отдельного рассмотрения во взаимосвязи с аффективными расстройствами, что объясняет актуальность и новизну данного исследования.

Цель пилотного исследования – определить распространенность зависимости от социальных сетей среди респондентов, её взаимосвязь с полом, типом активности респондентов в социальных сетях и их уровнем личностной тревожности.

Материал и методы

Участниками исследования был 771 русскоязычный Интернет-пользователь, среди которых 65,6% (506/771) женщин, 34,4% (265/771) мужчин, приглашенных к участию в исследовании путём рассылки приглашений на электронную почту и размещения объявлений в социальных сетях. Респондентам предлагалось заполнить специально созданный опросник на платформе forms.google.com.

Возраст респондентов находился в пределах от 18 до 68 лет, средний возраст составил $23,61 \pm 7,54$ года. Распределение семейного положения было следующим: замужем/женат – 16,21% (125/771), состоят в отношениях, не зарегистрированных официально – 35,67% (275/771), не состоят в официальном браке и отношениях – 48,11% (371/771). Род занятий у респондентов: военнослужащий, работник правоохранительных органов – 1,04% (8/771), пенсионер – 0,4% (3/771), предприниматель/самозанятый – 5,58% (43/771), рабочий (в том числе сельскохозяйственного предприятия) – 6,87% (53/771), руководитель, управленческий работник – 6,1% (47/771), специалист без руководящих функций – 19,07% (147/771), студент вуза – 52,8% (407/771), студент СУЗа – 3,11% (24/771), безработный/временно не работающий – 5,06% (39/771). Уровень дохода участников исследования распределялся следующим образом: до 10 000 рублей – 16,99% (131/771), 11 000–20 000 рублей – 20,88% (161/771), 21 000–40 000 рублей – 28,92% (223/771), 41 000–60 000 рублей – 12,84% (99/771), 61 000–80 000 рублей – 7,26% (56/771), 81 000–100 000 рублей – 6,22% (48/771), 101 000–149 000 рублей – 3,11% (24/771), свыше 150 000 рублей – 3,76% (29/771).

Заполняемая респондентами анкета включала в себя три раздела. Первый раздел позволял узнать пол и возраст участника исследования, семейное положение, род занятий, средний доход, предпочитаемую социальную сеть и тип пользовательской активности участника исследования в социальной сети (последний пункт определялся через вопросы «Какой социальной сетью вы пользуетесь чаще всего?» и «Как часто Вы выкладываете контент, созданный самостоятельно?» с предлагаемыми вариантами ответов). Второй раздел включал Бергенскую шкалу зависимости от социальных сетей (BSMAS; Andreassen et al., 2016). Третий раздел позволял оценить уровень личностной тревожности с помощью шкалы оценки уровня личностной тревожности Ч. Спилбергера – Ю.Ханина (1976).

Статистическая обработка проводилась с применением программных пакетов STATISTICA 10, Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 26. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

При анализе результатов, полученных с применением шкалы BSMAS, было выявлено следующее. В исследуемой выборке 15,3% (118/771) респондентов имели признаки зависимости от социальных сетей. Респонденты с признаками зависимости от социальных сетей

чаще встречалось среди лиц женского пола (95/118; 80%) по сравнению с мужчинами (23/118; 20%) ($\chi^2=13,674$; $p=0,000$). Эти респонденты составили основную группу. У большинства испытуемых (653/771; 84,7%) признаков зависимости обнаружено не было, они составили контрольную группу. Преобладание лиц женского пола среди лиц с признаками зависимости от социальных сетей может быть связано с их преобладанием в выборке. Возрастных отличий в группах с признаками зависимости и без таковых обнаружено не было.

При проведении анализа результатов по шкале BSMAS и типа пользовательской активности в социальных сетях было произведено сравнение с применением критерия Краскела–Уоллиса. Было выявлено, что наибольшие баллы набрали пользователи, которые самостоятельно выкладывают контент в сеть, наименьший балл – пользователи, которые используют социальные сети только для общения ($N=60,8$; $p=0,0000$).

При анализе результатов, полученных с применением шкалы личностной тревожности Ч. Спилберга – Ю.Ханина, было выявлено следующее. В исследуемой группе у 10,1% (78/771) респондентов уровень личностной тревожности соответствует низкому, у 46,9% (362/771) – среднему, у 42,9% (331/771) – высокому. Выраженность личностной тревожности преобладала среди лиц женского пола ($U=43691,5$; $p=0,000$).

При сравнении выраженности личностной тревожности у респондентов основной и контрольной группы с применением U-критерия Манна–Уитни были обнаружены статистически значимые различия. В группе респондентов с признаками зависимости от социальных сетей личностная тревожность выражена в большей степени ($U=19760,5$; $p=0,000$). При применении метода ранговой корреляции Спирмена была обнаружена статистически значимая положительная корреляционная связь между результатом по шкале BSMAS и результатами по шкале личностной тревожности Спилберга–Ханина ($R=0,47$; $p=0,000$).

Выводы

Таким образом, по результатам пилотного исследования, признаки зависимости от социальных сетей встречались у 15,3% респондентов. Признаки зависимости от социальных сетей характерны для лиц женского пола, а также для тех, кто использует социальные сети для выкладывания контента. Также мы определили, что наличие признаков зависимости от социальных сетей связано прямой корреляционной связью с личностной тревожностью. Планируется продолжить исследование с расширением выборки и проведением более глубокого анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Datareportal.com* [Internet]. DIGITAL 2021 OCTOBER GLOBAL STATSHOT REPORT. Available from: <https://datareportal.com/reports/digital-2021-october-global-statshot>.
2. *Beyens L, Pouwels J.L., van Driel I.I., Keijsers L., Valkenburg Patti M.* The effect of social media on well-being differs from adolescent to adolescent // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, 10763. doi: 10.1038/s41598-020-67727-7.
3. *Lei Zhao.* The impact of social media use types and social media addiction on subjective well-being of college students: A comparative analysis of addicted and non-addicted students // *Computers in Human Behavior Reports*. 2021. Vol. 4, 100122. doi: 10.1016/j.chbr.2021.100122.
4. *Andreassen C.S.* Online Social Network Site Addiction: A Comprehensive Review // *Current Addiction Reports*. 2015. Vol. 2. P. 175–184. doi: 10.1007/s40429-015-0056-9.
5. *Icd.who.int* [Internet]. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics (ICD-11 MMS). Available: <https://icd.who.int/browse/11/l-m/en>.
6. *Менделевич В.Д.* Фейк-диагнозы в психиатрических классификациях // *Неврологический вестник*. 2018. Т. L, № 4. С. 15–18. doi: 10.17816/nb14127.
7. *Егоров А.Ю.* Нехимические зависимости – «фейк-диагнозы» или все-таки расстройства? // *Неврологический вестник*. 2019. Т. LI, №1. С. 38–43. doi: 10.17816/nb13557.
8. *Сиволоп Ю.П.* Лечение тревожных расстройств у пациентов, злоупотребляющих алкоголем // *Журнал неврологии и психиатрии*. 2018. Т.1, №2. С.34–38. doi: 10.17116/jnevro20181181234-38.

ОСОБЕННОСТИ АНАЛИЗА СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ ЭЭГ РИТМОВ У ЛИЦ С КОМБИНИРОВАННОЙ ФОРМОЙ ПСИХОПАТОЛОГИЧЕСКОГО ДИАТЕЗА (РАССТРОЙСТВО ИНТЕГРАЦИИ ИДЕНТИЧНОСТИ)

А.А. Бадалов¹, Э.Б. Байышева²

Кыргызско-российский славянский университет им. Б.Н. Ельцина, г. Бишкек, Кыргызстан¹

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, г. Бишкек, Кыргызстан²

Аннотация

В статье рассматривается вопрос нейрофизиологических особенностей ритмов ЭЭГ, присущих индивидам с комбинированной формой психопатологического диатеза (расстройство интеграции идентичности, РИИ). На примере выборки, включающей 74 респондента основной группы с РИИ, а также 330 респондентов контрольной группы, продемонстрированы особенности спектров мощности электроэнцефалограммы во всех общепринятых частотных диапазонах. По результатам исследований определены основные признаки нейрофункционирования, присущие индивидам с РИИ, такие как снижение мощности практически всех частотных диапазонов в задних отделах головного мозга и увеличение представленности высокочастотного альфа-диапазона в ассоциативных отделах головного мозга, осуществлена клиническая интерпретация полученных данных.

Ключевые слова: психопатологический диатез, синдром Икара, расстройство интеграции идентичности, спектральный анализ ЭЭГ, пограничные психические расстройства, расстройства личности.

FEATURES OF THE ANALYSIS OF THE SPECTRAL POWER OF EEG RHYTHMS IN INDIVIDUALS WITH A COMBINED FORM OF PSYCHOPATHOLOGICAL DIATHESIS (IDENTITY INTEGRATION DISORDER)

A.A. Badalov¹, E.B. Baiysheva²

Kyrgyz-Russian Slavic University named after B.N. Yeltsin, Bishkek, Kyrgyzstan¹
Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Akhunbaev, Bishkek, Kyrgyzstan²

Annotation

The article discusses the issue of neurophysiological features of EEG rhythms inherent in individuals with the combined form of psychopathological diathesis (identity integration disorder, IID). On the example of a sample that includes 74 respondents from the main group with the IID, as well as 330 respondents from the control group, the features of the power spectra of the electroencephalogram in all generally accepted frequency ranges are demonstrated. According to the results of the research, the main signs of neurofunctioning inherent in individuals with the IID were determined, such as: a decrease in the power of almost all frequency ranges in the posterior parts of the brain and an increase in the representation of the high-frequency alpha range in the associative parts of the brain, clinical interpretation of the data obtained was carried out.

Key words: psychopathological diathesis, Icarus syndrome, identity integration disorder, EEG spectral analysis, borderline mental disorders, personality disorders.

Актуальность. Нельзя не отметить, что учение о предрасположенности к возникновению психических расстройств (психопатологическом диатезе) в настоящее время переживает подлинный ренессанс. Ранее мы также предложили, кроме уже описанных форм психопатологического диатеза, позволяющих определить «тропность» манифестирующих заболеваний к конкретным (шизофреническому и аффективному) психопатологическим кругам, ввести также комбинированную форму последнего [1]. Описанная изначально в работах Н.А. Мургау в рамках постклассического психоанализа под названием «комплекса Икара», она получила свое дальнейшее развитие в работах N. Wiklund и Ц.П. Короленко под названием «синдром Икара» и «височное расстройство личности» соответственно [3, 4, 5]. Мы предпочитаем использовать термины «комбинированная форма психопатологического диатеза» или, чаще, «расстройство интеграции идентичности» (сокращенно РИИ – этой аббревиатурой мы и будем пользоваться в дальнейшем описании). Мы также считаем, что РИИ представляет интерес для клинического изучения еще и потому, что позволяет более детально исследовать особенности взаимодействия входящих в его состав структурных компонентов, относящихся к различным психопатологическим кругам. Особое значение приобретает использование в указанных исследованиях нейрофизиологических методов, позволяющих по-новому оценить вклад нейроморфологического субстрата в формирование клинической феноменологии.

Цель исследования – изучение особенностей спектральной мощности электроэнцефалограммы у лиц с комбинированной формой психопатологического диатеза (РИИ) как предикторов образования присущих ей клинических признаков.

Материал и методы

Нами были обследованы 2433 студента 1–5 курсов Кыргызско-российского славянского университета и Кыргызской государственной медицинской академии, среди которых было отобрано 74 испытуемых с РИИ (основная группа – ОГ, средний возраст $20,4 \pm 2,9$, мужчин 41, женщин 33). В качестве контрольной группы (КГ) использовались записи ЭЭГ 330 испытуемых (средний возраст $23,1 \pm 5,4$, мужчин 188, женщин 142) из нормативной базы данных NBI Database. Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью аппаратно-программного комплекса «Мицар-201» (ООО «Мицар», Санкт-Петербург), компьютерной программы WinEEG (автор В.А. Пономарев) и 19-канальной электродной шапочки производства ElectroCap (ElectroCap, Eaton, Ohio, USA) в отведениях Fp1; Fp2; F7; F3; Fz; F4; F8; C3; Cz; C4; T3; T4; T5; T6; P3; Pz; P4; O1; O2 по международной системе 10-20 с заземляющим электродом в отведении FPz. Спектры мощности ЭЭГ рассчитывались для фрагментов ЭЭГ, зарегистрированных в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами, методом быстрого преобразования Фурье с длиной эпохи 4 с и перекрытием эпох 50%. Количественные оценки и сравнения спектральной мощности ЭЭГ проводили в дельта (1,5–4 Гц), тета (4–7,5 Гц), альфа 1 (7,5–10 Гц), альфа 2 (10–13 Гц), бета 1 (13–21 Гц), бета 2 (21–30 Гц) и гамма (30–40 Гц) частотных диапазонах.

Результаты

При сравнении результатов, полученных при исследовании спектральной мощности различных ритмов ЭЭГ в исследуемых группах, мы исходим из теоретической предпосылки, что комбинированная форма психопатологического диатеза (РИИ) формируется при возникновении комбинации генетических задатков, относящихся к шизофреническому, эпилептическому и аффективному кругам психической патологии. Именно поэтому далее мы будем проводить сравнение показателей, полученных нами при исследовании выбранных групп респондентов, с показателями, описанными в литературе в качестве характерных для различных групп психических расстройств.

Органические психические расстройства. Для органических психических расстройств наиболее характерны такие изменения ЭЭГ, которые могут интерпретироваться как показатели лобной дисфункции [5]. При этом чаще наблюдается замедление базовой ритмической активности, увеличение мощности активности медленных ритмов (преимущественно дельта-диапазона) [6, 7], что особенно важно при часто встречающемся при этом агрессивном поведении. Как видно из полученных значений показателей спектров мощности для ОГ, подобного рода изменения для них не свойственны. Это совпадает с данными, полученными при клиническом, патопсихологическом и нейропсихологическом (ссылки) исследованиях лиц с РИИ – при достаточно частом наличии в анамнезе и при неврологическом осмотре признаков минимальной мозговой дисфункции, выраженные повреждения головного мозга, наступившие в результате воздействия как пре-, так и постнатальных органических факторов, уменьшают возможность формирования РИИ.

Психические расстройства шизофренического ряда и аутистического спектра. Сравнить РИИ с данной группой расстройств довольно сложно, потому что классическая развернутая форма шизофрении и аутизма предполагает гипофронтальный дефект [8], чего, конечно, среди наших респондентов не наблюдается. Однако, учитывая, что формирование у лиц с РИИ психотических расстройств подчиняется течению по типу т.н. «краевых» или «дегенеративных» психозов (в современной терминологии эта группа полнее всего представлена в разделе шизоаффективной патологии), т.е. без формирования эмоционально-мотивационного оскудения, отсутствие снижения функциональной активности лобных долей у них вполне объяснимо. Снижение мощности альфа- и тета-ритмов в задних отделах головного мозга часто наблюдается также при расстройствах аутистического спектра [9]. Считается также, что для аутизма более характерно повышение высокочастотной активности, однако этот вопрос вызывает много споров [8, 10]. По-видимому, для решения вопроса о взаимосвязи РИИ с рядом расстройств шизофренического и аутистического спектров необходимы дальнейшие исследования.

Аффективные и невротические психические расстройства. Усиление мощности тета- и альфа-активности в префронтальной коре может свидетельствовать о повышении риска развития психических расстройств при воздействии на таких индивидуумов стрессовых факторов [11, 12]. Локальное усиление медленной активности в передних областях коры

испытуемых может свидетельствовать, кроме того, о склонности к затяжным депрессивным состояниям [13]. Напротив, низкий уровень мощности тета-ритма в центральных и среднелобных отделах в ОГ2 может служить показателем высокого уровня тревожности и невротизма и низкого уровня экстраверсии данных лиц, что подтверждается данными проведенных нами клинических и патопсихологических исследований [14].

Частое наличие генерализованного альфа-ритма у лиц с РИИ привлекло наше внимание с самого начала исследований нейрофизиологической активности данных лиц. Выраженное распространение его в передних отделах головного мозга может свидетельствовать о повышенной частоте формирования различных аффективных расстройств: эмоциональной лабильности и неврастении (усиление альфа-активности в височных отделах), повышенного уровня тревожности и напряжения (при расширении зоны представительства альфа-ритма в передние отделы) [13]. Интересно отметить, что подобное изменение альфа-активности характерно в целом для пациентов с вторичным энурезом.

Усиление уровня активации задних областей головного мозга может служить причиной избыточной функциональной активности последней, что может, в свою очередь, также говорить о повышении общего уровня напряжения и тревожности, связанной с избытком поступающей информации. Достаточно часто лица из ОГ несут признаки снижения мощности практически по всем ритмическим диапазонам, что в целом дает нам при нейрофизиологическом исследовании картину т.н. «низкоамплитудной» ЭЭГ. Несмотря на то что такая форма электроэнцефалограммы официально считается вариантом нормы, тем не менее, низковольтные ЭЭГ характерны для лиц с различными психическими проблемами: повышением уровня напряжения, раздражительностью, немотивированной агрессивностью, ипохондрической настроенностью, а также часто встречается при хроническом алкоголизме и наркомании [13,14]. По-видимому, различного рода аддиктивное поведение используется данными лицами с целью снятия повышенной активности коры головного мозга.

Заключение

Таким образом, исследование мощности различных ритмов ЭЭГ лиц с РИИ позволяет выявить у них следующие основные признаки изменения биоэлектрической активности головного мозга:

1. Снижение мощности практически всех частотных диапазонов в задних отделах головного мозга, что может свидетельствовать о повышенной функциональной активности данных областей.
2. Увеличение представленности высокочастотного альфа-диапазона в ассоциативных отделах головного мозга, связанное, по всей видимости, с изменением процессов селекции, используемой в мыслительных процедурах для принятия решения информации.
3. Вышеуказанные особенности спектральной мощности ритмов ЭЭГ лиц с РИИ, свидетельствующие о повышении функциональной активности головного мозга, могут вторично приводить к развитию связанной с последней предрасположенности к возникновению тревожно-депрессивных расстройств и расстройств, связанных с образованием химической и нехимической зависимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалов А.А., Бровкина С.Н., Давидович М.Е., Кадырова А.Ш., Кузавевский И.А., Мамадумарова З.И., Суманов Е.В., Улитина Ю.В. «Принцип химеры»: качественный анализ психофизиологического изоморфизма лиц с расстройством интеграции идентичности // *Обзорные психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева*. 2018. № 2. С. 3–10.
2. Murray H.A. American Icarus. In *Clinical Studies of Personality*; Burton A., Harris R. E., Eds.; Harper and Row: New York, NY, USA, 1955; Volume 3. Pp. 15–41.
3. Wiklund N. The Icarus Complex. Lund. Department of Psychology, 1978.
4. Короленко Ц.П., Завьялов В.Ю. К вопросу о патологии воображения при височной эпилепсии // *Банщиков В.В., Короленко Ц.П., Завьялов В.Ю. (ред.). Эмоции и воображение*. М.: Всероссийское общество невропатологов и психиатров, 1975. С. 72–99.
5. Киренская А.В. ЭЭГ-исследования в биологической психиатрии: основные направления и перспективы // *Российский психиатрический журнал*. 2006. № 6. С. 19–27.
6. Рагозинская В.Г. Особенности спектральной мощности ЭЭГ при аутоагрессии // *Известия высших учебных заведений. Уральский регион*. 2015. № 2. С. 97–104.
7. Harrewijn A., Van der Molen M.J.W., Westenbergh P.M. Putative EEG measures of social anxiety: Comparing frontal alpha asymmetry and delta-beta crossfrequency correlation // *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*. 2016. No. 6. Pp. 1086–1098.
8. Панкратова Н.М., Рыкунов С.Д., Устинин М.Н. Локализация спектральных особенностей энцефалограмм при психических расстройствах // *Препринты ИПМ им. М.В.Келдыша*. 2018. № 138. 20 с.
9. Луцкина Е.А., Хаердинова О.Ю., Луцкин В.С., Стрелец В.Б. Межполушарные различия спектральной мощности и когерентности ритмов ЭЭГ у детей с расстройствами аутистического спектра // *Физиология человека*. 2017. Т. 43, № 3. С. 32–42.
10. Gregory M., Mandelbaum D. Evidence of a faster posterior dominant EEG rhythm in children with autism // *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2012. № 6. P. 1000.

11. Пашков А.А., Дахтин И.С., Харисова Н.С. Электроэнцефалографические биомаркеры экспериментально индуцированного стресса // Вестник ЮУрГУ. Серия «Психология». 2017. Т. 10, № 4. С. 68–82.
12. Palmiero M., Piccardi L. Frontal EEG Asymmetry of Mood: A Mini-Review // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017. № 11. Pp. 1–8.
13. Иванов Л.Б. Неэпилептическая электроэнцефалография. М.: ООО «Медика», 2013. 200 с.
14. Кропотов Ю.Д. Количественная ЭЭГ, когнитивные вызванные потенциалы мозга человека и нейротерапия / пер. с англ.; под ред. В.А. Пономарева. Донецк, 2010. – 512 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С НАЛИЧИЕМ ТИПИЧНЫХ ИЛИ АТИПИЧНЫХ ДЕПРЕССИВНЫХ СИМПТОМОВ

Н.М. Вялова, Е.В. Михалицкая

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

У пациентов с большим депрессивным расстройством наблюдаются изменения биологических биомаркеров, таких как нейротрофические факторы, демонстрирующие, что эти молекулы вовлечены в психопатологию и терапию большого депрессивного расстройства. Проведенное исследование посвящено изучению связи полиморфизмов генов нейротрофической системы *BDNF*, *NGF*, *NRG1* с наличием атипичных депрессивных симптомов. Обследовано 378 пациентов с депрессивными расстройствами. Оценку выраженности типичных и атипичных депрессивных симптомов проводили с использованием шкалы SIGH-SAD до начала и на 14 и 28-й день терапии. Выявлены ассоциации некоторых полиморфных вариантов генов нейротрофической системы с наличием типичных или атипичных депрессивных симптомов: rs6265 гена *BDNF* ассоциирован со средней суммой баллов по шкале SIGH-SAD для типичных депрессивных симптомов до начала терапии и rs6330 гена *NGF* – со средними суммами баллов по шкале SIGH-SAD на 28-й день терапии для типичных и атипичных депрессивных симптомов.

Ключевые слова: полиморфизм генов, атипичная депрессия, нейротрофические факторы, *BDNF*, *NGF*, *NRG1*.

THE STUDY OF THE ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF NEUROTROPHIC SYSTEM GENES WITH THE PRESENCE OF TYPICAL OR ATYPICAL DEPRESSIVE SYMPTOMS

N.M. Vyalova, E.V. Mikhailitskaya

Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Annotation

Patients with major depressive disorder show changes in biological biomarkers such as neurotrophic factors, demonstrating that these molecules are involved in the psychopathology and therapy of major depressive disorder. This investigation is devoted to the study of the relationship of polymorphisms of the neurotrophic system genes *BDNF*, *NGF*, *NRG1* with the presence of atypical depressive symptoms. 378 patients with depressive disorders were examined. The severity of typical and atypical depressive symptoms was assessed using the SIGH-SAD scale before and on the 14th and 28th days of therapy. Associations of some polymorphic variants of the neurotrophic system genes with the presence of typical or atypical depressive symptoms were revealed: rs6265 of the *BDNF* gene is associated with the average score on the SIGH-SAD scale for typical depressive symptoms before the start of therapy and rs6330 of the *NGF* gene is associated with the average scores on the SIGH-SAD scale on day 28 of therapy for typical and atypical depressive symptoms.

Key words: gene polymorphism, atypical depression, neurotrophic factors, *BDNF*, *NGF*, *NRG1*.

Актуальность. Депрессия представляет группу расстройств, этиология и точные патофизиологические механизмы, реакция на лечение и исход которых до настоящего времени не известны. Частые клинические случаи атипичной депрессии вызвали повышение научного интереса к этому феномену в последние годы. Депрессия, протекающая с инвертированными вегетативными признаками, является малоизученной проблемой, вызывая множество вопросов в плане диагностики, этиологии, патогенеза, лечения и прогноза.

Существование клинического полиморфизма депрессивных расстройств определяется биологической гетерогенностью аффективных расстройств, что подтверждается исследовательскими данными, согласно которым определенные симптомы депрессии могут быть связаны с нарушениями в определенных регионах мозга [1], а в патогенезе депрессии играет роль полимодальная дисфункция различных нейромедиаторных систем (серотонинергическая, норадренергическая, допаминергическая, ГАВА-ергическая, глутаматергическая системы и др.) [2; 3].

Превалирующая в настоящее время моноаминовая теория депрессии не объясняет в полной мере патогенез аффективных расстройств, на терапию современными антидепрессантами дают ответ лишь 60% пациентов, что говорит о вовлечении других механизмов в патогенез данных расстройств. Нейротрофическая теория развития депрессии, активно изучаемая в последние годы, наиболее полно объясняет возникающие при депрессивных расстройствах морфологические изменения в головном мозге [4]. Нейротрофические факторы – ключевые сигнальные молекулы центральной нервной системы, участвующие в развитии, функционировании, выживаемости и адаптивной пластичности нейронов центральной нервной системы. Это, в первую очередь, фактор роста нервов (NGF), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), нейрегулин-1 экспрессирующиеся нейрональными клетками.

Цель исследования – изучение возможной ассоциации полиморфных вариантов генов нейротрофических факторов *BDNF*, *NGF*, *NRG1* с наличием типичных или атипичных депрессивных симптомов.

Материал и методы

Всего обследовано 378 пациентов в возрасте от 20 до 60 лет с депрессивным эпизодом разной степени тяжести в рамках депрессивного эпизода или рекуррентного депрессивного расстройства (F32-F33, МКБ-10), проходивших курс лечения в отделении аффективных состояний клиники НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук согласно протоколу, утвержденному биоэтическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Основными критериями включения для пациентов являлись получение информированного согласия пациента или уполномоченного лица на обследование, клинически верифицированные диагнозы согласно МКБ-10 (F32-F33), принадлежность к европеоидной расе, отсутствие органических или неврологических расстройств.

Для более точной психометрической оценки тяжести текущей депрессии, а также оценки выраженности типичных и атипичных депрессивных симптомов использовалась шкала SIGH-SAD (Structured interview guide for the Hamilton depression rating scale, seasonal affective disorders), включающая 17 пунктов шкалы депрессии Гамильтона и 7 пунктов, оценивающих атипичные депрессивные симптомы (социальный отход, увеличение аппетита, увеличение веса, увеличение количества потребляемой пищи, предпочтение углеводистой пищи, гиперсомния, утомляемость). Психометрическая оценка проводилась до начала и на 14-й и 28-й день терапии.

У обследованных лиц для биологических исследований брали кровь из локтевой вены с последующим выделением геномной ДНК с использованием фенол-хлороформенного микрометода. Генотипирование полиморфных вариантов генов нейротрофических факторов *BDNF*, *NGF*, *NRG1* проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторах StepOnePlus™ Real-Time PCR System и Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) (ЦКП «Медицинская геномика», Томский НИМЦ) с использованием наборов TaqMan1 Validated SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ и обработку данных генотипирования проводили с использованием пакета SPSS 23.0. Выборки проверяли на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка. Статистически значимые различия определяли по t-критерию Стьюдента при нормальном распределении для независимых выборок с вычислением среднего и ошибки среднего. Для анализа количественных признаков при сравнении двух независимых выборок использовался U-критерий Манна–Уитни. Распределение частот генотипов и аллелей про-

веряли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Сравнение частот генотипов и аллелей в исследуемых группах проводили по критерию χ^2 . Для оценки ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с расстройством вычисляли отношения шансов (odds ratio (OR)).

Результаты

Проведено генотипирование 5 полиморфных вариантов генов нейротрофических факторов *BDNF* (rs6265, rs7124442, rs11030104), *NGF* (rs6330), *NRG1* (rs3924999).

Проведенное нами исследование выявило ассоциацию полиморфного варианта rs6265 гена *BDNF* со средней суммой баллов по шкале SIGH-SAD для типичных депрессивных симптомов до начала терапии ($p=0,03$). Носители генотипа Val/Met имели наименьшую сумму баллов по шкале SIGH-SAD для типичных депрессивных симптомов, чем пациенты, несущие генотипы Val/Val и Met/Met.

Полиморфный вариант rs6330 гена *NGF* ассоциирован со средними суммами баллов по шкале SIGH-SAD на 28-й день терапии для типичных ($p=0,45$) и атипичных ($p=0,46$) депрессивных симптомов. Пациенты, несущие генотип A/C, имели наименьший балл по шкале SIGH-SAD для типичных и атипичных депрессивных симптомов, чем пациенты, несущие генотипы A/A и C/C.

Заключение

Таким образом, наше исследование выявило, что с наличием симптомов атипичной депрессии, оцененных по шкале SIGH-SAD, ассоциирован полиморфный вариант rs6330 гена нейротрофического фактора *NGF*.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-29-02205 «Разработка молекулярно-генетической панели депрессивных расстройств на основе полиморфизмов генов нейрональных киназ, нейротрофических белков и генов серотонинэргической системы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Maletic V., Robinson M., Oakes T., Iyengar S., Ball S.G., Russell J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings // Int J Clin Pract. 2007. Vol. 61, №12. P. 2030–2040.
2. Ochi T., Vyalova N.M., Losenkov I.S., Paderina D.Z., Pozhidaev I.V., Loonen A.J.M., Simutkin G.G., Bokhan N.A., Ivanova S.A., Wiffert B. Limited Associations Between 5-HT Receptor Gene Polymorphisms and Treatment Response in Antidepressant Treatment-Free Patients With Depression // Front Pharmacol. 2019. Vol. 10. P. 1462.
3. Saltiel P.F., Silvershein D.I. Major depressive disorder: mechanism-based prescribing for personalized medicine // Neuropsychiatr Dis Treat. 2015. Vol. 11. P. 875–888.
4. Wang Y.J., Chen K.Y., Kuo L.N., Wang W.C., Hsu Y.W., Wong H.S., Lin C.M., Liao K.H., Zhang Y.F., Chiang Y.H., Chang W.C. The association between BDNF Val66Met polymorphism and emotional symptoms after mild traumatic brain injury // BMC Med Genet. 2018. Vol. 19(1). P.13.

УРОВЕНЬ ТРЕВОГИ И ПОКАЗАТЕЛИ ЭЭГ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ: ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ РЕМИССИИ

С.А. Галкин, Д.Н. Савочкина

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

В исследовании с целью построения прогностической модели длительности алкогольной ремиссии было обследовано 86 пациентов с алкогольной зависимостью. В качестве клинических данных использовалась шкала тревоги Гамильтона (HARS). В качестве электроэнцефалографических данных использовались значения спектрального анализа мощности и когерентности для θ -, α - и β -ритмов. С помощью дискриминантного анализа была получена модель, позволяющая с высокой точностью прогнозировать длительность терапевтической ремиссии у пациентов с алкогольной зависимостью.

Ключевые слова: алкогольная зависимость, ремиссия, прогноз, тревога, электроэнцефалография.

ANXIETY LEVEL AND EEG INDICATORS IN ALCOHOL USE DISORDERS: THE POSSIBILITY OF PREDICTING THE DURATION OF THERAPEUTIC REMISSION

S.A. Galkin, D.N. Savochkina

Mental Health Research Institute, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

Annotation

In the study, 86 patients with alcohol use disorders were examined in order to build a prognostic model of the duration of alcohol remission. The Hamilton Anxiety Scale (HARS) was used as clinical data. The values of spectral analysis of power and coherence for θ -, α - and β -rhythms were used as electroencephalographic data. With the help of discriminant analysis, a model was obtained that allows predicting the duration of therapeutic remission with high accuracy in patients with alcohol use disorders.

Key words: alcohol use disorders, remission, prognosis, anxiety, electroencephalography.

Актуальность. В настоящее время алкогольная зависимость является серьезной медико-социальной проблемой во всем мире. По оценкам, алкогольная зависимость в 5,9–7,3% случаев является основной причиной ранней смертности и инвалидности [1, 2]. Одним из подходов к снижению бремени алкогольной зависимости является прогноз длительности терапевтической ремиссии, на основе которого можно выстраивать индивидуальную терапевтическую тактику [3, 4]. Прогноз терапевтических ремиссий при алкогольной зависимости диктует задачу изучения фундаментальных закономерностей ее формирования и течения, психопатологических и патофизиологических маркеров [5–8]. Проведенное нами ранее исследование показало, что возможными предикторами длительности терапевтической ремиссии пациентов с алкогольной зависимостью являются показатели тревожности и электроэнцефалографии [5]. В представленном исследовании мы стремились разработать эффективную модель, позволяющую с высокой точностью (не менее 90%) дать прогноз длительности терапевтической ремиссии пациентов с алкогольной зависимостью. Наша основная гипотеза заключалась в том, что модель, основанная на многомерных характеристиках, даст удовлетворительный прогноз и что индивидуальные количественные показатели ЭЭГ и уровня тревоги позволят предсказать длительность алкогольной ремиссии у пациентов. В последнее время возможность использовать мультимодальные многофункциональные статистические методы внесла огромный вклад в биомедицинские исследования, позволяя классифицировать и прогнозировать заболевания. Такие модели были обнаружены для дифференциальной диагностики биполярных и униполярных депрессий [9], прогноза эффективности терапии при аффективных расстройствах [10, 11], прогнозирования риска формирования побочных эффектов при фармакотерапии больных шизофренией [12] и т.д.

Цель исследования – разработать прогностическую модель длительности терапевтической ремиссии у пациентов с алкогольной зависимостью.

Материал и методы

В настоящий анализ включены данные 86 пациентов (70 мужчин и 16 женщин) в возрасте от 25 до 55 лет (средний возраст $44,96 \pm 9,97$ лет), госпитализированных с диагнозом психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя (F10.2, F10.3), с 2019 по 2021 г. в стационарном отделении клиники НИИ психического здоровья (отделение аддиктивных состояний) Томского НИМЦ. Критерии включения: установленный диагноз алкогольной зависимости по МКБ–10, добровольное согласие на участие в исследовании, возраст 25–55 лет. Критерии исключения: наличие хронических соматических расстройств в стадии обострения, эпилепсии, выраженных органических поражений головного мозга (киста, энцефалопатия и др.), черепно-мозговых травм любой степени тяжести в анамнезе, отказ от участия в исследовании. Диагностическая оценка и клиническая квалификация расстройства осуществлялась квалифицированными врачами-психиатрами с применением диагностических критериев МКБ–10. После прохождения процедур скрининга и включения в исследование пациентам проводилась запись и оценка параметров электроэнцефалограммы (ЭЭГ) на 3–5-й день поступления в стационар после детоксикации. В качестве основного психометрического инструмента была использована шкала Гамильтона для

оценки степени выраженности тревоги (The Hamilton Anxiety Rating Scale, сокр. HARS). Данные о давности алкогольной зависимости, количестве госпитализаций, длительности последней ремиссии и количестве потребления алкоголя были взяты из историй болезни пациентов. Статистическая обработка данных включала методы описательной статистики (медианные значения, межквартильный размах, частотный анализ) общей выборки и со стратификацией по группам пациентов в зависимости от длительности ремиссии. Для оценки различий непрерывных переменных между группами был проведен тест на нормальность распределения Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении показателей использовался t-критерий Стьюдента, при отличном от нормального – непараметрический тест Манна–Уитни. Для анализа категориальных переменных применялся тест хи-квадрат. В статье используется дискриминантный анализ для построения функций классификаций многомерных наблюдений. Поскольку каждая переменная, используемая при дискриминантном анализе, должна быть распределена нормально, результаты, полученные при количественном анализе ЭЭГ, приводились к нормальному распределению путем логарифмирования (Ln). Таким образом, по каждому пациенту были получены табличные данные, включающие для каждого из 16 стандартных отведений следующие показатели, приведенные к распределению Гаусса: натуральный логарифм от мощности $\text{Ln}(\text{Power})$ – далее $\text{Ln}(P)$, и нормализованную когерентность, рассчитанную по формуле $\text{Ln}(\text{Coh}^2/(1-\text{Coh}^2))$, где Coh^2 – квадрат когерентности, далее $\text{Ln}(\text{Coh})$. Статистическая значимость характеризовалась р-значением менее 0,05. Для статистического анализа использовалась программа Statistica 12.

Результаты

На основании данных о длительности предыдущей терапевтической ремиссии исследуемые пациенты с алкогольной зависимостью были разделены на две группы согласно клиническим стандартам: с неустойчивой ремиссией (длительность ремиссии менее 1 года) (группа 1) и с устойчивой ремиссией (длительность ремиссии от 1 года и более) (группа 2). Полученные группы пациентов были сопоставимы по полу и возрасту. Также исследуемые группы пациентов статистически значимо не различались по длительности заболевания, количеству госпитализаций по поводу алкогольной зависимости и по количеству потребления алкоголя за последний год ($p > 0,05$). Тем не менее было обнаружено, что в группе пациентов с неустойчивой ремиссией (группа 1) наблюдается значительно более высокий уровень тревоги по шкале HARS ($p = 0,006$) по сравнению с пациентами с устойчивой ремиссией (группа 2). В ходе статистического анализа были получены уравнения дискриминантных функций (для каждой группы), которые включали всего 10 переменных. Функция классификации для группы с неустойчивой алкогольной ремиссией имеет вид:

$$Y = 0,99 * \text{HARS} + 16,75 * \text{Ln}(P)(F4\alpha) - 11,73 * \text{Ln}(\text{Coh})(P3 - P4\alpha) + 2,38 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp1 - T3\alpha) - 5,7 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp2 - C4\beta) - 5,74 * \text{Ln}(\text{Coh})(F7 - F8\theta) + 3,77 * \text{Ln}(\text{Coh})(C3 - C4\theta) - 6,91 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp1 - T3\theta) + 4,15 * \text{Ln}(\text{Coh})(T4 - O2\theta) - 3,23 * \text{Ln}(\text{Coh})(C4 - O2\theta) - 59,41$$

Функция классификации для группы с устойчивой алкогольной ремиссией имеет вид:

$$Y = 0,76 * \text{HARS} + 14,49 * \text{Ln}(P)(F4\alpha) - 9,63 * \text{Ln}(\text{Coh})(P3 - P4\alpha) + 1,05 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp1 - T3\alpha) - 4,08 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp2 - C4\beta) - 4,32 * \text{Ln}(\text{Coh})(F7 - F8\theta) + 2,43 * \text{Ln}(\text{Coh})(C3 - C4\theta) - 4,94 * \text{Ln}(\text{Coh})(Fp1 - T3\theta) + 1,62 * \text{Ln}(\text{Coh})(T4 - O2\theta) - 1,49 * \text{Ln}(\text{Coh})(C4 - O2\theta) - 42,69$$

Пациент относится к той группе, для которой классификационная функция имеет наибольшее значение. Представленный метод позволил правильно классифицировать 97,6% (40 из 41) больных алкогольной зависимостью с устойчивой терапевтической ремиссией, 88,9% (40 из 45) больных алкогольной зависимостью с неустойчивой терапевтической ремиссией. Для оценки валидности методики обследовано 10 пациентов с алкогольной зависимостью (в качестве группы контроля) с аналогичными критериями включения и исключения, сопоставимых основной выборке. Было правильно классифицировано 100% (10 из 10) пациентов контрольной группы.

Заключение

Представленная модель прогноза длительности терапевтической ремиссии пациентов с алкогольной зависимостью показала достаточно высокую точность классификации, а простота и доступность параметров, входящих в данную модель, позволяют использовать её в клинической практике без значительных временных и материальных затрат. Несомненно, эта модель требует дальнейшей проверки в будущих исследованиях на более крупных выборках пациентов, но мы надеемся, что у данной методики большие перспективы.

Исследование проведено в рамках выполнения НИР «Мультидисциплинарное исследование клинической гетерогенности патобиологических механизмов прогрессивного развития аддитивных расстройств с разработкой инновационных программ терапии дифференцированной профилактики» тема № 122020200053-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sudhinaraset M., Wigglesworth C., Takeuchi D.T.* Social and Cultural Contexts of Alcohol Use: Influences in a Social-Ecological Framework // *Alcohol Res.* 2016. Vol. 38, № 1. P. 35–45.
2. *Collins S.E.* Associations Between Socioeconomic Factors and Alcohol Outcomes // *Alcohol Res.* 2016. Vol. 38, № 1. P. 83–94.
3. *Ветлугина Т.П., Лобачева О.А., Никитина В.Б., Прокопьева В.Д., Мандель А.И., Бохан Н.А.* Гормоны стресс-реализующей системы при алкогольной зависимости: возможность прогнозирования длительности ремиссии // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2020. Т. 120, № 5. С. 73–78.
4. *Лоскутов Д.В., Невмятулин А.Ш.* Зависимости смертности от внешних причин от потребления алкоголя // *Социальные аспекты здоровья населения.* 2020. № 3. С. 8.
5. *Галкин С.А., Пешиковская А.Г., Бохан Н.А.* Возможные клиничко-электроэнцефалографические факторы прогноза длительности ремиссии пациентов с алкогольной зависимостью // *Российский психиатрический журнал.* 2021. № 1. С. 47–52.
6. *Петрунько О.В., Брюханова Е.Н.* Факторы формирования длительных ремиссий у больных алкогольной зависимостью // *Acta Biomedica Scientifica.* 2017. № 5-2. С. 125–132.
7. *Ветлугина Т.П., Прокопьева В.Д., Никитина В.Б., Лобачева О.А., Ярыгина Е.Г., Мандель А.И., Кисель Н.И.* Поиск биологических факторов, ассоциированных с устойчивостью терапевтической ремиссии при алкогольной зависимости // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* 2021. № 2. С. 5–12.
8. *Галкин С.А., Ткачева Г.Д., Ошкина Т.А., Бохан Н.А.* Индекс реактивности ЭЭГ при алкогольной зависимости: возможность прогнозирования длительности терапевтической ремиссии // *Наркология.* 2021. Т. 2, № 5. С. 61–66.
9. *Лалин И.А., Митрофанов А.А.* Использование математического анализа ЭЭГ для дифференциальной диагностики биполярных и униполярных депрессий (на примере дискриминантного анализа показателей спектральной мощности, когерентности и межполушарной асимметрии) // *Социальная и клиническая психиатрия.* 2017. № 2. С. 69–74.
10. *Изнак А.Ф., Изнак Е.В., Абрамова Л.И., Ложников М.А.* Модели количественного прогноза терапевтического ответа больных депрессией по параметрам исходной ЭЭГ // *Физиология человека.* 2019. № 6. С. 36–43.
11. *Галкин С.А., Васильева С.Н., Иванова С.А., Бохан Н.А.* Электроэнцефалографические маркеры устойчивости депрессивных расстройств к фармакотерапии и определение возможного подхода к индивидуальному прогнозу эффективности терапии // *Психиатрия.* 2021. № 2. С. 39–45.
12. *Меднова И.А., Корнетова Е.Г., Иванова С.А.* Модель прогнозирования метаболического синдрома у больных параноидной шизофренией // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* 2020. № 3. С. 45–50.

АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ БЕЗНАДЕЖНОСТИ

В.И. Герасимова

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Известно, что суицидальное поведение у больных шизофренией является прогностическим фактором худшего функционального исхода. В то же время суицидальность у больных шизофренией может быть связана в том числе и с особенностями адаптации. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью оценки комплекса адаптационных возможностей больных шизофренией в зависимости от уровня суицидального риска. **Материал и методы.** Проведено обследование 116 больных шизофрений, находившихся на лечении в Томской областной психиатрической больнице. Все пациенты обследованы с использованием Шкалы безнадежности Бека. Оценка адаптации осуществлялась по методике Г.В. Логвинович. Оценка адаптации и уровня социального функционирования проводилась с использованием самоопросника SASS. **Результаты и заключение.** Можно предположить, что безнадежности и суицидальный риск в большей степени зависят не от объективного уровня социальной адаптации (т. к. у лиц с более выраженной безнадежностью преобладают благоприятные типы адаптации), а от субъективной удовлетворенности имеющимся уровнем функционирования (более высокой у лиц с низким уровнем безнадежности), которая, в свою очередь, может зависеть от качества жизни и уровня социальных амбиций личности в преморбидном периоде (на что косвенно может указывать более высокий уровень образования в группе лиц с более выраженной безнадежностью).

Ключевые слова: шизофрения, безнадежность, суицидальный риск, социальная адаптация.

ADAPTIVE PROPERTIES OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA DEPENDING ON THE LEVEL OF HOPELESSNESS

V.I. Gerasimova

Mental Health Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

Annotation

It's generally known that suicidal behavior in patients with schizophrenia is a predictor of worse functional outcome. At the same time, suicidality in patients with schizophrenia may be due, among other things, to the peculiarities of adaptation. The relevance of this work is due to the need to assess the complex of adaptive capabilities of patients with schizophrenia depending on the level of suicide risk. **Materials and methods.** There was carried out a survey of 116 patients with schizophrenia, who were treated in the Tomsk Regional Psychiatric Hospital. All patients were examined using the Beck Hopelessness Scale. Adaptation assessment was carried out according to the method of G.V. Logvinovich. The level of social adaptation was assessed using the Social Adaptation Self-evaluation Scale. **Results and conclusion.** It can be assumed that hopelessness and suicide risk more depend not on the level of social adaptation, but on the subjective experience of the level of adaptation as low or high, which may depend on the quality of life and the level of social ambitions of the individual in the premorbid.

Key words: schizophrenia, suicide, hopelessness, suicide risk, social adaptation.

Актуальность. Несмотря на то, что шизофрения является расстройством с относительно низкой распространенностью, она вносит существенный вклад в глобальное бремя болезней во всем мире [1], во многом за счет уменьшения адаптационных возможностей. К значительным нарушениям психосоциального функционирования ведут как психопатологические симптомы (позитивные и негативные), так и нарушения когнитивных функций [2]. Кроме того, в настоящий момент подчеркивается, что показателем эффективности лечения шизофрении является не только редукция психопатологической симптоматики, но и улучшение профессионального функционирования, способность к самостоятельной жизни и способность выстраивать стабильные отношения с окружающими людьми [3]. Известно, что суицидальное поведение у больных шизофренией является прогностическим фактором худшего функционального исхода [4, 5]. При этом суицидальное поведение является комплексным феноменом, включающим взаимосвязь как биологических и генетических, так и психологических, социальных и средовых факторов [6]. Высокий суицидальный риск у лиц с шизофренией по-прежнему остается актуальной проблемой: 20–50% больных совершают хотя бы одну суицидальную попытку в течение жизни [7, 8]; смертность по причине самоубийства в данной когорте больных колеблется в широком диапазоне, в среднем составляя 5% [9]. В литературе в качестве факторов риска суицида у больных шизофренией упоминаются в том числе такие социальные характеристики, как проживание в одиночестве, безработица и нетрудоспособность [10]. В то же время высокий уровень образования, хорошее преморбидное функционирование, высокий уровень интеллекта также выступают как предикторы самоубийства [11]. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью оценки комплекса адаптационно-приспособительных возможностей больных шизофренией в зависимости от уровня суицидального риска.

Цель исследования – оценить адаптационные возможности больных шизофренией в зависимости от уровня суицидального риска.

Материал и методы

Были обследованы 116 пациентов, находившихся на лечении в Томской областной психиатрической больнице. В выборку включались лица в возрасте от 18 до 60 лет, психическое состояние которых удовлетворяло диагностическим критериям МКБ-10 для диагноза шизофрения (F20), способные дать письменное добровольное информированное согласие. Оценка суицидального риска проводилась с помощью шкалы безнадежности Бека, показавшей свою специфичность и чувствительность в отношении оценки суицидального риска [12]. Шкала позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS) в адаптированной русской версии SCI-PANSS применялась с целью объективизации выраженности симптомов основного расстройства. С целью оценки адаптационно-ресурсного

потенциала использовалась методика Г.В. Логвинович с установлением типа компенсаторно-приспособительной реакции и типа адаптации [16], шкала самооценки социальной адаптации (The Social Adaptation Self-evaluation Scale – SASS). Также оценивался ряд объективных показателей социальной адаптации (семейное положение, уровень образования, профессиональный статус). Кроме того, оценивалась частота обращения за психиатрической помощью в период за последние два года: госпитализация в психиатрический стационар реже 1 раза в год, 1 раз в год, более 1 раза в год, лица без выписки. Все обследуемые были разделены на две группы в зависимости от уровня безнадежности: в первую группу вошли лица без выявленной безнадежности и с низким уровнем безнадежности (89 человек – 76,7%), во вторую группу – лица со средним и высоким уровнем безнадежности (27 человек – 23,3%). Группы были сравнимы по половозрастным и клиническим характеристикам и длительности заболевания. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета стандартных прикладных программ Statistica for Windows (v.12.0). Для сравнения групп использовались критерий Манна-Уитни, χ^2 -критерий Пирсона. Пороговое значение достигнутого уровня значимости p было принято равным 0,01.

Результаты

Группы были сравнены между собой по уровню самооценки социальной адаптации, семейному положению, уровню образования, профессиональному статусу, частоте обращения за психиатрической помощью в период за последние два года, типам индивидуальных компенсаторно-приспособительных защит и типам социальной адаптации. В результате было установлено, что группы не обнаружили статистически значимых различий в частоте госпитализаций за последние два года, типах индивидуальных компенсаторно-приспособительных защит, профессиональном статусе и семейном положении. Были обнаружены статистически значимые различия между группами в уровне самооценки социальной адаптации, уровне образования и типах социальной адаптации. Так, в группе со средним и высоким уровнем безнадежности был ниже уровень самооценки социальной адаптации, преобладали лица со средне-специальным образованием (в группе без выявленной безнадежности и с легким уровнем безнадежности – со средним), а также преобладали более благоприятные типы социальной адаптации – интравертный и интегративный (таблица).

Таблица

Уровень самооценки социальной адаптации, уровень образования и типы социальной адаптации в группе с невыявленным и низким уровнем безнадежности и группе со средним и высоким уровнем безнадежности

Показатели	Невыявленный / низкий уровень безнадежности (n=89)	Средний / высокий уровень безнадежности (n=27)	p-значение / p-value
Уровень самооценки социальной адаптации			
Низкий уровень социальной адаптации (SASS < 35)	28 (31,46%)	20 (74,07%)	0,00008
Высокий уровень социальной адаптации (SASS > 35)	61 (69,54%)	7 (25,93%)	
Тип социальной адаптации			
Интегративный	0 (0,0%)	13 (48,15%)	0,002
Интравертный	13 (14,61%)	11 (40,74%)	
Экстравертный	50 (56,18%)	3 (11,11%)	
Деструктивный	26 (29,21%)	0 (0,0%)	
Образование			
Высшее	16 (17,98%)	4 (14,81%)	0,0025
Среднее специальное	25 (28,09%)	16 (59,27%)	
Среднее	42 (47,19%)	3 (11,11%)	
Неполное среднее	6 (6,74%)	4 (14,81%)	

Заключение. Полученные данные демонстрируют более высокий уровень самооценки социальной адаптации у лиц с менее выраженной безнадежностью, а также более низкий уровень образования в данной группе. В то же время лица со средним и высоким уровнем безнадежности демонстрируют преобладание более благоприятных типов социальной адаптации. Можно предположить, что безнадежность и суицидальный риск в большей степени зависят не от объективного уровня социальной адаптации (т. к. у лиц с более выраженной безнадежностью преобладают благоприятные типы адаптации), а от субъективной удо-

влетворенности имеющимся уровнем функционирования, которая, в свою очередь, может зависеть от качества жизни и уровня социальных амбиций личности в преморбидном периоде (на что косвенно может указывать более высокий уровень образования в группе лиц с более выраженной безнадежностью).

ЛИТЕРАТУРА

1. Charlson F.J., Ferrari A.J., Santomauro D.F., Diminic S., Stockings E., Scott J.G., McGrath J.J., Whiteford H.A. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016 // *Schizophrenia Bulletin*. 2018. 44 (6). 1195–1203.
2. Mueser K.T. Should psychosocial treatment for schizophrenia focus on the proximal or distal consequences of the disorder? // *J. Ment. Health*. 2012. 21 (6). 525–530.
3. Juckel G., Morosini P.L. The new approach: psychosocial functioning as a necessary outcome criterion for therapeutic success in schizophrenia // *Curr Opin Psychiatry*. 2008. 21(6). 630–639.
4. Schennach-Wolff R., Jäger M., Seemüller F., Obermeier M., Messer T., Laux G., Pfeiffer H., Naber D., Schmidt L. G., Gaebel W., Huff W., Heuse I., Maier W., Lemke M.R., Ruther E., Buchkremer G., Gastpar M., Moller H.J., Riedel M. Defining and predicting functional outcome in schizophrenia and schizophrenia spectrum disorders // *Schizophr Res*. 2009. 113. 210–217
5. Корнетова Е.Г., Семке А.В., Корнетов А.Н., Иванова С.А., Лобачева О.А., Семенюк К.А., Бойко А.С., Бохан А.А. Становление и развитие взглядов на адаптацию больных шизофренией // *Шизофрения: биопсихосоциальная модель и конституционально-биологический подход*. Томск: ООО «Интегральный Переплет», 2018. С. 158–173
6. Hawton K., van Heeringen K. Suicide // *Lancet*. 2009. 373(9672). 1372–1381.
7. Cassidy R.M., Yang F., Kapczynski F., Passos I.C. Risk factors for suicidality in patients with schizophrenia: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of 96 studies // *Schizophrenia Bulletin*. 2018. 44(4). 787–797.
8. Pompili M., Amador X.F., Girardi P., Harkavy-Friedman J., Harrow M., Kaplan K., Krausz M., Lester D., Meltzer H.Y., Modestin J., Montross L.P., Mortensen P.B., Munk-Jørgensen P., Nielsen J., Nordentoft M., Saarinen P.I., Zisook S., Wilson S.T., Tatarelli R. Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future // *Annals of General Psychiatry*. 2007. 6(10).
9. Carlborg A., Winnerbäck K., Jönsson E.G., Jokinen J., Nordström P. Suicide in schizophrenia // *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010. 10. 1153–1164.
10. Popovic D., Benabarre A., Crespo J.M., Goikolea J.M., González-Pinto A., Gutiérrez-Rojas L., Montes J.M., Vieta E. Risk factors for suicide in schizophrenia: systematic review and clinical recommendations // *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2014. 130(6). 418–426.
11. Sher L., Kahn R.S. Suicide in schizophrenia: an educational overview // *Medicina (Kaunas)*. 2019. 55(7). 361.
12. Aloba O., Esan O., Alimi T. Adaptation of the Beck Hopelessness Scale as a suicide risk screening tool among Nigerian patients with schizophrenia // *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*. 2018. 22(1). 19–24.

АЛГОРИТМ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ ВЫБОРА АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ, ИМЕЮЩЕЙ НИЗКУЮ ВЕРОЯТНОСТЬ РАЗВИТИЯ АКАТИЗИИ

А.А. Гончарова¹, В.И. Герасимова¹, В.В. Тигунцев¹, А.А. Зарубин²

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
 НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

Акатизия на фоне приема антипсихотических препаратов является распространенным нежелательным двигательным явлением у больных шизофренией. Разработка и поиск способов профилактики ее возникновения на этапе подбора/определения тактики лечения позволит оптимизировать лечебные процессы и реабилитацию данной группы пациентов. Был разработан алгоритм поддержки принятия врачебных решений выбора антипсихотической терапии, имеющей низкую вероятность развития акатизии у больных шизофренией, основу которого составляют клинические и конституционально-морфологические характеристики.

Ключевые слова: акатизия, шизофрения, антипсихотики, конституция, дерево решений, алгоритм.

A METHOD FOR SUPPORT MEDICAL DECISION-MAKING IN THE CHOICE OF ANTIPSYCHOTIC THERAPY WITH A LOW CHANCE OF DEVELOPING AKATHISIA

A.A.Goncharova¹, V.I.Gerasimova¹, V.V.Tiguntsev¹, A.A.Zarubin²

Mental Health Research Institute Tomsk NRMС, Tomsk, Russia¹
 Research Institute of Medical Genetics Tomsk NRMС, Tomsk, Russia²

Annotation

Akathisia in patients receiving antipsychotic drugs is a common motor adverse event in patients with schizophrenia. The development and search for ways to prevent its occurrence at the stage of selection / determination of treatment tactics will optimize the treatment processes and rehabilitation of this group of patients. An algorithm was developed to support medical decision-making in the choice of antipsychotic therapy, which has a low probability of developing akathisia in patients with schizophrenia, based on clinical and constitutional-morphological characteristics.

Key words: akathisia, schizophrenia, antipsychotics, constitution, decision tree, algorithm.

Актуальность. Изучение и поиск предикторов развития акатизии у больных шизофренией на фоне антипсихотической терапии является важной задачей. Имеющиеся литературные данные демонстрируют противоречивые сведения о факторах ее возникновения [1] и сосредоточены преимущественно на изучении половых различий, особенностей клиники и течения основного заболевания, терапевтического воздействия [2] и отдельных конституционально-морфологических параметров [3]. Создание модели, которая позволит комплексно оценить вклад различных предикторов в развитие акатизии у пациентов с шизофренией, получающих антипсихотики на этапе подбора терапевтической тактики, также позволит оптимизировать лечение и реабилитацию больных. В последние годы интеллектуальные системы или алгоритмы поддержки принятия врачебных решений в медицине начинают использоваться более широко на всех этапах лечебно-диагностического процесса. В психиатрии эти разработки в основном направлены на подбор рационального фармакологического вмешательства при различных психических расстройствах.

Цель исследования – изучение клиничко-конституциональных особенностей больных шизофренией с акатизией для разработки алгоритма поддержки принятия врачебных решений выбора антипсихотической терапии, имеющей низкую вероятность развития акатизии.

Материал и методы

Было обследовано 214 пациентов с верифицированным диагнозом шизофрении в соответствии с критериями МКБ 10. Оценка акатизии была выполнена через две недели после поступления пациента в стационар, что соответствует периоду развития острой акатизии на фоне приема антипсихотической терапии с использованием валидизированной и стандартизированной шкалы оценки акатизии Барнса (Barnes Akathisia Rating Scale – BARS) [4], на основании чего были выделены основные группы исследования, где 1 – пациенты с акатизией (n=92; мужчин 50 (54,3%), женщин 42 (45,7%); возраст – 41 [31; 52] год) и 2 – пациенты без акатизии (n=122, мужчин 62 (50,8%), женщин 60 (49,2%), возраст пациентов – 39 [32; 49] лет). Оценка ведущей клиничко-психопатологической симптоматики была выполнена с использованием шкалы позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS) [5]. Клиничко-антропометрические обследования производились с использованием антропометрического метода, применяемого для взрослых выборок [6]. Конституционально-морфологический тип вычислялся по индексу Rees-Eysenk [7], соматическая половая дифференциация вычислялась по индексу Tanner [8].

Для построения случайного леса (Random Forests) был использован пакет «RandomForest» (The R Project for Statistical Computing (R version 3.6.3) в доступной лицензионной среде RStudio (распространяется под лицензией GPL)) с выделением наиболее информативных параметров в отношении вероятности развития акатизии и последующим постарением одного дерева решений. Это позволило облегчить интерпретацию и визуализировать полученные результаты при сохранении точности классификации. Целевой переменной являлось наличие/отсутствие акатизии.

Результаты

На первом этапе разработки алгоритма было выполнено моделирование случайного леса (Random Forest), включающее построение 500 вариантов деревьев решения, где атрибутами выступили следующие показатели: социально-демографические (пол, возраст), клинические (возраст манифестации шизофренического процесса, длительность заболевания, профиль ведущей симптоматики, показатели по субшкалам PANSS, тяжесть психического состояния по CGI-1, табакокурение и употребление алкоголя), терапевтические показатели (длительность базисной антипсихотической терапии, прием комбинированной терапии, дозы принимаемой антипсихотической терапии в перерасчете на хлорпромазиновый эквивалент),

конституционально-морфологические характеристики пациента (обхват талии, индекс Rees–Eysenk и индекс Tanner, конституционально морфологические типы и типы соматической половой дифференциации).

На следующем этапе было построено дерево решений (рис. 1), в которое были включены данные атрибуты после приоритизации параметров на основании индекса Джини (Gini impurity). При значении индекса Джини (Gini impurity) ≥ 7 были выбраны следующие атрибуты: возраст манифестации шизофренического процесса, длительность заболевания, общий балл по шкале PANSS, окружность талии, индекс Rees-Eysenk и индекс Tanner.

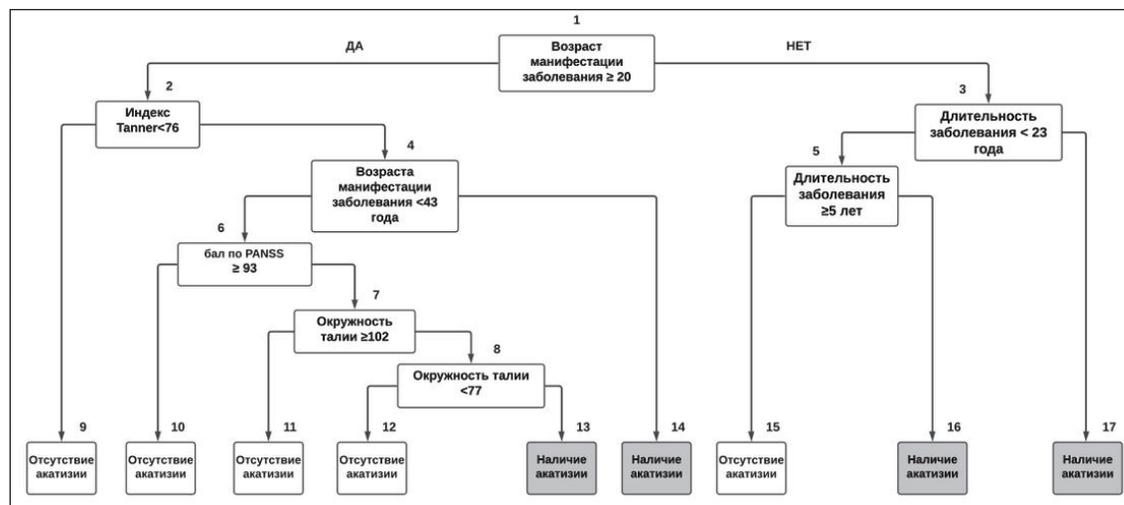


Рис. 1. Дерево решений по целевой переменной: наличие/отсутствие акатизии.
Примечание: 1–17 – узлы разделений

Таким образом, на основании математического анализа данных были выделены следующие правила. Если возраст манифестации шизофрении < 20 лет и длительность заболевания > 23 лет, то вероятно развитие акатизии. Если возраст манифестации шизофрении < 20 лет и длительность заболевания < 5 лет, то вероятно развитие акатизии. Если возраст манифестации шизофрении ≥ 20 лет, показатель индекса Tanner ≥ 76 , то вероятно развитие акатизии. Если возраст манифестации шизофрении ≥ 20 лет и < 43 лет, показатель индекса Tanner ≥ 76 , общий балл по шкале PANSS < 93 , а окружность талии > 77 см и < 102 см, то вероятно развитие акатизии.

Была выполнена оценка эффективности решающих правил классификации, где общий процент верно спрогнозированных результатов составил 86,6%. Также был выполнен ROC-анализ, с определением площади под ROC-кривой, которая равняется 0,765, что говорит о качественной классификации.

Далее выполнена проверка качества модели, сформированной из исходных данных. Для этого основная выборка случайным образом была разделена на тренировочную (75% от выборки) и тестовую (25% от выборки) модели. Для тренировочной модели была построена новая модель дерева решений, которая содержала параметры, аналогичные основной модели: общий процент верно спрогнозированных результатов – 82,2%, площадь под ROC-кривой – 0,768, что демонстрирует качественную классификацию. Также проверка тестовой модели была выполнена на тренировочной выборке, где процент верно спрогнозированных результатов – 65,0% и площадь под ROC-кривой = 0,751, что демонстрирует качественную классификацию.

Заключение

Таким образом, для предупреждения развития акатизии у больных шизофренией необходимо учитывать следующие клинические и конституционально-морфологические характеристики: возраст манифестации шизофренического процесса, длительность заболевания, общий балл по шкале PANSS, окружность талии и индекс Tanner. Для пациентов, удовлетворяющих одному из полученных правил дерева решений, следует назначать препараты с низким риском развития акатизии, например, кветиапин или оланзапин.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-315-90010 «Конституционально-биологические и социально-средовые факторы развития и персистенции антипсихотик-индуцированной акатизии у больных шизофренией» (2019–2021 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Yoshimura B., Sato K., Sakamoto S., Tsukahara M., Yoshimura Y., So R. Incidence and predictors of acute akathisia in severely ill patients with first-episode schizophrenia treated with aripiprazole or risperidone: secondary analysis of an observational study // *Psychopharmacology (Berl)*. 2019. Vol. 236(2) P.723–730. doi: 10.1007/s00213-018-5101-7.
2. Berna F., Misdráhi D., Boyer L., Aouizerate B., Brunel L., Capdevielle D., Chereau I., Danion J.M., Dorey J.M., Dubertret C., Dubreucq J., Faget C., Gabayet F., Lancon C., Mallet J., Rey R., Passerieux C., Schandrin A., Schurhoff F., Tronche A.M., Urbach M., Vidailhet P., Llorca P.M., Fond G; FACE-SZ (FondaMental Academic Centers of Expertise for Schizophrenia) group. Akathisia: prevalence and risk factors in a community-dwelling sample of patients with schizophrenia. Results from the FACE-SZ dataset. *Schizophrenia Res.* 2015. Vol. 169(1–3). P.255–261. doi: 10.1016/j.schres.2015.10.040.
3. De Araujo A.A., Ribeiro S.B., Dos Santos A.C., Lemos T.M., Medeiros C.A., Guerra G.C., de Araujo Júnior R.F., Serrano-Blanco A., Rubio-Valera M. Quality of Life and Hormonal, Biochemical, and Anthropometric Profile Between Olanzapine and Risperidone Users // *Psychiatr Q.* 2016. Vol. 87(2) P.293–304. doi: 10.1007/s11126-015-9385-z.
4. Barnes T.R. A rating scale for drug-induced akathisia // *British Journal of Psychiatry.* 1989. Vol. 154. P. 672–676.
5. Kay S.R. et al. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia // *Schizophrenia Bulletin.* 1987. Vol. 13. P. 261–276.
6. Чтецов В.П. и др. Изучение состава тела у взрослого населения: методические аспекты // *Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология.* 2012. № 2. С. 43–52.
7. Rees W.L., Eysenk H.J. A factorial study of some morphological aspects of human constitution // *Journal of Mental Science.* 1945. Vol. 91, № 382. P. 8–21.
8. Brooksbank B.W. et al. Androgen excretion and physique in schizophrenia // *British Journal of Psychiatry.* 1970. Vol. 117, № 539. P. 413–420.

ВЛИЯНИЕ IGG БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА НА МОДЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ SHSY5Y

Е.В. Епимахова¹, Д.В. Казанцева², А.Р. Васильева²

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия²

Аннотация

Недавние исследования свидетельствуют о наличии каталитических свойств иммуноглобулинов класса G, выделенных из сыворотки крови больных шизофренией. Однако не ясна биологическая роль каталитически активных антител в патогенезе заболевания. **Целью** данной работы явилось изучение эффектов IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с шизофренией, на показатели апоптоза на модели клеточной линии SHSY5Y. Выделение препаратов IgG проводили методом аффинной хроматографии из сыворотки крови 10 пациентов с параноидной шизофренией в острой фазе и 7 условно здоровых лиц. Гомогенность препаратов определяли методом градиентного электрофореза в 4–18% ПААГ. Долю клеток на стадии раннего апоптоза оценивали по окрашиванию флуоресцентным красителем AnnexinV методом высокопроизводительного скрининга на платформе CellInsight CX7. Для этого клетки нейробластомы рассаживали в 96-луночные планшеты и культивировали с IgG в конечной концентрации 0,1 или 0,2 мг/мл в течение 3 или 5 ч. **Результаты.** При культивировании культуры клеток SHSY5Y с добавлением IgG, выделенных из сыворотки пациентов (в конечной концентрации 0,1 мг/мл), выявлено статистически значимое увеличение доли клеток на ранней стадии апоптоза по сравнению с клеточными культурами, инкубированными с IgG здоровых людей. Аналогичные результаты получены и при более высокой концентрации антител – 0,2 мг/мл, а также при изменении времени инкубации. **Заключение.** Обнаружено увеличение доли апоптотических клеток при культивировании клеточной линии SHSY5Y с IgG, выделенными из сыворотки крови больных шизофренией.

Ключевые слова: шизофрения, абзимы, IgG, клеточная линия SHSY5Y, апоптоз.

EFFECT OF IGG IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS ON APOPTOSIS IN THE SHSY5Y CELL CULTURE MODEL

E.V. Epimakhova¹, D.V. Kazantseva², A.R. Vasilyeva²

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation²

Abstract

Introduction. Recent studies have demonstrated the presence of catalytic properties of class G immunoglobulins isolated from the blood serum of schizophrenic patients. However, the biological role of catalytically active antibodies in the pathogenesis of the disease is not clear. **Objective** of this work was to study the effects of serum IgG in patients with schizophrenia on apoptosis in a model of the cell line SHSY5Y. **Material and Methods.** Isolation of IgG preparations was performed by affinity chromatography from the blood serum of 10 patients with paranoid schizophrenia in the acute phase and 7 healthy individuals. The homogeneity of the preparations was determined by the method of gradient electrophoresis in 4-18% PAGE. The percentage of cells at the stage of early apoptosis was assessed by staining with the fluorescent dye AnnexinV by a high-content screening method on the CellInsight CX7 platform. For this, cells were seeded in 96-well plates and cultured with IgG at a final concentration of 0,1 or 0.2 mg / ml for 3 or 5 hours. **Results.** culturing SHSY5Y cells supplemented with patient IgG (final concentration of 0.1 mg/mL) resulted in a statistically significant increase in the proportion of cells at the early stage of apoptosis compared to cell cultures incubated with IgG from healthy individuals. Similar results were obtained with a higher concentration of antibodies - 0.2 mg/ml, as well as with a change in the incubation time. **Conclusion.** An increase in the percentage of apoptotic cells was found during cultivation of the SHSY5Y cell line with IgG isolated from the blood serum of patients with schizophrenia.

Key words: schizophrenia, abzymes, IgG, SHSY5Y cell line, apoptosis.

Актуальность. Шизофрения сопровождается дисфункцией иммунной системы [1, 2]. Среди всего пула иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки крови больных шизофренией, обнаружены антитела, в частности IgG, обладающие каталитическими свойствами [3, 4]. Изучение механизмов и биологической роли каталитически активных антител представляется перспективным, поскольку наличие подобных свойств значительно увеличивает их функциональные возможности, однако вместе с тем может приводить к патологическим изменениям.

Известно, что образование каталитических антител значительно усиливается при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Кроме того, в ряде исследований описаны цитотоксические свойства каталитически активных препаратов IgG, полученных из сыворотки крови пациентов с расстройствами аутоиммунного спектра [5, 6]. Выявленные эффекты обусловлены способностью IgG проникать через мембрану клеток и вызывать фрагментацию ядерной ДНК, активируя процессы клеточной гибели, с другой стороны, такие антитела могут взаимодействовать с рецепторами клеточной поверхности, которые запускают апоптоз [7]. В связи с выявлением каталитической активности IgG, полученных из сыворотки крови больных шизофренией, было выдвинуто предположение о возможном наличии цитотоксических свойств антител при этом заболевании.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффектов IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с шизофренией, на показатели апоптоза на модели линии клеток SHSY5Y (нейробластомы человека).

Материал и методы

В исследовании использована сыворотка крови 10 пациентов с параноидной шизофренией (F 20.00, F 20.01, F20.02) в острой фазе и 7 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. IgG выделяли из сыворотки крови методом аффинной хроматографии на колонках с ProteinG-Sepharose. Отсутствие примесей и гомогенность полученных препаратов IgG доказана методом градиентного электрофореза в 4–18% ПААГ с окраской Coomassie G-250. Эффекты IgG на показатели клеточной гибели в культуре SHSY5Y проводили методом высокопроизводительного скрининга на платформе CellInsight CX7 (The Thermo Scientific, США). Долю клеток на стадии раннего апоптоза оценивали по окрашиванию флуоресцентным красителем AnnexinV (Thermo Fisher Scientific, США). Линию клеток нейробластомы культивировали в полной питательной среде ДМЕМ, содержащей 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, при 37 °С, 90% влажности в атмосфере с 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo MCO-5AC, Япония). Смену среды проводили каждые 2–3 дня. Для проведения эксперимента клетки рассаживали в 96-луночные планшеты (1x10⁴ клеток на лунку), спустя сутки добавляли полученные препараты IgG больных шизофренией или здоровых лиц в конечной концентрации 0,1 и 0,2 мг/мл и культивировали в течение 3 и 5 ч. Каждый из полученных препаратов был проанализирован в 2–3 повторах. Указанные концентрации IgG-антител были подобраны исходя из результатов ранее проведенных предварительных экспериментов и литературных данных [5, 8]. Статистическую обработку результатов про-

изводили с помощью программ SPSS, версия 20.0 для Windows. Проверку на нормальность распределения значений переменных проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий между независимыми группами, характеризующимися количественными признаками и не подчиняющимся нормальному закону распределения, оценивалась с использованием непараметрического рангового критерия Краскела–Уоллиса, для двух независимых групп – с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты

При культивировании клеток SHSY5Y в течение 5 ч. с добавлением препаратов IgG, выделенных из сыворотки пациентов (в конечной концентрации 0,1 мг/мл), доля клеток на ранней стадии апоптоза составила 9,77 [7,15;13,31] %, что статистически значимо выше значений, полученных при добавлении в клеточную культуру IgG здоровых людей (3,93 [2,07; 6,81] %, $p=0,000$). Аналогичные результаты получены при более высокой концентрации антител – 0,2 мг/мл. Так, при культивировании клеток SHSY5Y в течение 3 часов с препаратами IgG, полученными из сыворотки крови пациентов (в конечной концентрации 0, 2 мг/мл), процент апоптотических клеток был достоверно выше значений, полученных в группе здоровых людей (10,98 [9,83–11,84] % и 4,61 [4,01–5,25] % соответственно, $p=0,000$). При добавлении в клеточную культуру IgG пациентов (0, 2 мг/мл) и культивировании в течение 5 ч доля аннексин+ клеток составила 6,88 [5,17; 8,78] %. При добавлении в клеточную культуру IgG здоровых доноров при данных условиях этот показатель был равен 1,15 [0,48; 2,29] %, $p=0,000$.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного *in vitro* эксперимента выявлены цитотоксические эффекты иммуноглобулинов класса G, выделенных из сыворотки крови пациентов с шизофренией, обуславливающие увеличение доли апоптотических клеток, на культуру клеток SHSY5Y нейробластомы человека. Несмотря на невысокий процент аннексин+ клеток, учитывая высокую степень защиты опухолевых клеток, этот результат позволяет говорить о наличии цитотоксических свойств [9].

Работа поддержана грантом РФФ №18-15-00053-П «Поиск периферических маркёров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении». Регистрация клеток на стадии раннего апоптоза проводилась с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horvath S., Mirnics R. Immune system disturbances in schizophrenia // *Biol. Psychiatry*. 2014; 75:316–323. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.010.
2. Ветлугина Т.П. Иммунопатология при шизофрении: итоги исследования в НИИ психического здоровья Томского НИМЦ // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2020; 4 (109): 5–14. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2020-3\(108\)-5-14](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2020-3(108)-5-14).
3. Parshukova D., Smirnova L.P., Ermakov E.A., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Autoimmunity and immune system dysregulation in schizophrenia: IgGs from sera of patients hydrolyze myelin basic protein // *J Mol Recognit*. 2019 Feb;32(2):e2759. doi: 10.1002/jmr.2759.
4. Епимахова Е.В., Смирнова Л.П., Казанцева Д.В., Паришкова Д.А., Кротенко Н.М., Васильева А.Р., Иванова С.А., Семке А.В. Оценка цитотоксических эффектов IgG, выделенных из сыворотки крови больных шизофренией // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2021. № 4 (113). С. 5–13. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2021-4\(113\)-5-13](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2021-4(113)-5-13).
5. Сабирзянова А.З., Невзорова Т.А. Цитотоксичность и генотоксичность антител к нативной дезоксирибонуклеиновой кислоте при системной красной волчанке и ревматоидном артрите // *Российский иммунологический журнал*. 2013. Т. 7 (16), № 4. С. 428–436.
6. Nevinsky G.A. Catalytic antibodies in norm and systemic lupus erythematosus // Khan WA (Ed.). *Lupus*. Rijeka, Croatia: InTech; 2017:41-101. doi: 10.5772/67790.
7. Kozyr A.V., Sashchenko L.P., Kolesnikov A.V., Zelenova N.A., Khaidukov S.V., Ignatova A.N., Bobik T.V., Gabibov A.G., Alekberova Z.S., Suchkov S.V., Gnuchev N.V. Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines // *Immunology Letters*. 2002 January; 80(1): 41-47. doi: 10.1016/S0165-2478(01)00308-X.
8. Ermakov E., Zaharova O., Ivanova S., Buneva V., Nevinsky G. New link between inflammation and schizophrenia: IgG with nuclease activity // *European Neuropsychopharmacology*. 2018; S15-S16. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.12.035.
9. Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // *Сибирский онкологический журнал*. 2005. № 1. С. 58–61.

ГИДРОЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ СУБЪЕДИНИЦ NR1 И NR2 NMDA РЕЦЕПТОРА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТИТЕЛ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ И РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Е.А. Ермаков¹, А.А. Кузницына², Д.А. Камаева³

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия¹
 Институт белка РАН, г. Пущино, Россия²
 НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия³

Аннотация

Патогенез шизофрении и ряда других заболеваний связан с дисфункцией рецептора N-метил-D-аспартата (NMDAR). Известно, что анти-NMDAR антитела могут вызывать интернализацию и нарушать функцию этого рецептора. Однако свойства различных антител, способствующих нарушению функции NMDAR, остаются плохо изученными. В данной работе впервые показано, что IgG больных шизофренией и рассеянным склерозом могут гидролизовать *in vitro* рекомбинантные фрагменты субъединиц NR1 и NR2 NMDAR. Показано, что гидролиз рекомбинантного белка, содержащего фрагмент субъединицы NR2, идет более эффективно, чем белка с фрагментом субъединицы NR1.

Ключевые слова: шизофрения, антитела, абзимы, NMDA рецептор, рекомбинантные фрагменты субъединиц, NR1, NR2.

HYDROLYSIS OF RECOMBINANT FRAGMENTS OF THE NR1 AND NR2 SUBUNITS OF THE NMDA RECEPTOR BY ANTIBODIES FROM PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA AND MULTIPLE SCLEROSIS

Е.А. Ermakov¹, А.А. Kuznitsyna², Kamaeva D.A.³

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia¹
 Institute of Protein Research, Pushchino, Russia²
 Mental Health Research Institute, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia³

Abstract

The pathogenesis of schizophrenia and a number of other diseases is associated with dysfunction of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR). It is known that anti-NMDAR antibodies can internalize and disrupt the function of this receptor. However, the properties of various antibodies that contribute to the disruption of NMDAR function remain poorly understood. In this work, it was shown for the first time that IgG from patients with schizophrenia and multiple sclerosis can hydrolyze recombinant fragments of the NR1 and NR2 subunits of NMDAR *in vitro*. It was shown that the hydrolysis of the recombinant protein containing the NR2 subunit fragment proceeds more efficiently than the protein with the NR1 subunit fragment.

Key words: schizophrenia, antibodies, abzymes, NMDA receptor, recombinant subunit fragments, NR1, NR2.

Актуальность. Известно, что дисфункция рецептора N-метил-D-аспартата (NMDAR) связана с патогенезом шизофрении и других заболеваний [1]. Аутоантитела против субъединиц NR1 и NR2 NMDAR считаются патогенными и могут значительно влиять на синаптическую функцию [2]. Показано, что анти-NMDAR антитела могут провоцировать интернализацию и тем самым снижать количество поверхностных NMDAR, экспрессируемых в нейронах гиппокампа, а также уменьшать плотность и синаптическую локализацию NMDAR. Подобные изменения могут нарушать передачу сигналов глутамата через NMDAR и приводить к различным поведенческим нарушениям. Тем не менее, функциональные свойства анти-NMDAR антител, способствующие нарушению функции NMDAR, остаются плохо изученными.

Анти-NMDAR антитела могут быть естественного происхождения и проявлять поликлональное/полиспецифическое распознавание эпитопов во внеклеточных или внутриклеточных доменах NR1 и NR2A субъединиц NMDAR [3]. Среди антител естественного происхождения недавно обнаружены иммуноглобулины с каталитическими свойствами, или абзимы. Такие антитела обладают способностью гидролитически расщеплять антиген и являются компонентом пула естественных антител [4]. Благодаря наличию данных неканонических свойств антител функциональная активность иммунной системы значительно расширяется [4]. Антитела с протеолитической активностью были открыты более 30 лет назад [5] и в настоящее время обнаруживаются при различных заболеваниях, в том числе при рассеянном склерозе [6], системной красной волчанке [7] и шизофрении [8, 9]. При шизофрении обнаружены антитела с другими каталитическими активностями [10, 11]. Однако патологическая роль каталитических антител с протеолитической активностью при шизофрении практически не исследована. Известно, что аутоантитела, гидролизующие основной белок миелина пациентов с аутизмом, снижают долговременную потенцию в гиппокампе крыс [12]. Тем не менее патологические эффекты других аутоантител с каталитической активностью не изучены. В данной работе исследована способность IgG, выделенных от пациентов с шизофренией и РС, гидролизовать *in vitro* рекомбинантные фрагменты субъединиц NR1 и NR2 NMDAR.

Материал и методы

Были разработаны и синтезированы два рекомбинантных белка DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2, содержащие внеклеточные домены субъединиц NR1 и NR2 NMDAR. Белки состоят из декстрансвязывающего домена *Leuconostocmesenteroides* (DBD), спейсера Gly-Ser и последовательностей внеклеточных доменов NR1 или NR2 NMDAR. В это пилотное исследование были включены пять пациентов с параноидной шизофренией, два пациента с рассеянным склерозом (РС) и два здоровых донора. Фракции IgG выделяли из образцов крови каждого субъекта, очищали хроматографически на протеин-G-сефарозе и использовали для анализа их протеолитической активности *in vitro*. Гомогенность препаратов IgG и отсутствие примесей подтверждали с помощью градиентного (4–18%) SDS-PAGE с последующей окраской CommassieG-250. Реакционная смесь содержала 0,5 мг/мл белков DBD-NMDAR1 или DBD-NMDAR2 и 0,1 мг/мл IgG. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 1, 2, 5, 9 и 12 ч. Реакцию гидролиза останавливали с помощью охлаждения пробирок в жидком азоте до проведения анализа. Продукты гидролиза анализировали электрофорезом в 15% полиакриламидном геле после 9 ч инкубации при 37 °C. Продукты гидролиза также разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на нанопотоковом хроматографе Easy-nLc 1000 (Thermo Scientific, США) с последующей идентификацией на масс-спектрометре OrbiTrapElite (Thermo Scientific, США). Результаты обрабатывали с помощью браузера Thermo Xcalibur Qual Browser и программного обеспечения PEAKS Studio-7.5. Статистический анализ проводили с использованием модуля рангового критерия Уилкоксона программного обеспечения Statistica 10.

Результаты

Мы продемонстрировали способность препаратов IgG от пациентов с шизофренией или от пациентов с РС гидролизовать как DBD-NMDAR1, так и DBD-NMDAR2. Электрофоретический анализ показал, что при инкубации рекомбинантных белков (0–9 ч) с препаратом IgG больного шизофренией происходит снижение интенсивности пятен белков DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2 на электрофореграмме. Данная зависимость имеет гиперболический вид, что подтверждает каталитическую природу данного процесса. При этом снижение интенсивности пятен DBD-NMDAR2 происходит более интенсивно, чем DBD-NMDAR1, что позволяет предположить, что гидролиз DBD-NMDAR2 антителами данного пациента идет более эффективно, чем гидролиз DBD-NMDAR1.

Масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза рекомбинантных белков DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2 в присутствии IgG больных шизофренией, рассеянным склерозом и здоровых лиц также показал, что препараты пациентов эффективно гидролизуют данные белки. Препараты IgG от больных РС гидролизуют эти белки более эффективно, чем IgG от больных шизофренией. IgG от больных шизофренией гидролизуют различные области (контрольный домен DBD или домены NR1 или NR2) рекомбинантных белков с разной эффективностью. В случае DBD-NMDAR1 количество идентифицированных пептидов (полученных в результате гидролиза) из домена NR1 (медианное значение: 23 пептида) было значительно выше ($p = 0,005$), чем из контрольного домена DBD (10 пептидов). В случае DBD-NMDAR2 количество идентифицированных пептидов из домена NR2 (60 пептидов)

было значительно выше ($p=0,017$), чем из контрольного домена DBD (45 пептидов). Интересно, что при гидролизе DBD-NMDAR2 образуется больше пептидов, чем при гидролизе DBD-NMDAR1. Эти данные согласуются с результатами электрофоретического анализа продуктов гидролиза.

Проведен анализ кинетики реакции протеолиза рекомбинантных белков DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2 под действием препаратов IgG.

Наблюдаемые закономерности увеличения числа идентифицированных пептидов из фрагментов внеклеточных доменов субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора в зависимости от времени при инкубации с IgG здорового донора, больного рассеянным склерозом и двух больных шизофренией имели гиперболический вид и описывались уравнением вида: $y = P1 \times X / (P2 + X)$. Таким образом, процесс образования пептидов подчинялся кинетике Михаэлиса–Ментен, что подтверждает ферментативную природу данного процесса. Важно отметить, что начальные скорости образования пептидов (пептидов/ч) для всех проанализированных IgG в случае гидролиза фрагмента NR2 оказались на 2,3–4,6 раз выше, чем в случае гидролиза фрагмента NR1. Таким образом, гидролиз рекомбинантного белка, содержащего фрагмент субъединицы NR2, идет более эффективно, чем белка с фрагментом субъединицы NR1.

Выводы

Таким образом, впервые было показано, что IgG больных шизофренией и РС могут гидролизовать *in vitro* рекомбинантные белки DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2, содержащие фрагменты внеклеточных доменов субъединиц NR1 и NR2 NMDAR. Эти антитела обладают данной активностью, что доказано с помощью электрофоретических и масс-спектрометрических методов. При этом доказана ферментативная природа наблюдаемой активности. Необходимы дальнейшие эксперименты *in vivo*, чтобы установить вклад антител, гидролизующих фрагменты субъединиц NR1 и NR2 NMDAR, в патогенез шизофрении.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 18-15-00053-П. Масс-спектрометрический анализ проведен на базе ЦКП «Протеом Человека» ИБМХ (г. Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Balu D.T. The NMDA receptor and schizophrenia: from pathophysiology to treatment // *Advances in pharmacology*. 2016. Vol. 76. P. 351–382.
2. Wenke N.K., Kreye J., Andrzejak E., Casteren A., Leubner J., Murgueitio M.S., Reincke S.M., Secker C., Schmidl L., Geis C., Ackermann F., Nikolaus M., Garner C.C., Wardemann H., Wolber G., Prüss H. N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit // *Annals of neurology*. 2019. Vol. 85, №. 5. P. 771–776.
3. Castillo-Gómez E., Oliveira B., Tapken D., Bertrand S., Klein-Schmidt C., Pan H., Zafeiriou P., Steiner J., Jurek B., Trippe R., Prüss H., Zimmermann W.-H., Bertrand D., Ehrenreich H., Hollmann M. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class // *Molecular psychiatry*. 2017. Vol. 22, №. 12. P. 1776–1784.
4. Ermakov E.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Immunoglobulins with non-canonical functions in inflammatory and autoimmune disease states // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, №. 15. P. 5392.
5. Paul S., Völle D.J., Beach C.M., Johnson D.R., Powell M.J., Massey R.J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // *Science*. 1989. Vol. 244, №. 4909. P. 1158–1162.
6. Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., Govorun V.M., Serebryakova M.V., Avalle B., Tornatore P., Karavanov A., Morse H.C. 3rd, Thomas D., Friboulet A., Gabibov A.G. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, №. 2. P. 281–286.
7. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // *Journal of cellular and molecular medicine*. 2003. Vol. 7, №. 3. P. 265–276.
8. Parshukova D., Smirnova L.P., Ermakov E.A., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Autoimmunity and immune system dysregulation in schizophrenia: IgGs from sera of patients hydrolyze myelin basic protein // *Journal of Molecular Recognition*. 2019. Vol. 32, №. 2. P. e2759.
9. Ermakov E.A., Parshukova D.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Natural catalytic iggs hydrolyzing histones in schizophrenia: Are they the link between humoral immunity and inflammation? // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21, №. 19. P. 7238.
10. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalase activity of IgG antibodies from the sera of healthy donors and patients with schizophrenia // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, №. 9. P. e0183867.
11. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Parkhomenko T.A., Dmitrenok P.S., Krotchenko N.M., Fattakhov N.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia // *Open biology*. 2015. Vol. 5, №. 9. P. 150064.
12. Gonzalez-Gronow M., Cuchacovich M., Francos R., Cuchacovich S., Blanco A., Sandoval R., Gomez C.F., Valenzuela J.A., Ray R., Pizzo S.V. Catalytic autoantibodies against myelin basic protein (MBP) isolated from serum of autistic children impair *in vitro* models of synaptic plasticity in rat hippocampus // *Journal of neuroimmunology*. 2015. Vol. 287. P. 1–8.

ОБМ-ГИДРОЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ

Д.А. Камаева¹, Д.В. Казанцева², А.Р. Васильева²

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

В рамках изучения патогенеза психических расстройств все больше внимания уделяется нарушениям иммунологической регуляции, процессам воспаления и аутоиммунному компоненту, что является актуальным как для биполярного аффективного расстройства, так и для шизофрении. Исследование сывороточных каталитических антител, обладающих протеолитической активностью в отношении нейрогенных белков, позволит расширить представления о специфичности этих нарушений при различных психических расстройствах, а также оценить их потенциальную клиническую значимость. В работе исследована ОБМ-гидролизующая активность сывороточных IgG пациентов с биполярным расстройством и шизофренией. Продемонстрирована способность антител гидролизовать основной белок миелина при БАР, при этом уровень активности антител пациентов с БАР в 4 раза ниже, чем у пациентов с шизофренией, что указывает на более высокую значимость аутоиммунного компонента в патогенезе шизофрении, в отличие от БАР.

Ключевые слова: антитела, иммуноглобулины, абзимы, основной белок миелина, биполярное расстройство.

MBP-HYDROLYZING ACTIVITY OF SERUM ANTIBODIES IN AFFECTIVE DISORDERS

Д.А. Камаева¹, D.V. Kazantseva², A.R. Vasilyeva²

Research Institute of Mental Health Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Annotation

With regard to the pathogenesis of mental disorders, more attention is paid to immunological dysregulation, inflammation and autoimmunity, which is relevant for both bipolar affective disorder (BD) and schizophrenia. The study of serum catalytic antibodies with proteolytic activity against neurogenic proteins will allow us to evaluate the specificity of this factor in various mental disorders and potential clinical significance. In this work we studied the MBP-hydrolyzing activity of serum IgG in patients with bipolar disorder and schizophrenia. The ability of antibodies to hydrolyze myelin basic protein in BD has been demonstrated, while the level of antibody activity in patients with BD is 4 times lower than in patients with schizophrenia. This may indicate a higher significance of the autoimmune component in the pathogenesis of schizophrenia, in contrast to bipolar disorder.

Key words: antibodies, immunoglobulins, abzymes, myelin basic protein, bipolar disorder.

Актуальность. Аффективные расстройства являются серьезным социально-экономическим и медицинским бременем для современного общества, в частности биполярное аффективное расстройство (БАР), по данным ВОЗ, занимает лидирующие позиции по количеству потерянных лет трудоспособной жизни. Этим видом психического расстройства страдают 45 млн человек во всем мире [1]. Как БАР, так и шизофрения относятся к числу наиболее тяжелых и трудно поддающихся лечению психических расстройств. В рамках изучения патогенеза биполярного аффективного расстройства все больше внимания уделяется процессам воспаления, нарушений иммунологической регуляции и аутоиммунному компоненту [2,3]. В частности, появились первые работы, указывающие на наличие каталитических свойств у сывороточных иммуноглобулинов (ДНК-гидролизующей активности) при БАР [4]. Ранее мы показали наличие сывороточных IgG, гидролизующих основной белок миелина (ОБМ), и их связь с клиническими характеристиками шизофрении [5]. Исследование анти-

тел, обладающих протеолитической активностью в отношении нейрогенных белков, таких как основной белок миелина (ОБМ), у пациентов с БАР ранее не проводилось.

Цель исследования – выявление и сравнительная характеристика протеолитической активности сывороточных IgG с ОБМ-гидролизующей активностью у пациентов с биполярным аффективным расстройством и шизофренией.

Материал и методы

Иммуноглобулины G выделены методом аффинной хроматографии на колонках с ProteinG-Sepharose из крови 30 пациентов с БАР и 30 пациентов с параноидной шизофренией (МКБ-10: F31, F20.0). Группу контроля составили 20 психически и соматически здоровых лиц. Протеолитическую активность и ее ингибирование оценивали по степени гидролиза ОБМ методом электрофореза в 12,5% ПААГ и выражали в единицах. Активность протеолиза выражалась в единицах удельной активности мгОБМ/мгIgG/ч) и оценивалась по убыли субстрата (ОБМ) после инкубации с препаратами IgG с помощью системы гель-документации iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, США, прибор размещен на базе ЦКП «Медицинская геномика», ТНИМЦ). Статистический анализ проводился с использованием критерия Манна–Уитни для парных сравнений для независимых выборок.

Результаты

В результате исследования показано, что гомогенные препараты IgG, выделенные из сыворотки крови пациентов с БАР, гидролизуют нативный ОБМ, при этом уровень удельной активности у пациентов с БАР составил 0,25 [0,03; 0,33] мгОБМ/мгIgG/ч, что достоверно превышало ($p < 0,008$) уровень активности IgG здоровых лиц 0,00 [0,00; 0,20] мгОБМ/мгIgG/ч. Уровень удельной активности пациентов с БАР в 4 раза ($p < 0,0001$) снижен по сравнению с уровнем активности у пациентов с шизофренией 1,01 [0,29; 2,70] мгОБМ/мгIgG/ч. Примечательно, что сывороточный уровень антител к ОБМ у пациентов с БАР 4,03 [3,58; 5,08] также достоверно снижен ($p = 0,025$) по сравнению с уровнем антител у пациентов с шизофренией 6,09 [4,67; 7,79].

На основании проверки строгих критериев (гомогенность, гельфилтрация в условиях рН-шока) показано, что протеолитическая активность является собственным свойством АТ, а не возможных совыделяемых протеаз. Анализ субстратной специфичности выявил отсутствие специфического гидролиза для таких тестовых субстратов, как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин и коллаген, в отличие от антител пациентов с шизофренией. Ингибиторный анализ протеолиза ОБМ показал максимальное ингибирование (50–100%) при использовании PMSF и йодацетамида, что характерно для протеаз серинового типа и цистеиновых протеаз. В то время как для препаратов IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с шизофренией, наиболее эффективными ингибиторами являются PMSF и ЭДТА.

Заключение

В данной работе впервые приведены доказательства наличия протеолитической активности у сывороточных IgG пациентов с БАР. Обобщая данные исследований, важно отметить, что уровень ОБМ-гидролизующей активности у пациентов с БАР, хоть достоверно и превышает уровень активности абзимов здоровых лиц, но значительно ниже, чем при других расстройствах. Уровень ОБМ-гидролизующей активности снижается в ряду аутоиммунных и психических расстройств в следующем порядке: рассеянный склероз, системная красная волчанка, шизофрения, биполярное расстройство [6]. Эти результаты согласуются с данными по ДНК-гидролизующей активности, представленными в исследовании 2021 года [2], и могут указывать на более высокую значимость аутоиммунного компонента в патогенезе шизофрении, в отличие от БАР. Тем не менее выявленный феномен каталитической активности при аффективных расстройствах требует дальнейшей оценки иммунологических нарушений у пациентов с БАР для определения его патогенетического значения и роли каталитических антител в развитии психических расстройств.

Работа поддержана грантом РФФ №21-75-00071.

ЛИТЕРАТУРА

1. *GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators.* (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. DOI:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7
2. *Gilden J., Kamperman A.M., Munk-Olsen T., Hoogendijk W.J.G., Kushner S.A., Bergink Vol.* Long-Term Outcomes of Postpartum Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J Clin Psychiatry*. 2020. V.10;81(2):19r12906. doi: 10.4088/JCP.19r12906.
3. *Benros M.E., Mortensen P.B.* Role of Infection, Autoimmunity, Atopic Disorders, and the Immune System in Schizophrenia: Evidence from Epidemiological and Genetic Studies // *Curr Top Behav Neurosci*. 2020. Vol. 44. P. 141–159. doi:10.1007/7854_2019_93. PMID: 30895532.

4. Ramesh R., Sundaresh A., Rajkumar R.P., Negi V.S., Vijayalakshmi M.A., Krishnamoorthy R., Tamouza R., Leboyer M., Kamalanathan A.S. DNA hydrolysing IgG catalytic antibodies: an emerging link between psychoses and autoimmunity // NPJ Schizophr. 2021. V.7, №13. doi: 10.1038/s41537-021-00143-6.

5. Parshukova D., Smirnova L., Kornetova E., Semke A., Buneva V., Ivanova S. IgG-Dependent Hydrolysis of Myelin Basic Protein of Patients with Different Courses of Schizophrenia // Journal of Immunology Research. 2020. Vol. 2020. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/8986521>

6. Parshukova D., Smirnova L.P., Ermakov E.A., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Autoimmunity and immune system dysregulation in schizophrenia: IgGs from sera of patients hydrolyze myelin basic protein // J Mol Recognit. 2019. V.32, №2. doi: 10.1002/jmr.2759.

ОТЯГОЩЁННЫЙ СЕМЕЙНЫЙ АНАМНЕЗ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

Е.Д. Касьянов

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Актуальность. Лица, по крайней мере, с одним кровным родственником с рекуррентным депрессивным расстройством (РДР) примерно в 2,8 раза чаще сами страдают данной патологией по сравнению с общей популяцией (Sullivan P.F. et al., 2000), а лица с биполярным аффективным расстройством (БАР) – до 19 раз (Smoller J.W. et al., 2003), что даёт возможность сделать предположение о генетическом характере семейной агрегации аффективных расстройств (АР). Однако классических семейных исследований АР в российской популяции ещё не проводилось. **Материал и методы.** В данном семейном кросс-секционном исследовании для верификации диагнозов у родственников пробандов с РДР и БАР (исследовательская группа – 36 семей) и родственников пробандов без каких-либо психических расстройств (группа сравнения – 23 семьи) использовалось Краткое международное нейропсихиатрическое интервью (MINI). Статистический анализ и визуализация данных проводились на языке программирования R в RStudio. **Результаты.** В общей сложности было исследовано 180 человек, из них: пробандов с АР n=36 (20%), родственников пробандов с АР n=68 (37,8%), пробандов без АР n=23 (12,8%), родственников пробандов без АР n=53 (29,4%). Отягощённый семейный анамнез смешанным фенотипом АР являлся значимым фактором риска для наличия диагноза ДЭ/РДР или БАР у пробандов ($p=0,001$, OR=9, ДИ 95% [2,6–30,8]). По результатам моделей, анализирующих РДР и БАР по отдельности, была выявлена та же тенденция: отягощённый семейный анамнез по РДР является значимым фактором риска для наличия соответствующего фенотипа ($p=0,001$, OR=6,3, ДИ 95% [3,43–24,1]), для пробандов с БАР отягощённый семейный анамнез по данному расстройству также является значимым фактором риска ($p=0,001$, OR=28,8, ДИ 95% [5,5–94,8]). **Заключение.** Результаты проведённого исследования подтвердили, что отягощённый семейный анамнез как смешанным фенотипом АР, так и РДР или БАР по отдельности являлся значимым фактором риска наличия диагноза РДР или БАР у пробандов.

Ключевые слова: депрессия, биполярное расстройство, аффективные расстройства, семейное исследование.

FAMILY HISTORY AS A RISK FACTOR FOR AFFECTIVE DISORDERS

E.D. Kasyanov

FSBI «V.M. Bekhterev NMRC PN» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Annotation

Persons with at least one relative with recurrent depressive disorder (RDD) are about 2.8 times more likely to suffer from this pathology themselves compared to the general population (Sullivan P.F. et al., 2000), and persons with bipolar affective disorder (BAD) – up to 19 times (Smoller J.W. et al., 2003), which makes it possible to make an assumption about the genetic nature of family aggregation of affective disorders (AD). However, classical family studies of AD in the Russian population have not yet been conducted. **Material and methods.** In this family cross-sectional study, a Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) was used to verify diagnoses in relatives of probands with RDD and BAD (research group – 36 families) and relatives of probands without any mental disorders (comparison group – 23 families). Statistical analysis and data

visualization were carried out in the R programming language in R Studio. **Results.** A total of 180 people were included, including: probands with AD n=36 (20%), relatives of probands with AD n=68 (37.8%), probands without AD n=23 (12.8%), relatives of probands without AD n=53 (29.4%). Burdened family history with a mixed AD phenotype was a significant risk factor for the diagnosis of RDD or BAD in probands ($p=0.001$, OR=9, CI 95% [2.6 - 30.8]). According to the results of models analyzing RDD and BAD separately, the same trend was revealed: a burdened family history of RDD is a significant risk factor for the presence of the corresponding phenotype ($p=0.001$, OR=6.3, CI 95% [3.43 - 24.1]), for probands with BAD, a burdened family history of this disorder is also a significant risk factor ($p=0.001$, OR=28.8, CI 95% [5.5 - 94.8]). **Conclusion.** The results of the study confirmed that a family history of AD was a significant risk factor for having a diagnosis of RDD or BAD in probands.

Key words: depression, bipolar disorder, affective disorders, family research.

Актуальность. Изучение семейного анамнеза психических расстройств – важная часть стандартного психиатрического опроса [1]. Поскольку депрессии часто регистрируются в семьях в различных поколениях, факт семейного отягощённого анамнеза (ОСА) имеет практическое значение в качестве возможного дополнительного диагностического критерия при дифференциальной диагностике, например, с биполярным аффективным расстройством (БАР) или шизофренией с кататоническими симптомами [2, 3]. В работах также активно используются данные по ОСА с целью гомогенизации выборки пациентов с депрессией для генетических и нейробиологических исследований [4–6]. Целесообразность таких подходов, применяемых в клинической практике и научных исследованиях, подкрепляют эпидемиологические данные: лица, по крайней мере, с одним кровным родственником с депрессией примерно в 2,8 раза чаще сами страдают данной патологией по сравнению с общей популяцией [7]. Более того, наиболее высокому риску развития депрессии подвержены потомки двух поколений, ранее страдавших от депрессии [8], что даёт возможность сделать предположение о генетическом характере семейной агрегации депрессии [9]. При этом нельзя недооценивать роль общих патогенных пре- и перинатальных, стрессовых, экологических и других средовых факторов в семьях [10–12].

Гипотеза. Аффективные расстройства имеют тенденцию агрегироваться в семьях среди кровных родственников.

Цель исследования – проанализировать отягощённый семейный анамнез по аффективным расстройствам у пациентов с РДР и БАР и пробандов без каких-либо психических расстройств.

Материал и методы

В данном семейном кросс-секционном исследовании с целью верификации диагнозов АР у родственников пробандов с РДР и БАР (исследовательская группа – 36 семей) и родственников пробандов без каких-либо психических расстройств (группа сравнения – 23 семьи) использовалось Краткое международное нейropsychиатрическое интервью (MINI). Каждый из участников проходил комплексное обследование по специально разработанной карте исследования, которая включала стандартные социо-демографические и антропометрические данные, сведения об отягощённом семейном анамнезе психическими расстройствами и соматическими заболеваниями, а также различные клинические характеристики аффективных расстройств.

С целью сравнения частоты выявления аффективных расстройств среди родственников пробандов с РДР и БАР (исследовательская группа – 36 семей) и родственников пробандов без каких-либо психических расстройств (группа сравнения – 23 семьи) были сформированы две основные группы.

Статистический анализ и визуализация данных проводились на языке программирования R (версия 4.0.2) в RStudio v1.4.1717. Для анализа категориальных переменных использовался критерий χ^2 Пирсона. Для определения факторов риска применялась бинарная логистическая регрессия с различными зависимыми и независимыми переменными.

Научное исследование одобрено независимым этическим комитетом при НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева (протокол №7, №ЭК-2013). Сбор материала для исследования производился на базе отделения транслационной психиатрии НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева.

Результаты

В общей сложности было исследовано 180 человек, из них: пробандов с АР n=36 (20%), родственников пробандов с АР n=68 (37,8%), пробандов без АР n=23 (12,8%), родственников пробандов без АР n=53 (29,4%). В группу для исследования было включено 36 семей с пробандами с диагнозами РДР 44,4% (n=16) и БАР 55,6% (n=20), а также их родственники как

первой степени родства 75% (n=51), так и второй – 25% (n=17). В группу сравнения было включено 23 семьи со здоровыми пробандами. У пробандов без аффективных расстройств были обследованы родственники только первой степени родства (n=53). Только у 25% (n=5) пробандов с БАР не былоотягощённого семейного анамнеза, в остальных случаях у пробандов с БАР были выявлены родственники с каким-либо аффективным расстройством. Доля пробандов с РДР без отягощённого семейного анамнеза составила 31,25% (n=5), во всех остальных случаях у пробандов с РДР также были выявлены родственники с каким-либо аффективным расстройством. Только у 12,5% (n=2) пробандов с РДР были выявлены родственники с подтверждённым диагнозом БАР, и только в 15% (n=3) семей пробандов с БАР были выявлены родственники с РДР. В контрольной группе в 21,7% семей (n=5) имелись родственники с аффективными расстройствами у пробандов без каких-либо психических расстройств.

С использованием бинарной логистической регрессии были построены модели, в которых согласно дизайну исследования предиктором выступал факт наличия у пробанда отягощённого семейного анамнеза по 1) любым аффективным расстройствам, 2) ДЭ/РДР, 3) БАР, а исходом – наличие или отсутствие у пробанда соответствующего диагноза аффективного расстройства; также во все модели в качестве ковариат включались пол и возраст.

Все анализируемые модели продемонстрировали факт агрегации аффективных расстройств в семьях. Так, отягощённый семейный анамнез смешанным фенотипом аффективных расстройств являлся значимым фактором риска для наличия диагноза ДЭ/РДР или БАР у пробандов ($p=0,001$, OR=9, ДИ 95% [2,6–30,8]). По результатам моделей, анализирующих ДЭ/РДР и БАР по отдельности, была выявлена та же тенденция: отягощённый семейный анамнез по ДЭ/РДР является значимым фактором риска для наличия соответствующего фенотипа ($p=0,001$, OR=6,3, ДИ 95% [3,43–24,1]), для пробандов с БАР отягощённый семейный анамнез по данному расстройству также является значимым фактором риска ($p=0,001$, OR=28,8, ДИ 95% [5,5–94,8]).

Заключение

Отягощённый семейный анамнез, как смешанным фенотипом аффективных расстройств, так и изолированным РДР или БАР, являлся значимым фактором риска наличия диагноза РДР или БАР у пробандов

ЛИТЕРАТУРА

1. Kendler K.S., Silberg J.L., Neale M.C. The family history method: whose psychiatric history is measured? // *Am. J. Psychiatry*. 1991. Vol. 148. P. 1501–1504.
2. Zimmerman M., McGlinchey J.B., Young D., Chelminski I. Diagnosing major depressive disorder VII: family history as a diagnostic criterion // *J Nerv Ment Dis*. 2006 Sep;194(9):704-7. doi: 10.1097/01.nmd.0000235778.20925.12. PMID: 16971823]
3. American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed). Washington DC: American Psychiatric Association.
4. Касьянов Е.Д., Мазо Г.Э., Кибитов А.О. Роль семейных исследований в изучении нейробиологического базиса депрессивных расстройств // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019. Т. 2. С. 70–76. doi: 10.17116/jnevro201911902170. [Kasyanov ED, Mazo GE, Kibitov AO. The role of family studies in research of neurobiological basis of depressive disorders. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* [Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov]
5. Nierenberg A.A., Trivedi M.H., Fava M., Biggs M.M., Shores-Wilson K., Wisniewski S.R., Balasubramani G.K., Rush A.J. Family history of mood disorder and characteristics of major depressive disorder: a STAR*D (sequenced treatment alternatives to relieve depression) study // *J Psychiatr Res*. 2007 Apr-Jun;41(3-4):214-21. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.02.005.
6. Yalu W., Alexandra B., Qing L. Risk Prediction Modeling on Family-Based Sequencing Data Using a Random Field Method // *Genetics*. 2017. Vol. 207, no. 1: 63–73 <https://doi.org/10.1534/genetics.117.19975>
7. Sullivan P.F., Neale M.C., Kendler K.S. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 2000 Oct;157(10):1552-62. doi: 10.1176/appi.ajp.157.10.1552. PMID: 11007705
8. Talati A., Weissman M.M., Hamilton S.P. Using the high-risk family design to identify biomarkers for major depression // *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol Sci*. 2013. Vol. 368, N 1615. doi: 10.1098/rstb.2012.0129
9. Flint J., Kendler K.S. The Genetics of Major Depression // *Neuron*. 2014. Vol. 81. P. 484–503.
10. Zhao L.P., Hsu L., Davidov O., Potter J. Population-based family study designs: an interdisciplinary research framework for genetic epidemiology // *Genet. Epidemiol*. 1997. Vol. 14. P. 365–388.
11. Srinivasan R., Pearson R.M., Johnson S., Lewis G. Maternal perinatal depressive symptoms and offspring psychotic experiences at 18 years of age: a longitudinal study // *Lancet Psychiatry*. 2020 May; 7(5):431-440. doi: 10.1016/S2215-0366(20)30132-2. PMID: 32353278.
12. Касьянов Е.Д., Мазо Г.Э., Кибитов А.О. В поисках «наследственных» форм депрессии: клинические, генетические и биологические подходы // *Социальная и клиническая психиатрия*. 2018. Т. 28, № 1. С. 62–70.

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА CD45+ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

**Д.Г. Кулабухова^{1,2}, А.К. Емельянов^{1,2}, Т.С. Усенко^{1,2}, М.А. Николаев^{1,2},
К.А. Сенкевич², А.Э. Копытова¹, А.О. Лавринова¹, П.А. Андоскин¹,
А.А. Тюрин², И.В. Милюхина^{2,3}, С.Н. Пчелина^{1,2}**

НИЦ «Курчатовский Институт» – ПИЯФ, Гатчина¹
ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург²
ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург³

Аннотация

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, обусловленное гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга. Нейродегенерацию при БП связывают с накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина, а уровень альфа-синуклеина периферических жидкостей и тканей рассматривается как возможный биомаркер развития БП. Показано, что при БП уровень провоспалительных цитокинов в крови повышен, что может также способствовать агрегации альфа-синуклеина. В то же время уровень провоспалительных цитокинов коррелирует со степенью когнитивных нарушений при нейродегенеративных заболеваниях. Следует отметить, что при GBA-БП когнитивные нарушения встречаются чаще, чем при других формах БП. В настоящей работе мы оценили уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров периферической крови пациентов с БП с деменцией и пациентов с умеренными когнитивными нарушениями (GBA-БП). В исследование включили 13 пациентов с GBA-БП, 26 пациентов с БП с деменцией (БПД), 126 пациентов со спорадической формой БП (сБП) и 144 индивидуума контрольной группы. CD45+ мононуклеары были получены из цельной периферической крови с последующим магнитным сортированием. Уровень альфа-синуклеина был оценен методом ИФА с использованием набора Human alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США). Нами показано, что у пациентов с GBA-БП, сБП и БПД повышен уровень альфа-синуклеина в CD45+ мононуклеарах периферической крови по сравнению с контрольной группой ($p = 0,002$, $p = 0,0001$ и $p = 0,0001$ соответственно). Таким образом, уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров крови повышен у пациентов с БП по сравнению с контролем и не зависит от формы заболевания и наличия когнитивной патологии.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, GBA, альфа-синуклеин, CD45+ моноциты, когнитивные нарушения.

INCREASED OF ALPHA-SYNUCLEIN LEVEL IN CD45+ MONONUCLEAR CELLS IN BLOOD FROM PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

**D.G. Kulabukhova^{1,2}, A.K. Emelyanov^{1,2}, T.S. Usenko^{1,2}, M.A. Nikolaev^{1,2},
K.A. Senkevich², A. E. Kopytova¹, A.O. Lavrinova¹, P.A. Andoskin¹,
A.A. Tyurin², I.V. Miliukhina^{2,3}, S.N. Pchelina^{1,2}**

NRC «Kurchatov Institute» – PNPI, Gatchina¹
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg²
N.P. Behtereva Institute of the Human Brain of the RAS, St. Petersburg³

Annotation

Parkinson's disease (PD) – is the common neurodegenerative disorder, associated with the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Neurodegeneration in PD is associated with accumulation and aggregation of alpha-synuclein protein. PD patients have high level of pro-inflammatory cytokines in plasma, that could influence on alpha-synuclein aggregation. The level of pro-inflammatory cytokines also correlated with stages of cognitive dysfunction. Patients with PD, associated with mutations in GBA gene (GBA-PD) have more expressed cognitive dysfunction. In our work we evaluated alpha-synuclein level in CD45+ blood cells from patients with PD with dementia or cognitive dysfunction (GBA-PD). 13 patients with GBA-PD, 126

patients with sporadic form of PD, 26 patients with PD with dementia (PDD) and 144 controls were included in the study. CD45+ blood cells were separated using the magnetic hand separator MACS (Miltenyi Biotec, USA) and miniMACS columns MS (Miltenyi Biotec, USA). The level of alpha-synuclein was estimated by ELISA with Human Alpha-Synuclein ELISA kit (Invitrogen, USA) and normalized to total protein. Comparisons of medians were made using Mann-Whitney test. The level of significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was carried out using SPSS 12.0. In this work we showed that alpha-synuclein level in CD45+ blood cells was higher in GBA-PD, PD, PDD compared to controls ($p = 0,002$, $p = 0,0001$, $p = 0,0001$, respectively). Alpha-synuclein level was higher in PD patients compared to controls and is not affected by cognitive dysfunction.

Key words: Parkinson's disease, GBA, alpha-synuclein, CD45+ mononuclear blood cells, cognitive dysfunctions.

Актуальность. Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание. Патогенез БП связывают с накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина, что приводит к гибели дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. В основном БП проявляется как расстройство движения, характерными симптомами которого являются тремор покоя, брадикинезия, постуральная неустойчивость и мышечная ригидность, однако у пациентов с БП также проявляется и широкий спектр когнитивных нарушений, которые могут прогрессировать вплоть до деменции [1]. Известно, что в течение 20 лет с постановки диагноза БП деменция развивается у 83 % пациентов [2].

На риск развития БП оказывают влияние различные факторы, в том числе и генетические. В частности, мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) встречаются у 4-5 % пациентов с БП и повышают риск развития БП в 6–8 раз [3,4]. Носительство мутаций в гене *GBA* приводит к сниженной активности глюкоцереброзидазы даже при гетерозиготном носительстве [5]. Существует предположение, что сниженная активность *GBA* и последующая дисфункция лизосом приводит к нарушению транспорта, накоплению и агрегации альфа-синуклеина, что повышает риск развития БП. Известно, что в клинической картине течения БП у пациентов с мутациями в гене *GBA* (GBA-БП) когнитивные нарушения наблюдаются чаще, чем при других формах БП [6].

Альфа-синуклеин – небольшой пресинаптический белок, который является основным компонентом патологических включений (телец Леви) при БП и других синуклеинопатиях. Уровень альфа-синуклеина СМЖ и плазмы крови был рассмотрен в качестве возможного биомаркера для БП, однако исследования последних лет показали его существенную зависимость от степени гемолиза, поскольку в эритроцитах крови содержание альфа-синуклеина существенно выше по сравнению с другими клетками крови [7]. Ранее нами показано повышение уровня альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров крови у пациентов с сБП с отсутствием когнитивных нарушений [8]. Однако уровень альфа-синуклеина при БП, характеризующейся наличием деменции, остается неизвестным. Поиск биомаркера развития когнитивных нарушений при БП является актуальной проблемой и будет способствовать своевременной терапии данной симптоматики.

Цель исследования – оценка уровня альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров периферической крови пациентов с БП с деменцией и пациентов с умеренными когнитивными нарушениями (GBA-БП).

Материал и методы

В исследование были включены группы пациентов с GBA-БП, спорадической формой БП (сБП), пациенты с БП с деменцией (БПД) и здоровые индивидуумы контрольной группы. Клинические характеристики групп представлены в таблице.

Таблица

Клинические характеристики исследуемых групп

Характеристика/Группа	GBA-БП N = 13	БПД N = 26	сБП N = 126	Контроль N = 144
Пол, м, %	5, 38,46	10, 38,4%	47, 35,88	53, 36,05
Возраст, лет	63 ± 11,9	74,2 ± 6,1	63,5 ± 9,4	62,3 ± 8,1
Возраст начала заболевания, лет	58 ± 12,7	67 ± 7,8	59,2 ± 10,4	–
Стадия заболевания по Хен-Яру	2,15 ± 0,6	2,6 ± 0,3	1,8 ± 0,6	–

CD45+ мононуклеары были получены из 10 мл цельной периферической крови с использованием центрифугирования на градиенте фиколла ($p = 1.077$, GE Healthcare UK Limited, UK)

с последующим проведением магнитного сортирования с использованием CD45+ MicroBeads и колонок miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США). Далее клетки лизировали с помощью набора Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore, США)). Общая концентрация белка измерялась с помощью набора Pierce BSA Protein Assay (ThermoScientific, USA). Уровень альфа-синуклеина в CD45+ мононуклеарах определяли методом ИФА с помощью набора Human alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США), выравненные по 6 мкг общего белка.

Для оценки различий между группами использовался тест Манна-Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Статистический анализ выполнялся с использованием программного обеспечения SPSS 12.0. Клинические и экспериментальные данные выражаются как среднее \pm стандартное отклонение и медиана (min-max), соответственно.

Результаты

В ходе работы мы оценили уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров периферической крови в группах пациентов с ГВА-БП, сБП, БПД и в контроле. Показано, что у пациентов с ГВА-БП, сБП и БПД повышен уровень альфа-синуклеина с CD45+ мононуклеарах периферической крови, в сравнении с контрольной группой ($p = 0,002$, $p = 0,0001$ и $p = 0,0001$ соответственно). Медианные значения концентрации альфа-синуклеина составили: 12,91 (2,92 – 37,52) нг/мл у пациентов с ГВА-БП, 12,9 (0,43 – 36,02) нг/мл у БПД, 10,61 (0,63 – 46,2) нг/мл у пациентов с сБП и 6,56 (0,46 – 27,36) в контрольной группе (рис. 1).

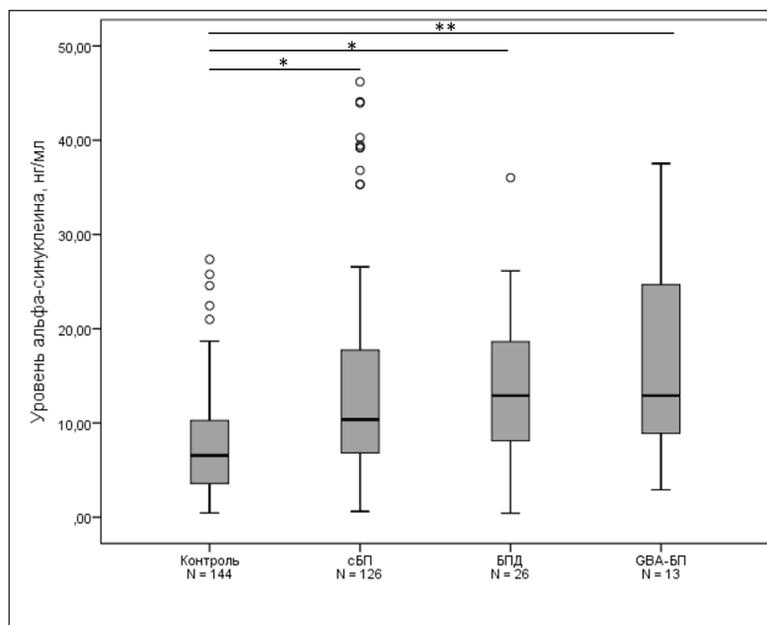


Рис. 1. Уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров периферической крови в группах пациентов с ГВА-БП, сБП, БПД и контроле. * $p=0,0001$, ** $p=0,002$

Заключение

Альфа-синуклеин периферических клеток крови ранее многократно рассматривался в качестве биомаркера развития БП. Следует, однако, отметить, что в настоящее время считается, что уровень данного белка в плазме крови не может являться маркером заболевания, в частности, ввиду того что степень гемолиза эритроцитов влияет на уровень альфа-синуклеина плазмы крови [7]. В настоящем исследовании мы оценивали уровень альфа-синуклеина в клеточной популяции мононуклеаров периферической крови, полученной методом магнитного сортирования, что позволило избежать фактора контаминации данной фракции примесью эритроцитов.

В исследование вошли две группы пациентов – с деменцией, группа БПД (выраженные когнитивные нарушения), и группа ГВА-БП, в которой ранее нами также показаны умеренные когнитивные нарушения [6]. Многократно показано, что когнитивные нарушения характеризуются увеличением уровня провоспалительных цитокинов [9]. Нами и другими авторами ранее показано увеличение концентрации провоспалительных цитокинов плазмы крови в группе ГВА-БП [10]. Несмотря на то, что последние данные указывают на влияние воспаления на уровень альфа-синуклеина [11], нами не выявлено различий в уровне альфа-синуклеина CD45+ клеток крови в зависимости от формы заболевания.

Уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров крови повышен при БП и не зависит от наличия деменции.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ №19-15-00315.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aarsland D., Creese B., Politis M. et al. Cognitive decline in Parkinson disease // *Nat Rev Neurol*. 2017. Vol. 13, № 4. P. 217–231.
2. Козак В.В. Определение риска деменции при болезни Паркинсона: возможности и перспективы // *Журнал неврологии и психиатрии* им. С.С. Корсакова. 2019. Т.119, №6. С. 137–143.
3. Emelyanov A., Usenko T., Nikolaev M. et al. Increased α -Synuclein Level in CD45+ Blood Cells in Asymptomatic Carriers of GBA Mutations // *Mov Disord*. 2021. Vol. 36, №8. P. 1997–1998.
4. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C. et al. Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set // *Neurobiology of Aging*. 2018. Vol. 71. P. 272.
5. Schapira A.H. Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances // *Mol Cell Neurosci*. 2015. Vol. 66 (Pt A). P. 37–42.
6. Сенкевич К.А., Милохина И.В., Белецкая М.В., Грачева Е.В., Кудреватых А.В., Николаев М.А., Емельянов А.К., Копытова А.Э., Тимофеева А.А., Якимовский А.Ф., Пчелина С.Н. Клинические особенности болезни Паркинсона у пациентов с мутациями и полиморфными вариантами гена *GBA* // *Журнал неврологии и психиатрии* им. С.С. Корсакова. 2017. Vol. 117, № 10. P. 81–86.
7. Ganguly U., Singh S., Pal S., Prasad S., Agrawal B.K., Saini R.V., Chakrabarti S. Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough // *Front Aging Neurosci*. 2021. V.13. P. 702–639.
8. Emelyanov A., Andoskin P., Pchelina S. Dataset of total, oligomeric alpha-synuclein and hemoglobin levels in plasma in Parkinson's disease // *Data in Brief*. 2016, 10:182–185.
9. King E., O'Brien J., Donaghy P. et al. Inflammation in mild cognitive impairment due to Parkinson's disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease // *Int J Geriatr Psychiatry*. 2019. Vol. 34, №8. P. 1244–1250.
10. Милохина И.В., Усенко Т.С., Сенкевич К.А., Николаев М.А., Тимофеева А.А., Агапова Е.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Тотолян А.А., Пчелина С.Н. Цитокиновый профиль плазмы крови пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019. Т. 168, № 10. С.404–408.
11. Kasen A., Houck C., Burmeister A.R., Sha Q., Brundin L., Brundin P. Upregulation of α -synuclein following immune activation: Possible trigger of Parkinson's disease // *Neurobiol Dis*. 2022. Vol. 166. P. 105654.

ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТЫ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ ЛИТИЯ В ОТНОШЕНИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ БИПОЛЯРНЫМ АФФЕКТИВНЫМ РАССТРОЙСТВОМ

И.С. Лосенков¹, Е.В. Плотников^{1,2}, Е.В. Епимахова¹

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

В настоящее время ведется разработка и изучение новых соединений лития с комбинированным цитопротекторным и нормотимическим эффектами. Перспективными в этом отношении являются органические соли лития на основе кислот-метаболитов клеточного энергообмена. Целью исследования явилась оценка цитопротекторного и антиоксидантного эффектов карбоната, фумарата, пирувата и сукцината лития в отношении мононуклеаров периферической крови больных биполярным аффективным расстройством (БАР). Венозная кровь для последующего выделения клеток взята у 19 пациентов с БАР. Полученные мононуклеары инкубировали в течении 24 ч с карбонатом, фумаратом, пируватом либо сукцинатом лития в концентрации 1,2 ммоль/л. Мононуклеары инкубировали с солями лития как в присутствии, так и без гидроперекиси третбутила (ГПТБ). Уровень окислительного стресса (процент клеток с активными формами кислорода) и долю клеток, подвергшихся клеточной гибели (ранний и поздний апоптоз/некроз), оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Статистическая обработка проведена с помощью программы SPSS (версия 20.0). Рассчитывали медиану, первый и третий квартили. Для сравнения количественных переменных использовались критерии Манна-Уитни. По результатам эксперимента инкубация мононуклеаров больных с ГПТБ приводила к статистически достоверному увеличению доли клеток, находящихся на стадиях как раннего, так и позднего апоптоза/некроза. Также содержание клеток с активными формами кислорода, культивированных с ГПТБ, было статистически достоверно выше значений в контроле. При добавлении в культуральную среду солей лития было отмечено наиболее выраженное цитопротекторное действие пирувата лития: снижение доли мононуклеаров в ранней и поздней стадиях апоптоза/некроза. Помимо этого, пируват лития приводил к достоверному снижению содержания мононуклеаров с активными формами кислорода. Таким образом, представленные выше экспериментальные данные демонстрируют антиоксидантное действие пирувата лития и его цитопротекторные свойства в отношении мононуклеаров периферической крови больных БАР в условиях окислительного стресса. Получен-

ные результаты могут лечь в основу разработки нормотимиков, обладающих цитопротекторными и антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: литий, соли лития, пируват, биполярное аффективное расстройство, цитопротекция, окислительный стресс.

CYTOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF ORGANIC LITHIUM SALTS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH BIPOLAR DISORDER

I.S. Losenkov¹, E.V. Plotnikov^{1,2}, E.V. Epimakhova¹

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia¹

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia²

Abstract

Nowadays, new lithium compounds with combined cytoprotective and mood-stabilizing effects are being developed and studied. Organic lithium salts based on acid-metabolites of cellular energy homeostasis are promising in this respect. The aim of the study was to evaluate the cytoprotective and antioxidant effects of lithium carbonate, fumarate, pyruvate and succinate in relation to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with bipolar disorder (BD). Venous blood for subsequent cell isolation was taken from 19 patients with BD. The resulting cells were incubated for 24 hours with carbonate, fumarate, pyruvate, or lithium succinate at a concentration of 1.2 mmol/l. PBMCs were incubated with salts both in the presence and without tert-butyl hydroperoxide (TPHB). The level of oxidative stress (cells with reactive oxygen species, ROS) and proportion of cells undergoing cell death was assessed by flow cytometry. Statistical processing was carried out using the SPSS program (version 20.0). The median, first and third quartiles were calculated. The Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables. According to the experiment, incubation of PBMCs with TPHB led to a statistically significant increase in the proportion of cells at the stages of both early and late apoptosis/necrosis and content of cells with ROS. When organic lithium salts were added to the culture medium, the most pronounced cytoprotective effect of lithium pyruvate was found: a decrease in the proportion of mononuclear cells in the early and late stages of apoptosis/necrosis. In addition, lithium pyruvate led to a significant decrease in the content of cells with ROS. Thus, the experimental data presented above demonstrate the antioxidant effect of lithium pyruvate and its cytoprotective properties in relation to PBMCs of patients with BD under conditions of oxidative stress. The results obtained can form the basis for the development of mood-stabilizing drugs with cytoprotective and antioxidant properties.

Key words: lithium, lithium salts, pyruvate, bipolar disorder, cytoprotection, oxidative stress.

Актуальность. В настоящее время существует большое количество лекарственных средств, используемых для психофармакотерапии аффективных расстройств. Новый взгляд на химическую структуру классических препаратов является перспективным в отношении обнаружения их новых терапевтических свойств помимо собственно психотропного действия. Нормотимик литий используется в клинической психофармакологии вот уже более 70 лет, однако его применение ограничено ввиду низкой терапевтической широты и высокой частоты развития побочных эффектов. В настоящее время литий, в частности его карбонатная соль, широко применяется для лечения и профилактики биполярного аффективного расстройства (БАР) [1]. Карбонат лития – наиболее часто используемая в клинической психофармакологии химическая форма лития. В этом случае карбонат-анион (CO_3^{2-}) является биологически пассивным лигандом. Мы предполагаем, что новый класс соединений, образованных в результате замещения CO_3^{2-} анионными остатками кислот-клеточных метаболитов, участвующих в энергетическом обмене, будет обладать комбинированным нормотимическим и цитопротекторным эффектами. В соответствии с этой гипотезой были выбраны следующие кислоты: фумаровая, янтарная (субстраты цикла Кребса) и пировиноградная (предшественник ацетилкофермента А (ацетил-КоА)). Ранее нами продемонстрированы антиоксидантный [2–4], иммуностимулирующий [5] и цитопротекторный эффекты данных солей [4–6]. В настоящее время показано, что для БАР характерна активация окислительного стресса, в частности увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови [7]. Это позволяет предположить, что создание новых препаратов лития, обладающих

цитопротекторной и антиоксидантной активностью, и включение их в комплекс терапии больных депрессивными расстройствами может быть полезным и перспективным.

Цель исследования – изучение цитопротекторных и антиоксидантных свойств органических солей лития на основе кислот-метаболитов цикла Кребса (фумарат лития, сукцинат лития, пируват лития) на клеточной модели мононуклеаров периферической крови больных БАР.

Материал и методы

В исследуемую группу вошли 19 пациентов с БАР, проходивших лечение в клинике НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, из них 11 женщин и 8 мужчин (медиана возраста – 48.0 (37.5–52.0)). Выделение мононуклеаров осуществлялось методом центрифугирования на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$ г/см³; Sigma-Aldrich, Германия). Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640. После приготовления суспензию клеток сразу использовали в эксперименте. Для моделирования окислительного стресса и цитотоксичности была использована гидроперекись третичного бутила (ГПТБ) в концентрации 50 мкмоль/л. Помимо этого клетки инкубировали с пируватом, сукцинатом и фумаратом лития в конечной концентрации ионов лития 1,2 ммоль/л. Мононуклеары инкубировали с солями лития как в присутствии, так и без ГПТБ. Уровень окислительного стресса определяли на проточном цитофлюориметре «Muse Cell Analyzer» (Merck, Германия) с использованием набора реагентов «Oxidative stress» (Merck, Германия). Долю клеток, подвергшихся клеточной гибели, оценивали методом проточной цитофлюориметрии с использованием набора реактивов «Annexin V & Dead Cell Assay Kit» (Merck, Германия). Статистическая обработка результатов проведена с помощью программы SPSS (версия 20.0). Рассчитывали медиану, первый и третий квартили. Для сравнения количественных переменных использовались критерии Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

По результатам эксперимента инкубация мононуклеаров периферической крови больных депрессивными расстройствами с гидроперекисью третичного бутила приводила к статистически достоверному увеличению доли клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, по сравнению с контрольными значениями (46,22 (38,68–49,0)% и 23,75 (20,62–26,20)% соответственно, $p = 0,011$) и к статистически достоверному увеличению доли клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза/некроза, по сравнению с контрольными значениями (41,65 (20,44–50,31)% и 2,50 (1,59–3,37)% соответственно, $p = 0,010$) (рис. 1). Также содержание клеток с активными формами кислорода, культивированных с ГПТБ, было статистически достоверно выше значений в контроле (70,03 (60,99–77,68)% и 7,9 (6,30–10,50) % соответственно, $p < 0,001$) (рис. 2).

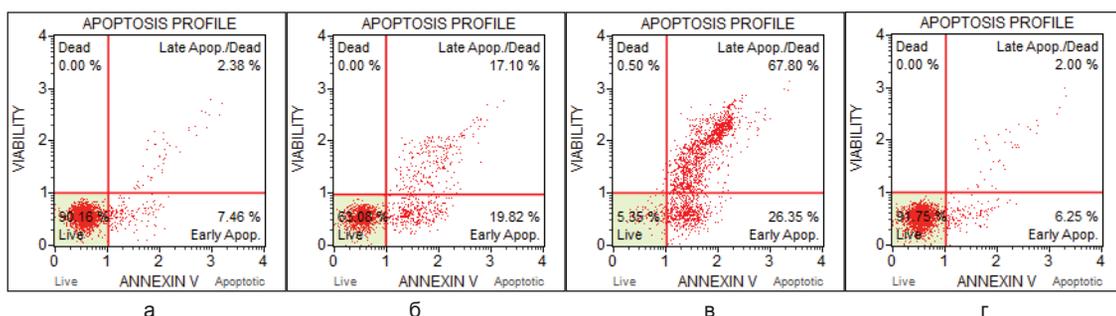


Рис. 1. Цитопротекторный эффект пирувата лития: (а) интактная культура, (б) культура в присутствии ГПТБ, (в) культура в присутствии пирувата лития, (г) культура в присутствии пирувата лития и ГПТБ

При добавлении в культуральную среду органических солей лития (фумарат, сукцинат и пируват лития) было отмечено наиболее выраженное цитопротекторное и антиоксидантное действие пирувата лития. Так, в клетках, подвергнутых действию ГПТБ, пируват лития статистически достоверно снижал долю мононуклеаров в ранней стадии апоптоза (36,572 (30,13–44,39)%) по сравнению с инкубацией в тех же условиях без добавления соли (46,22 (38,68–49,0)%, $p = 0,025$) и статистически достоверно уменьшал процент мононуклеаров в поздней стадии апоптоза/некроза (12,80 (8,06–17,25)%) по сравнению с инкубацией в тех же условиях без добавления соли (41,65 (20,44–50,31)%, $p = 0,011$) (рис. 1). Пируват лития приводил к достоверному снижению содержания мононуклеаров с активными формами

кислорода (29,80 (17,90–43,33)%), по сравнению с инкубацией в тех же условиях без добавления соли (70,03 (60,99–77,68)%, $p=0,001$) (рис. 2).

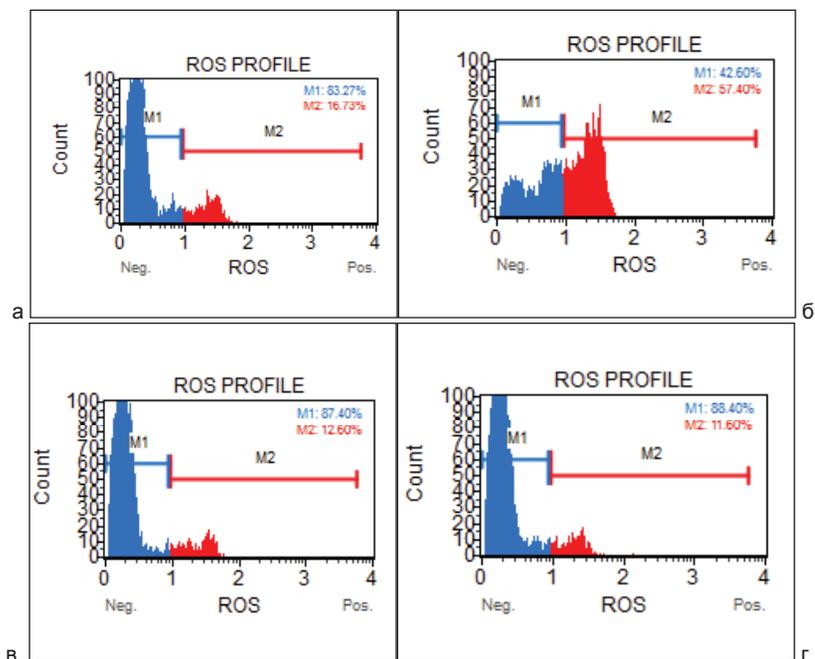


Рис. 2. Содержание активных форм кислорода (ROS) (а), в присутствии пирувата лития (б), в присутствии ГПТБ (в), в присутствии пирувата лития и ГПТБ (г). Гейт M1 – ROS-негативные клетки, гейт M2 – ROS-позитивные клетки

Обсуждение

Как видно из результатов эксперимента, цитопротекторный эффект пирувата лития обусловлен его антиоксидантными свойствами. Можно предположить, что данное соединение, по своей химической структуре не являясь антиоксидантом, обладает иным механизмом ингибирования окислительного стресса. Пируват является начальным звеном в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) и служит субстратом для образования ацетил-кофермента А, принимающего участие, помимо цикла Кребса, в синтезе жирных кислот и холестерина. Данная информация может объяснить эффективность пирувата против окислительного повреждения: стабилизации митохондриального метаболизма и предотвращения чрезмерной продукции и «утечки» активных форм кислорода. В то же время пируват может способствовать репарации клеток через синтез жирных кислот и холестерина как ключевых компонентов мембран.

Заключение

Таким образом, представленные выше экспериментальные данные демонстрируют антиоксидантное действие пирувата лития и его цитопротекторные свойства в отношении мононуклеаров периферической крови больных БАР в условиях окислительного стресса. Полученные результаты могут лечь в основу разработки нормотимиков, обладающих цитопротекторными и антиоксидантными свойствами.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20045) «Действие органических солей лития на клетки и плазму крови больных с расстройствами аффективного спектра и синдромом зависимости».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лосенков И.С., Плотников Е.В., Епимахова Е.В., Бохан Н.А. Литий в психофармакологии аффективных расстройств и механизмы его эффектов на клеточную физиологию // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2020. Т. 120, № 11. С. 108–115.
2. Plotnikov E., Prokopenko V., Yarygina E., Losenkov I. Lithium ascorbate as a protector of human blood biomolecules under ethanol impact // National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. 2018. Vol. 8, № 1. P.82–86.
3. Sazhina N., Plotnikov E., Korotkova E., Dorozhko E., Voronova O. Electrochemical oxidability of antioxidants: synergism and antagonism in mixes // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2018. Vol. 10, № 2. P. 60–65.
4. Plotnikov E., Losenkov I., Epimakhova E., Bohan N. Protective effects of pyruvic acid salt against lithium toxicity and oxidative damage in human blood mononuclear cell // Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2019. V 9, № 2. P. 302–306.

5. Ветлугина Т.П., Етимахова Е.В., Савочкина Д.Н., Плотников Е.В., Бойко А.С., Иванова С.А., Бохан Н.А. Оценка влияния солей лития на продукцию цитокинов клетками крови в опытах *in vitro* // Бюллетень сибирской медицины. 2021. Т. 20, № 3. С. 21–28.
6. Ветлугина Т.П., Прокопьева В.Д., Плотников Е.В., Ярыгина Е.Г., Лебедева В.Ф., Бохан Н.А. Повреждение эритроцитов и макромолекул плазмы крови у больных алкоголизмом и мембранопротекторный эффект солей лития // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021. Т. 65, № 2. С. 22–29.
7. Sigitova E. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder // *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017. Vol. 71, № 2. P. 77–103.

ОЦЕНКА УРОВНЯ БЕЛКА S-100B У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ С СУИЦИДАЛЬНЫМ РИСКОМ

И.А. Меднова, В.И. Герасимова, А.А. Гончарова

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

В статье представлены результаты исследования концентраций белка S-100B в сыворотке крови пациентов с шизофренией в зависимости от наличия суицидальных попыток в анамнезе. Актуальность данного исследования обусловлена высокой распространенностью суицидальных попыток при шизофрении, что приводит к существенному снижению ожидаемой продолжительности жизни больных. S-100B является нейроспецифическим кальций-связывающим белком, который рассматривается в качестве сывороточного маркера повреждения астроцитов. В исследование было включено 87 пациентов с диагнозом шизофрения (F20, МКБ-10), подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Наличие суицидальных попыток в анамнезе оценивали на основании клинического интервью с пациентом и его родственниками, а также на основании сведений из медицинской документации. Степень суицидального риска оценивали с помощью шкалы безнадёжности Бека. У пациентов утром натощак отбирали образцы крови для получения сыворотки. Уровень белка S-100B в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов DY1820-05 Human S100B DuoSet ELISA производства «R&D Systems» (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета стандартных прикладных программ SPSS Statistic 23 для Windows. Согласно полученным результатам у больных шизофренией, получавших антипсихотическую терапию более 5 лет и имевших в анамнезе суицидальные попытки, уровень S-100B был выше, чем у лиц, не совершавших попытки суицида.

Ключевые слова. S-100B, нейродегенерация, шизофрения, суицидальное поведение.

EVALUATION OF S-100B PROTEIN LEVEL IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA WITH SUICIDAL RISK

I.A. Mednova, V.I. Gerasimova, A.A. Goncharova

Mental Health Research Institute Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Annotation

The article presents the results of a study of S-100B protein concentrations in the blood serum of patients with schizophrenia, depending on the presence of a history of suicide attempts. The relevance of this study is due to the high prevalence of suicidal attempts in schizophrenia, which leads to a significant decrease in the life expectancy of patients. S-100B is a neurospecific calcium-binding protein that is considered as a serum marker of astrocyte damage. The study included 87 patients diagnosed with schizophrenia (F20, ICD-10) who signed a voluntary informed consent to participate in the study. The presence of a history of suicide attempts was assessed on the basis of a clinical interview with the patient and his relatives, as well as on the basis of information from medical records. The degree of suicidal risk was assessed using the Beck Hopelessness Scale. In patients in the morning on an empty stomach, blood samples were taken to obtain serum. The level of S-100B protein in blood serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay using DY1820-05 Human S100B DuoSet ELISA kits manufactured by R&D Systems (USA). Statistical data processing was performed using the SPSS Statistic 23 standard software package for Windows. According to the results obtained, in patients with schizophrenia who received antipsychotic therapy for more than 5

years and who had a history of suicide attempts, the level of S-100B was higher than in individuals who did not attempt suicide.

Key words: S-100B, neurodegeneration, schizophrenia, suicidal behavior.

Актуальность. Шизофрения является многофакторным психическим заболеванием с прогрессивным, хроническим течением. Ожидаемая продолжительность жизни пациентов с шизофренией в несколько раз ниже, чем в общей популяции лиц без психических расстройств, что преимущественно обусловлено смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний и суицидов [1]. По данным исследований последних лет, распространенность суицидальных попыток у больных шизофренией в течение всей жизни составляет до 25–50% [2]. В качестве факторов риска суицида при шизофрении обсуждается ряд социальных и клинических факторов, таких как длительность заболевания, нарушение когнитивных функций, социальная адаптация, депрессивная симптоматика, употребление наркотических веществ, алкоголя и табака и др. [2–5]. Риск суицидальных попыток при шизофрении может быть оценен с помощью шкалы безнадежности Бека, поскольку безнадежность, являясь одним из признаков тяжести депрессивных проявлений, оказывает значительное влияние на осознание пациентом болезни, понимание ее последствий. Количество попыток незавершенного суицида также рассматривается в качестве маркера суицидального риска [6]. Биологические паттерны суицидального поведения при шизофрении остаются неопределенными. Обнаружены изменения экспрессии ряда генов астроцитов и микроглии в префронтальной коре больных шизофренией, закончивших жизнь самоубийством [7]. В качестве сывороточного маркера повреждения астроцитов рассматривается нейроспецифический кальций-связывающий белок S-100B. Продемонстрировано снижение уровня данного маркера у пациентов с коморбидным течением алкогольной зависимости и текущим депрессивным синдромом [8]. Сывороточные уровни S100 β были значительно выше и коррелировали с тяжестью суицидальных мыслей у подростков с психозом или расстройствами настроения [9].

Цель исследования – оценка содержания белка S-100B у больных шизофренией в зависимости от суицидального риска.

Материал и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о правах пациента. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В исследование было включено 87 пациента (43 женщины и 44 мужчины) с диагнозом шизофрения (F20, МКБ-10). Средний возраст составил 38,5 \pm 11 лет. Наличие суицидальных попыток в анамнезе оценивали на основании клинического интервью с пациентом и его родственниками, а также на основании сведений из медицинской документации. Степень суицидального риска оценивали с помощью шкалы безнадежности Бека. Материалом для исследования явилась сыворотка крови. У пациентов отбирали кровь из локтевой вены утром натощак в пробирки BD Vacutainer с активатором свертывания. Уровень S-100B в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов DY1820-05 Human S100B DuoSet ELISA (R&D Systems, США). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS Statistic (версия 23.0). На первом этапе проверяли соответствие выборки нормальному закону распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. На втором этапе оценивали статистическую значимость различий несвязанных выборок с использованием U-критерия Манна–Уитни. Корреляцию между количественными показателями оценивали с использованием критерия Пирсона. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Медиана балла по шкале безнадежности Бека составила 5 (2–8) баллов. Статистически значимых корреляций между уровнем S100B и баллами по шкале Бека не было обнаружено ($p = 0,379$). Пациенты были разделены на две группы: у 30 человек были суицидальные попытки в анамнезе, и у 57 ранее не было зарегистрировано попыток суицида. Уровень S100B статистически значимо не различался у пациентов из двух исследуемых групп ($p = 0,362$). Однако у лиц с длительностью шизофрении более 5 лет, совершавших попытки суицида, отмечали повышение концентрации S100B в сыворотке крови ($p = 0,028$ при сравнении с показателем у больных шизофренией длительностью более 5 лет, не совершавших попытки суицида). В то же время у лиц с длительностью заболевания менее 5 лет не выявили

статистически значимых различий концентрации исследуемого маркера в сыворотке крови пациентов, совершавших и не совершавших попытку суицида (рис. 1).

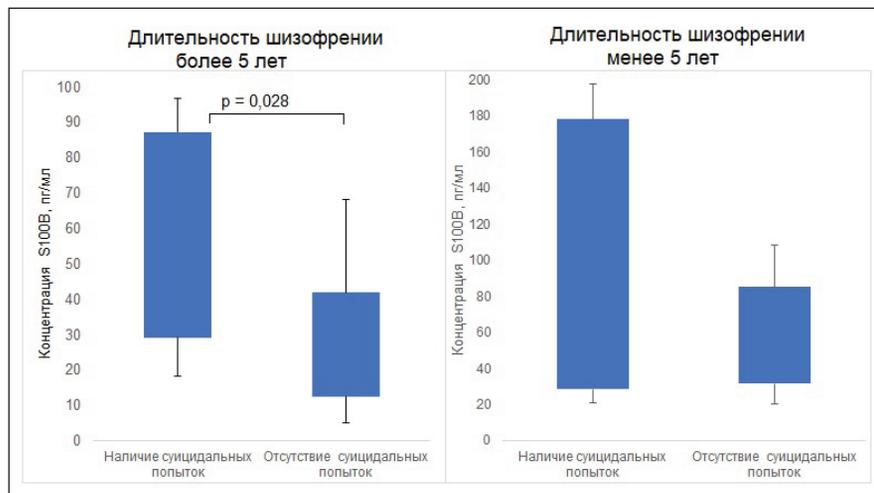


Рис. 1. Уровень S100B в сыворотке крови больных шизофренией с длительностью заболевания до/после 5 лет в зависимости от наличия парасуицидов в анамнезе

Заключение

Наши результаты показали, что для пациентов с большей продолжительностью шизофрении и наличием суицидальных попыток в анамнезе характерно повышение сывороточного уровня S-100B. Эти данные могут отражать нейрповреждение, связанное с длительностью заболевания, которое, с другой стороны, может играть роль в патогенетических механизмах суицидального поведения при шизофрении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hjørthøj C., Stürup A. E., McGrath J. J., Nordentoft M. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis // *The Lancet Psychiatry*. 2017. Vol. 4, № 4. P. 295–301.
2. Cassidy R.M., Yang F., Kapczynski F., Passos I.C. Risk factors for suicidality in patients with schizophrenia: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of 96 studies // *Schizophrenia bulletin*. 2018. Vol. 44, № 4. P. 787–797.
3. Корнетова Е.Г., Герасимова В.И., Корнетов А.Н., Языков К.Г., Гончарова А.А., Меднова И.А., Семке А.В., Иванова С.А., Бохан Н.А. Влияние когнитивных функций на уровень суицидального риска у больных шизофренией // *Суицидология*. 2020. Т.11, № 4. С. 13–25.
4. Герасимова В.И., Корнетова Е.Г., Гончарова А.А., Меднова И.А., Корнетов А.Н., Семке А.В. Связь самооценки социальной адаптации и суицидального риска у больных шизофренией // *Психиатрия*. 2021. Т.19, № 3. С. 34–40.
5. Duțescu M.M., Popescu R.E., Balcu L., Duica L.C., Strunoiu L.M., Alexandru D.O., Pirlog M.C. Social Functioning in Schizophrenia Clinical Correlations // *Current Health Sciences Journal*. 2018. Vol. 44, № 2. P. 151–156.
6. Aloba O., Esan O., Alimi T. Adaptation of the Beck Hopelessness Scale as a suicide risk screening tool among Nigerian patients with schizophrenia // *International journal of psychiatry in clinical practice*. 2018. Vol. 22, №1. P. 19–24.
7. Zhang L., Verwer R.W., Lucassen P.J., Huitinga I., Swaab D.F. Prefrontal cortex alterations in glia gene expression in schizophrenia with and without suicide // *Journal of psychiatric research*. 2020. Vol. 121. P. 31–38.
8. Левчук Л.А. Содержание нейрон-специфической енолазы и белка S-100 у пациентов с синдромом зависимости от алкоголя и депрессивными расстройствами // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 19–20 ноября 2020 г. [Электронный ресурс] / под ред. В.А. Степанова, Е.Л. Чойнзонова, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.В. Жданова; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2020. С. 394–397. URL: http://tmimc.ru/upload/publications/proceedings/2020_young.pdf
9. Falcone T., Janigro D., Lovell R., Simon B., Brown C.A., Herrera M., Anand A. S100B blood levels and childhood trauma in adolescent inpatients // *Journal of psychiatric research*. 2015. Vol. 62. P. 14–22.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

М.М. Меламуд¹, Е.А. Ермаков¹, А.С. Бойко², Д.А. Камаева²

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия¹

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Аннотация

Несмотря на то что этиология шизофрении до сих пор неизвестна, воспаление считается одной из возможных причин развития этого тяжёлого заболевания. В настоящей работе мы исследовали концентрации цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IFN α , TNF α , BAFF (B-cell activating factor), APRIL (A proliferation-inducing ligand)) в сыворотке крови больных шизофренией, а также оценили их взаимосвязь с клинической симптоматикой, выраженной в числовой форме через шкалы PANSS. Нами продемонстрировано статистически значимое повышение ряда провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных шизофренией, что подтверждает возможное участие воспалительного процесса в патогенезе заболевания.

Ключевые слова : шизофрения, цитокины, BAFF, APRIL, IL-4.

CYTOKINE CONCENTRATION AND THEIR RELATIONSHIP WITH CLINICAL MANIFESTATIONS IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

M.M. Melamud¹, E.A. Ermakov¹, A.S. Boiko², D.A. Kamaeva²

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences ¹

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk²

Annotation

Despite the fact that the etiology of schizophrenia is still unknown, inflammation is considered one of the possible causes of the development of this serious disease. In this work, we investigated the concentrations of cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IFN α , TNF α , BAFF (B-cell activating factor), APRIL (A proliferation-inducing ligand)) in the blood serum of patients with schizophrenia, and also assessed their relationship with clinical symptoms expressed numerically through the PANSS scales. We have demonstrated a statistically significant increase in a number of pro-inflammatory cytokines in the blood serum of patients with schizophrenia, which confirms the possible involvement of the inflammatory process in the pathogenesis of the disease.

Key words: schizophrenia, cytokines, BAFF, APRIL, IL-4.

Актуальность. Хронический воспалительный процесс – одна из гипотез патогенеза шизофрении, тяжёлого и социально значимого заболевания. Взаимосвязь воспалительных изменений и шизофрении регулярно обнаруживается в различных исследованиях [1]. Для воспаления, независимо от степени его выраженности, характерны изменённые уровни цитокинов в организме относительно нормы. Цитокины являются молекулами, регулируемыми многие клеточные процессы в норме и при патологии [2]. Исследования шизофрении в контексте воспаления проводятся давно. Работы, описывающие изменения про- и противовоспалительных цитокинов при этой болезни, встречаются также достаточно часто [3]. При этом возможный вклад В-клеточной линии в иммунопатогенез шизофрении описывается в исследованиях крайне редко, следовательно, обделяются вниманием такие важные для выживания В-клеток цитокины, как APRIL и BAFF. С классическими цитокинами тоже всё не так однозначно. Например, в одном метаанализе описывают понижение уровня IL-4 у больных шизофренией [4], при этом в другом утверждается о достоверно неизменном уровне этого цитокина [5]. Всё это указывает на то, что такие исследования всё ещё не лишены смысла и нужны для более полного понимания картины.

Цель исследования – изучить изменения концентрации цитокинов у больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами, а также оценить взаимосвязь этих изменений с анамнестическими данными и клинической симптоматикой.

Материал и методы

В исследование включён 91 препарат сыворотки крови. Из них 53 взяты у пациентов с официально подтверждённым диагнозом шизофрения, проходящих антипсихотическую терапию, 38 – от здоровых доноров. В исследовании принимали участие пациенты со сле-

дующими типами шизофрении: F20.0 (n=43), F20.6 (n=10). У 23 пациентов ведущей была негативная симптоматика, у 27 – позитивная. Выраженность позитивных и негативных синдромов оценивалась с помощью шкал PANSS. Концентрацию цитокинов определяли с помощью мультиплексного анализатора MAGPIX (Luminex, США) (ЦКП «Медицинская геномика», ТНИМЦ), с использованием набора Human Premixed Multi-Analyte Kit Luminex Assay (R&D Systems, США). В рамках данной работы проанализированы следующие цитокины: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IFN α , TNF α , BAFF (B-cell activating factor), APRIL (A proliferation-inducing ligand). Статистическая обработка результатов (Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's test), корреляционный анализ по Спирмену, поправка Бонферрони на множественную проверку гипотез проводилась в программах STATISTICA 10 и ORIGIN 2021. Статистически значимыми считались результаты с $p < 0,05$ и прошедшие поправку на множественную проверку гипотез Бонферрони.

Результаты

Возраст исследуемых людей статистически значимо не отличался от группы к группе. Медианный возраст пациентов с шизофренией составил 39 лет. Медианный возраст здоровых доноров – 36,5 лет. У пациентов с шизофренией статистически значимо повышались концентрации следующих цитокинов: IL-6, IL-2, IL-4, BAFF, IL-1 β , IFN α . У здоровых доноров уровень TNF α был значимо выше. Концентрации IL-10, APRIL и IL-21 остались без изменений. Числовые значения концентраций цитокинов в группах пациентов с шизофренией и здоровых доноров представлены в табл. 1. В группах пациентов с выраженной позитивной и негативной симптоматикой отличались концентрации только цитокина IL-6. В группе с выраженной позитивной симптоматикой медианное значение концентрации составило 1,8 пг/мл, тогда как в группе с выраженной негативной симптоматикой – 2,5 пг/мл.

Таблица

Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами

Цитокин	Шизофрения	Здоровые
TNF α	3,6[2,7; 4,5]	4,4[3,5; 5,4]*
IL-6	2,0[1,7; 3,3]*	1,5[1,2; 2,0]
IL-10	1,1[0,9; 1,5]	1,0[0,8; 1,2]
IL-2	8,0[6,3; 9,6]*	7,3[5,3; 8,0]
IL-4	17,0[12,5; 24,0]*	12,6[9,7; 17,0]
APRIL	1995[1706; 2651]	2149[1641; 2923]
BAFF	577[489; 728]*	482[422; 568]
IL-1 β	4,9[3,5; 5,7]*	3,9[2,1; 4,9]
IFN α	3,3[2,7; 5,3]*	2,8[2,3; 3,1]
IL-21	13,8[10,6; 29,8]	13,8[7,2; 22,2]

Примечание. Данные в ячейках представлены в виде медианы [квартиль 1; квартиль 3], пг/мл. Знак* обозначает статистически значимое различие выборок.

Далее проводилась оценка корреляционных взаимосвязей как между цитокинами, так и между цитокинами и баллами по шкалам PANSS у больных шизофренией. Корреляционный анализ показал, что из пар, не относящихся к цитокинам, статистически значимой положительной корреляцией обладали: возраст/возраст манифестации, возраст/длительность заболевания, а также всевозможные комбинации в ряду PANSS П, PANSS Н, PANSS О, PANSS Сумм. Из пар, относящихся к цитокинам, статистически значимой положительной корреляцией обладали: IL-10/TNF α , IL-4/IL-2, BAFF/IL-4, IL-1 β /IL-2, IL-1 β /IL-4, IFN α /IL-2, IFN α /IL-4, IFN α /IL-1 β , IL-21/IL-2, IL-21/IL-4, IL-21/IL-1 β , IL-21/IFN α . Статистически значимой отрицательной корреляцией обладали: PANSS Н/IL-2, PANSS Н/IL-1 β , PANSS О/IL-2, PANSS О/IL-1 β , PANSS О/IFN α , PANSS О/IL-21, PANSS Общее/IL-2, PANSS Общее/IL-1 β , PANSS Общее/IL-21. Коэффициенты корреляции представлены на тепловой карте (рис. 1).

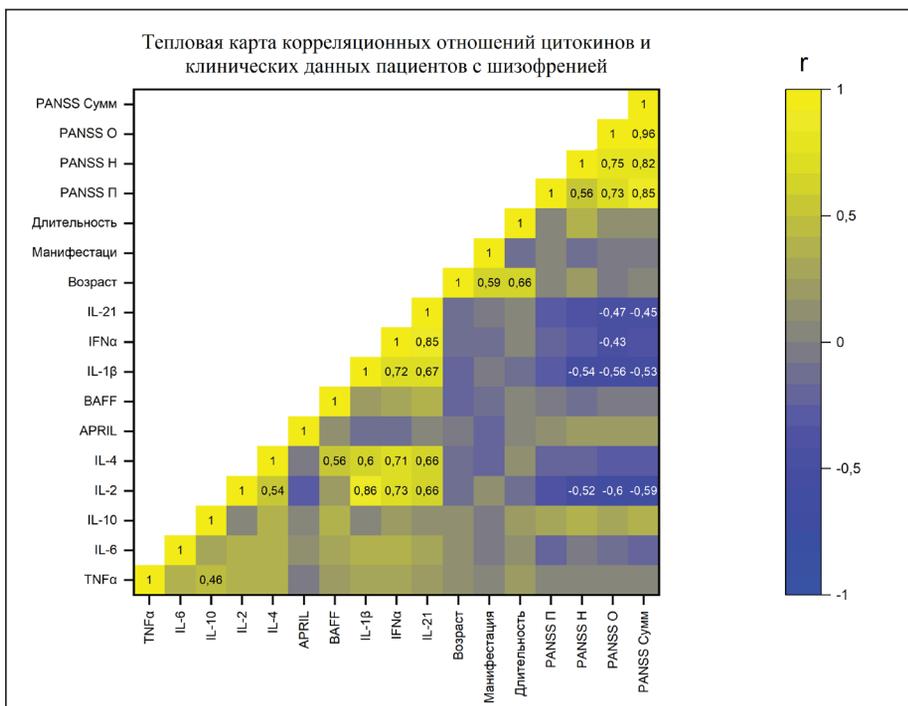


Рис. 1. Тепловая карта корреляционных отношений цитокинов и клинических данных пациентов с шизофренией. Числами в клетках тепловой карты показаны статистически значимые коэффициенты корреляции. r – коэффициент корреляции

Заключение

Увеличение концентраций IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6 и IFNα у больных шизофренией укладывается в картину воспалительных процессов в организме человека. Увеличение концентрации BAFF скорее всего связано с увеличением пролиферации В-клеток у больных шизофренией, так как функция этого цитокина является ключевой для развития, дифференцировки и продукции антител в этих клетках [6]. Уменьшение TNFα у пациентов с шизофренией, принимающих антипсихотические препараты, также описывается в литературе [7] и связывается с общим иммуносупрессивным влиянием антипсихотиков, при котором больше всех «страдает» TNFα, как один из ключевых цитокинов в организации воспалительных процессов. Сильная статистически значимая положительная корреляция ($p = 3,5 \cdot 10^{-16}$) между цитокинами IL-1β и IL-2 сохраняется и для шизофрении, ранее нами показано наличие этой ярко выраженной корреляционной пары у больных СКВ и у здоровых доноров [8]. Статистически значимая корреляция между шкалами PANSS и некоторыми цитокинами (IL-1β, IL-2, IL-21, IFNα) указывает на их непосредственное влияние в развитии положительной или негативной симптоматики при шизофрении.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-15-00162.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirkpatrick B., Miller B.J. Inflammation and Schizophrenia // Schizophrenia Bulletin. 2013. Vol. 39. P. 1174–1179.
2. Bartekova M., Radosinska J., Jelemensky M., Dhalla S.N. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease // Heart Failure Reviews. 2018. Vol. 23. P. 733–758.
3. Miller B.J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects // Biological Psychiatry. 2011. Vol. 70. P. 663–671.
4. Goldsmith D.R., Rapaport M.H., Miller B.J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression // Molecular Psychiatry. 2016. Vol. 21. P. 1696–1709.
5. Montazmanesh S., Zare-Shahabadi A., Rezaei N. Cytokine Alterations in Schizophrenia: An Updated Review // Frontiers in Psychiatry. 2019. Vol. 10. P. 892.
6. Ospina E.F., Betancur J.F., Suso J.P., Muñoz-Buitron E., Cañas C.A., Tobón G.J. Role of the cytokine BAFF in autoimmune diseases: Physiopathology and therapeutic targets // Revista Colombiana de Reumatología (English Edition). 2016. Vol. 23. P. 177–194.
7. Lv M.H., Tan Y.L., Yan S.X., Tian L., Chen D.C., Tan S.P., Wang Z.R., Yang F.D., Yoon J.H., Zunta-Soares G.B., Soares J.C., Zhang X.Y. Decreased serum TNF-alpha levels in chronic schizophrenia patients on long-term antipsychotics: correlation with psychopathology and cognition // Psychopharmacology. 2015. Vol. 232. P. 165–172.
8. Melamud M.M., Ermakov E.A., Boiko A.S., Parshukova D.A., Sizikov A.E., Ivanova S.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Serum cytokine levels of systemic lupus erythematosus patients in presence of concomitant cardiovascular diseases // Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets. 2022. Ahead of Print.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВЫМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ ПРИ ТЕРАПИИ АНТИПСИХОТИКАМИ

И.В. Мындускин, С.Е. Голыгина, А.В. Сахаров

Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия

Аннотация

В продольном проспективном экспериментальном исследовании с целью изучения содержания CCL2, sTREM-1, sTREM-2, TGF- β 1, VILIP-1 и sRAGE в крови у больных шизофренией было обследовано 40 пациентов с диагнозом шизофрения параноидная, период наблюдения менее года (F20.09), в качестве контрольной группы – 20 здоровых человек. Пациенты были разделены на две группы: в первой (n=20) больные принимали галоперидол, во второй (n=20) – рисперидон. Определение показателей нейровоспаления в сыворотке крови участников проводили методом проточной флюориметрии. Забор крови осуществляли до начала терапии и через 8 нед лечения. Выявлено, что у больных с первым эпизодом шизофрении до лечения большинство показателей оказались повышенными: величина CCL2 превышала контрольные значения на 65%, sTREM-1 – на 120%, VILIP-1 – на 60%, sRAGE – на 79%. Это свидетельствует об усилении процессов нейровоспаления и нейродеструкции. Через 8 нед терапии галоперидолом продолжился рост содержания в крови CCL2, VILIP-1 и TGF- β 1 и снижение sRAGE. При лечении в течение 8 нед рисперидоном отмечено увеличение содержания только VILIP-1 при значимом снижении CCL2, TGF- β 1 и sRAGE. Уровень sTREM-1 оставался повышенным в обеих клинических группах. Полученные результаты свидетельствуют об усилении процессов повреждения ЦНС при манифестации шизофрении, при этом терапия рисперидоном в сравнении с галоперидолом оказывает благоприятное воздействие на большее число изученных показателей нейровоспаления.

Ключевые слова: нейровоспаление, шизофрения, первый эпизод, провоспалительные хемокины, цитокины, нейролептики.

CHANGES IN THE PARAMETERS OF NEUROINFLAMMATION IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH THE FIRST EPISODE OF SCHIZOPHRENIA DURING ANTIPSYCHOTIC THERAPY

I.V. Minduskin, S.E. Golygina, A.V. Sakharov

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Annotation

In a longitudinal prospective experimental study to study the content of CCL2, sTREM-1, sTREM-2, TGF- β 1, VILIP-1 and sRAGE in the blood of patients with schizophrenia, 40 patients were examined with a diagnosis of "paranoid schizophrenia, follow-up period less than a year" (F20 .09), as a control group – 20 healthy people. The patients were divided into two groups: in the first (n=20) patients took haloperidol, in the second (n=20) – risperidone. Determination of indicators of neuroinflammation in the blood serum of the participants was carried out by flow fluorometry. Blood sampling was carried out before the start of therapy and after 8 weeks of treatment. It was found that in patients with the first episode of schizophrenia before treatment, most of the indicators were elevated: the value of CCL2 exceeded the control values by 65%, sTREM-1 – by 120%, VILIP-1 – by 60%, sRAGE – by 79%. This indicates an increase in the processes of neuroinflammation and neurodestruction. After 8 weeks of haloperidol therapy, the increase in blood levels of CCL2, VILIP-1 and TGF- β 1 and the decrease in sRAGE continued. When treated for 8 weeks with risperidone, an increase in the content of only VILIP-1 was noted with a significant decrease in CCL2, TGF- β 1 and sRAGE. The sTREM-1 level remained elevated in both clinical groups. The results obtained indicate an increase in the processes of the central nervous system damage during the manifestation of schizophrenia, while risperidone therapy, in comparison with haloperidol, has a beneficial effect on a greater number of neuroinflammation parameters studied.

Key words: neuroinflammation, schizophrenia, first episode, pro-inflammatory chemokines, cytokines, antipsychotics.

Актуальность. Шизофрения, являясь тяжелым и наиболее распространенным психическим заболеванием, отличается многообразием клинических и биологических проявлений. Общепринятыми звеньями в патогенезе шизофрении считаются нарушения нейротрансмиттерных процессов в центральной нервной системе (ЦНС) и нейровоспаление, основанное на нарушении взаиморегуляции нервной и иммунной систем. В настоящее время накоплены объективные данные, которые свидетельствуют о существенной роли в развитии шизофрении процессов нейродеструкции, что ведет к появлению в крови мозгоспецифических белков – маркеров повреждения нервной ткани [1]. Это привело к усилению интереса в исследовании различных биологически активных молекул, которые участвуют в системе «нейродеструкция-нейрорепарация». Одними из возможных факторов нейровоспаления следует считать некоторые провоспалительные хемокины. Так, в головном мозге в глиальных клетках и нейронах присутствует хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (CCL2 или MCP-1). В одном из исследований у пациентов с манифестацией шизофрении установлено повышенное количество моноцитов и повышенный уровень MCP-1. Предполагается, что этот хемокин может способствовать развитию этого расстройства как раз за счет усиления нейродеструкции [2, 3]. Другим фактором, участвующим в повреждении ЦНС, является TREM-1 (запускающий рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках). Некоторые исследования предполагают его участие в воспалительном ответе. Схожим действием обладает TREM-2. Это трансмембранный рецептор, который экспрессируется преимущественно микроглией ЦНС [4, 5]. Еще одним провоспалительным цитокином является трансформирующий фактор роста бета (TGF- β). В немногочисленных исследованиях было показано, что TGF- β 1 участвует в процессах нейродегенерации [6]. Значимым фактором нейродеструкции следует считать также визининподобный протеин 1 (VILIP-1). VILIP-1 может быть вовлечен в механизмы формирования патологии ЦНС за счет повышения нейротоксичности, опосредованной кальцием [7]. Имеются данные, что в процессах нейродегенерации участвует рецептор конечных продуктов гликирования белков (RAGE). Описана тесная связь между sRAGE и нейродегенерацией за счет развития воспаления в нервной системе [8].

При этом большинство представленных маркеров повреждения ЦНС активно изучаются при различных нейродегенеративных заболеваниях, при шизофрении такие исследования единичны, и они часто не учитывают разную антипсихотическую терапию, которую получают пациенты [1]. Поэтому интересным является исследование влияния разных антипсихотиков на содержание нейродеструктивных факторов, что в перспективе может иметь серьезное практическое значение. Кроме того, детальное функционирование системы «нейродеструкция-нейрорепарация» у пациентов с первым психотическим эпизодом изучено недостаточно, а роль большинства из представленных выше факторов нейровоспаления при шизофрении совсем не установлена, что свидетельствует об актуальности проводимого исследования.

Цель исследования – изучение изменения некоторых показателей нейровоспаления у пациентов с первым эпизодом шизофрении при терапии антипсихотиками первого и второго поколений.

Материал и методы

Работа соответствует этическим стандартам Хельсинкской декларации ВМА и одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 100 от 21.02.2020 года). От всех обследованных получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. На базе ГКУЗ «Краевая клиническая психиатрическая больница имени В.Х. Кандинского» было обследовано 40 пациентов с диагнозом шизофрения параноидная, период наблюдения менее года (шифр по МКБ-10 F 20.09). Возраст обследованных пациентов находился в диапазоне от 18 до 35 лет. В течение 8 нед пациенты находились на стационарном лечении. Все пациенты методом простой рандомизации были разделены на две группы. 1-я группа – 20 больных, принимавших антипсихотик первого поколения галоперидол; 2-я группа – 20 больных, которые принимали антипсихотик второго поколения рисперидон. На момент включения в исследование все пациенты находились в остром психотическом состоянии. Общий балл по шкале позитивных и негативных синдромов (PANSS) в обеих группах составил 107,5 [103,5; 114,0]. Забор крови для исследований проводился дважды: в 1-й день поступления (до лечения) и через 8 нед от госпитализации и начала лечения антипсихотиками. Контрольную группу составили 20 психически и соматически здоровых людей. Обследованные лица были полностью сопоставимы между собой по полу и возрасту – $p > 0,05$. Лабораторная часть исследования осуществлялась в лаборатории клинической и экспериментальной биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»

Минздрава России. Определение показателей нейровоспаления проводили в сыворотке крови методом проточной флюориметрии на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с применением пакета анализа Microsoft Excel 2016 и пакета «Statistica-12».

Результаты. По результатам проведенного исследования установлено, что все показатели нейровоспаления в двух группах больных шизофренией до лечения не различались между собой, что характеризует их как сопоставимые. Содержание моноцитарного хемоатрактантного белка (CCL2, MCP-1) у больных обеих групп до лечения было значительно выше, чем у лиц группы контроля ($p=0,003$). Через 8 нед лечения галоперидолом уровень CCL2 увеличился в 1,12 раза ($p=0,02$), превышая показатель как у лиц группы контроля ($p=0,0003$), так и у пациентов, получающих рисперидон ($p=0,04$). При терапии рисперидоном в динамике отмечается тенденция к снижению уровня моноцитарного хемоатрактантного белка, хотя значимых статистических отличий с группой контроля не получено. При этом уровень CCL2 после лечения рисперидоном в течение 8 нед остается повышенным относительно контрольных значений ($p=0,02$), но становится значимо ниже, чем после приема галоперидола ($p=0,04$). Уровень растворимого рецептора миелоидных клеток 1 (sTREM-1) у пациентов с первым эпизодом шизофрении до лечения был более чем в 2 раза выше, чем в группе контроля ($p=0,02$). Через 8 нед терапии антипсихотиком как первого, так и второго поколения его содержание имело тенденцию к снижению. Показатель по-прежнему превышал аналогичный в контрольной группе ($p<0,05$). Значимых отличий между группами пациентов в динамике установлено не было. Содержание в крови sTREM-2 у пациентов с шизофренией при поступлении в стационар также было незначительно выше, чем его содержание в группе контроля. В динамике прослеживалась тенденция к снижению величины показателя, при этом статистически значимых отличий не получено. Уровень трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) у пациентов с шизофренией до лечения статистически не отличался от аналогичного показателя в группе контроля ($p<0,05$). При терапии галоперидолом величина TGF- $\beta 1$ имела тенденцию к повышению (в 1,1 раза), при приеме рисперидона наблюдалось статистически значимое снижение в динамике величины TGF- $\beta 1$ в 1,2 раза ($p<0,05$). Также установлены значимые отличия между группами пациентов через 8 недель лечения ($p=0,0326$). Уровень визинин-подобного белка 1 (VILIP-1) у пациентов с первым эпизодом шизофрении до лечения был более чем в 1,5 раза выше, чем в группе контроля ($p<0,02$). Через 8 нед терапии в обеих группах пациентов его содержание увеличилось, превышая показатель в контрольной группе практически в 2 раза ($p=0,009$). Статистически значимых отличий между пациентами с разной терапией получено не было. Содержание рецептора конечных продуктов гликозилирования больных (sRAGE) обеих групп до лечения было практически в 2 раза выше, чем в группе контроля ($p<0,003$). Через 8 нед лечения уровень sRAGE значимо снизился у всех пациентов независимо от вида принимаемого антипсихотика ($p=0,04$), в результате стал статистически не отличим от величины показателя в контрольной группе.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о повышении показателей нейровоспаления в крови у пациентов с первым эпизодом шизофрении еще до назначения антипсихотиков. Поэтому можно предполагать важную роль в патогенезе шизофрении усиления процессов нейровоспаления с активацией клеток микроглии и развития Ca^{2+} -зависимой нейродеструкции. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о значительной роли процессов нейродеструкции при манифестации шизофрении, которые продолжают сохраняться весьма продолжительное время после первых проявлений психоза. При этом прием антипсихотика второго поколения в целом имеет более благоприятное воздействие на систему «нейродеструкция-нейрорепарация» за счет снижения большинства изученных показателей, вовлеченных в механизмы повреждения ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Говорин Н.В., Васильева А.И. Влияние галоперидола и рисперидона на нейромаркеры и показатели эндотелиальной дисфункции у больных с острой шизофренией // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2011. № 111(3). С. 54–57.
2. Foresti M.L., Arisi G.M., Katki K., Montañez A., Sanchez R.M., Shapiro L.A. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus // *Journal of Neuroinflammation*. 2009. Vol. 6, № 40.
3. Lin Y., Peng Y., Zhu C., Su Y., Shi Y., Lin Z., Chen J., Cui D. Pretreatment Serum MCP-1 Level Predicts Response to Risperidone in Schizophrenia // *Shanghai Archives of Psychiatry*. 2017. Vol. 29, № 5. P. 287–294.
4. Beumer W., Drexhage R.C., De Wit H., Versnel M.A., Drexhage H.A., Cohen D. Increased level of serum cytokines, chemokines and adipokines in patients with schizophrenia is associated with disease and metabolic syndrome // *Psychoneuroendocrinology*. 2012. Vol. 37, № 12. P. 1901–1911.

5. Ulrich J.D., Holtzman D.M. TREM2 function in Alzheimer's disease and Neurodegeneration // ACS Chemical Neuroscience. 2016. Vol. 7, № 4. P. 420–427.

6. Potvin S., Stip E., Sepehry A.A., Gendron A., Bah R., Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review // Biological Psychiatry. 2008. Vol. 63, № 8. P. 801–808.

7. Dulewicz M., Kulczyńska-Przybik A., Mroczko B. Neurogranin and VILIP-1 as molecular indicators of Neurodegeneration in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, № 21. P. 8335.

8. Galasko D., Bell J., Mancuso J.Y., Kupiec J.W., Sabbagh M.N., van Dyck C., Thomas R.G., Aisen P.S. Alzheimer's Disease Cooperative Study. Clinical trial of an inhibitor of RAGE-A β interactions in Alzheimer disease // Neurology. 2014. Vol. 82, № 17. P. 1536–1542.

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ДОФАМИНОВОГО D2-РЕЦЕПТОРА В РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Д.З. Падерина, И.В. Пожидаев, А.С. Бойко

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Метаболические побочные эффекты, вызванные приёмом нейролептиков, включают увеличение массы тела, дислипидемию и нарушение регуляции гомеостаза глюкозы. Данные побочные эффекты приводят к ухудшению качества жизни пациентов, дополнительной стигматизации и большей смертности в результате сердечно-сосудистых заболеваний. В развитии антипсихотик-индуцированного метаболического синдрома участвуют не только экзогенные, но и генетические факторы. Настоящее исследование направлено на исследование роли аллельных вариантов rs1799732, rs4436578 гена дофамина D2-рецептора (*DRD2*) в патогенезе метаболического синдрома у больных шизофренией. Молекулярно-генетические исследования проведены в группе из 471 пациента, проживающих в Западно-Сибирском регионе России. Среди больных были выделены подгруппы пациентов с метаболическим синдромом (n=125) и без изучаемого побочного эффекта (n=346). Выявлена ассоциация функционального полиморфного варианта *DRD2* (rs1799732) с развитием метаболического синдрома у женщин с шизофренией.

Ключевые слова: фармакогенетика, гены, полиморфные варианты, рецепторы, дофамин, побочные эффекты, метаболический синдром, шизофрения.

THE ROLE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF THE DOPAMINE D2 RECEPTOR GENE IN THE DEVELOPMENT OF METABOLIC SYNDROME IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

D.Z. Paderina, I.V. Pozhidaev, A.S. Boiko

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Annotation

Metabolic side effects caused by antipsychotics include weight gain, dyslipidemia and dysregulation of glucose homeostasis. These side effects lead to a worse quality of life for patients, additional stigmatization and higher mortality due to cardiovascular diseases. In the development of antipsychotic-induced metabolic syndrome, not only exogenous, but also genetic factors are involved. The present study is aimed at studying the role of allelic variants rs1799732, rs4436578 of the dopamine D2-receptor gene (*DRD2*) in the pathogenesis of the metabolic syndrome in patients with schizophrenia. Molecular genetic studies were carried out in a group of 471 patients living in the West Siberian region of Russia. Patients were divided into subgroups of patients with metabolic syndrome (n=125) and without the studied side effect (n=346). An association of the functional polymorphic variant *DRD2* (rs1799732) with the development of the metabolic syndrome in women with schizophrenia was revealed.

Key words: pharmacogenetics, genes, polymorphic variants, receptors, dopamine, side effects, metabolic syndrome, schizophrenia.

Актуальность. Антипсихотические препараты составляют основу лечения пациентов с шизофренией, однако их применение сопряжено с развитием серьезных побочных эффектов, таких как экстрапирамидные двигательные расстройства [1], повышение уровня пролактина [2] и метаболические побочные эффекты [3]. Большинство антипсихотиков, в первую очередь клозапин и оланзапин, связаны с увеличением массы тела, нарушением липидного обмена и дисрегуляцией глюкозы, что способствует развитию метаболического синдрома [4–6]. Данные побочные эффекты связаны с долгосрочными рисками для здоровья сердечно-сосудистой системы, снижением комплаентности пациентов к психотропной терапии, что в конечном итоге может привести к ухудшению клинического состояния. Ассоциация метаболического синдрома с сердечно-сосудистыми заболеваниями увеличивает общую смертность пациентов примерно в 1,5 раза и сердечно-сосудистую смертность примерно в 2 раза по сравнению с населением в целом [7].

Дофаминовые D2-рецепторы являются главной мишенью для нейролептиков и, как следствие, играют важную роль в опосредовании терапевтических действий антипсихотиков и их метаболических побочных эффектов [8]. Дофамин регулирует гипофизарную секрецию пролактина, который является мощным гормональным регулятором системного гомеостаза глюкозы [9]. Кроме того, дофамин участвует в центральной регуляции аппетита посредством передачи сигналов через стриарные пути вознаграждения [10].

Известно, что клинические ответы на нейролептики и связанные с ними побочные эффекты могут варьировать от пациента к пациенту. Подобная изменчивость может быть объяснена множеством факторов, в которых генетические факторы могут играть доминирующую роль. В связи с вышеизложенным **целью данного исследования** явилось выяснение роли полиморфных вариантов гена дофаминового рецептора *DRD2* в развитии лекарственно-индуцированного метаболического синдрома у пациентов с шизофренией.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 471 пациента с шизофренией, проживающих в Западно-Сибирском регионе России. Формирование групп пациентов для исследования и клиническая верификация диагнозов выполнена на базе отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья (руководитель отделения – д-р мед. наук, профессор А. В. Семке), ОГБУЗ «Томская клиническая психиатрическая больница» (главный врач – С. М. Андреев) и ГКУЗ КО «Кемеровская областная клиническая психиатрическая больница» (главный врач – к.м.н. В.А. Сорокина). Исследование проводилось в соответствии с этическим принципам ведения исследований человека согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом НИИ психического здоровья. Для установления метаболического синдрома использовались критерии Международной федерации диабета (IDF, 2005).

В качестве материала для исследования была использована венозная кровь. Венозную кровь брали из локтевой вены в период с 8.00 до 9.00 натощак в пробирки фирмы BD Vacutainer с антикоагулянтом ЭДТА. Полученную кровь использовали для выделения ДНК стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование двух полиморфных вариантов гена дофаминового рецептора *DRD2* (rs1799732, rs4436578) проводили с использованием The MassARRAY® System (Agena Bioscience™), набором SEQUENOM Consumables iPLEX Gold 96 на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы SPSS 23.0. Распределение частот генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 . Сравнение частот генотипов и аллелей в исследуемых группах проводили по критерию χ^2 . Оценка риска осуществлялась с помощью показателя отношения шансов (odds ratio, OR) с 95% доверительным интервалом (95% CI). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Обследован 471 пациент, длительно получавший антипсихотическое лечение. В табл. 1 представлены основные клинико-демографические параметры исследуемых групп пациентов.

Распределение по полу было примерно одинаковым: 221 женщина (средний возраст $42,1 \pm 11,8$ лет) и 250 мужчин (средний возраст $39,0 \pm 11,5$ лет). Женщины были статистически значимо старше группы мужчин с шизофренией ($p=0,004$). В группе больных с метаболическим синдромом статистически значимо больше женщин (57,6%) ($p=0,005$), средний возраст также значимо выше ($p<0,0001$) в группе пациентов с метаболическим синдромом.

Таблица 1

Демографические и клинические признаки исследованных больных шизофренией с метаболическим синдромом (МС) и без изучаемого побочного эффекта

Признак	Пациенты без МС, n=346 (73,5%)	Пациенты с МС, n=125 (26,5%)	p
Пол	женщины	149 (43,1 %)	0,005
	мужчины	197 (56,9 %)	
Возраст	39,16 ±11,56	43,98 ±11,59	<0,0001
Длительность заболевания	12,0 [6,0; 20,0]	17,0 [10,0; 22,0]	0,002
Доза антипсихотика в хлорпромазиновом эквиваленте	400,0 [217,4; 754,3]	429,9 [225,0; 699,0]	0,205
Индекс массы тела	24,38±4,91	31,36±5,62	<0,0001

Таблица 2

Сравнение частот генотипов и аллелей между группой женщин с метаболическим синдромом (МС) и без него для полиморфных вариантов гена DRD2

SNP	Генотипы/ аллели	Женщины без МС (%)	Женщины с МС (%)	OR		χ^2	p		
				знач.	95% CI				
rs1799732	GG	130 (87,2)	51 (70,8)	0,35	0,18-0,71	8,83	0,012		
	G.DEL	18 (12,1)	20 (27,8)	2,80	1,37-5,71				
	DEL.DEL	1 (0,7)	1 (1,4)	–	–				
rs4436578	G	278 (93,3)	122 (84,7)	0,40	0,21-0,76	8,28	0,004		
	DEL	20 (6,7)	22 (15,3)	2,51	1,32-4,76				
	CC	6 (4,0)	2 (2,8)	0,68	0,13-3,46				
	CT	35 (23,5)	18 (25,0)	1,09	0,56-2,09			0,25	0,880
	TT	108 (72,5)	52 (72,2)	0,99	0,53-1,85				
	C	47 (15,8)	22 (15,3)	0,96	0,56-1,67	0,02	0,893		
	T	251 (84,2)	122 (84,7)	1,04	0,60-1,80				

Сравнение частот генотипов и аллелей в общей группе пациентов не выявило статистически значимых различий. Так как в отношении развития лекарственно-индуцированных метаболических нарушений существуют гендерные различия, мы провели статистический анализ в группах больных с метаболическим синдромом и без него в зависимости от пола.

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs1799732 показал ассоциации генотипов (p=0,012) и аллелей (p=0,004) с развитием метаболического синдрома у женщин (табл. 2).

Гомозиготный генотип GG (OR 0,35; 95% CI: 0,18–0,71) и аллель G (OR 0,40; 95% CI: 0,21–0,76) обладают протективным эффектом в отношении развития метаболического синдрома у женщин. Носительство гетерозиготного генотипа (OR 2,80; 95% CI: 1,37–5,71) и аллеля DEL (OR 2,51; 95% CI: 1,32–4,76) повышает риск развития метаболических нарушений при приеме нейролептиков.

Сравнение частот генотипов и аллелей по изучаемым полиморфным вариантам гена DRD2 в группе мужчин не выявило статистически значимых различий.

Выводы

В настоящее время неизвестно, какие физиологические, демографические или генетические факторы предсказывают метаболическую дисрегуляцию, связанную с приемом нейролептиков. В нашем исследовании была выявлена ассоциация функционального полиморфного варианта DRD2 (rs1799732) с развитием метаболического синдрома у женщин с шизофренией. Дальнейший поиск генетических маркеров будет способствовать разработке эффективных методов диагностики, коррекции и лечения лекарственно-индуцированных метаболических нарушений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10012 «Новые подходы к фармакогенетике метаболического синдрома при шизофрении».

ЛИТЕРАТУРА

1. Boiko A.S., Ivanova S.A., Pozhidaev I.V., Freidin M.B., Osmanova D.Z., Fedorenko O.Y., Semke A.V., Bokhan N.A., Wilffert B., Loonen A.J.M. Pharmacogenetics of tardive dyskinesia in schizophrenia: The role of CHRM1 and CHRM2 muscarinic receptors // *World J Biol Psychiatry*. 2020. V.21, № 1. P.72–77.
2. Osmanova D.Z., Freidin M.B., Fedorenko O.Y., Pozhidaev I.V., Boiko A.S., Vyalova N.M., Tiguntsev V.V., Kornetova E.G., Loonen A.J.M., Semke A.V., Wilffert B., Bokhan N.A., Ivanova S.A. A pharmacogenetic study of patients with schizophrenia from West Siberia gets insight into dopaminergic mechanisms of antipsychotic-induced hyperprolactinemia // *BMC Medical Genetics*. 2019. V.20 (1). P.47.
3. Corfutsen H., Krantz B., Larsen A., Drago A. Molecular pathway analysis associates alterations in obesity-related genes and antipsychotic-induced weight gain // *Acta Neuropsychiatrica*. 2020. V. 32 (2). P. 72–83.
4. De Hert M., Vancampfort D., Correll C.U., Mercken V., Peuskens J., Smeets K., van Winkel R., Mitchell A.J. Guidelines for screening and monitoring of cardiometabolic risk in schizophrenia: systematic evaluation // *Br J Psychiatry*. 2011. V.199, № 2. P.99–105.
5. Pillinger T., McCutcheon R.A., Vano L., Mizuno Y., Arumham A., Hindley G., Beck K., Natesan S., Efthimiou O., Cipriani A., Howes O.D. Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis // *Lancet Psychiatry*. 2020. V.7, №1. P.64–77.
6. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome // *Cardiol Res Pract*. 2014. P. 943162.
7. Mitchell A.J., Vancampfort D., Smeets K., van Winkel R., Yu W., De Hert M. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia and related disorders – a systematic review and meta-analysis // *Schizophr Bull*. 2013. V.39. P. 306–318.
8. Ballon J.S., Pajvani U., Freyberg Z., Leibel R.L., Lieberman J.A. Molecular pathophysiology of metabolic effects of antipsychotic medications // *Trends Endocrinol. Metab*. 2014. V.25. P. 593–600.
9. Lopez Vicchi F., Luque G.M., Brie B., Nogueira J.P., Garcia Tornadu I., Becu-Villalobos D. Dopaminergic drugs in type 2 diabetes and glucose homeostasis // *Pharmacol. Res*. 2016. V.109. P. 74–80.
10. Freyberg Z., Aslanoglou D., Shah R., Ballon J.S. Intrinsic and Antipsychotic Drug-Induced Metabolic Dysfunction in Schizophrenia // *Front Neurosci*. 2017. Vol. 11. P.432.

РЕДОКС-ДИСБАЛАНС У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ, ЕГО АССОЦИАЦИЯ С КЛИНИКО-ПСИХОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

А.С. Пятойкина

ГБУЗ НО «Клиническая психиатрическая больница №1 г. Нижнего Новгорода»,
г. Нижний Новгород, Россия

Аннотация

Данная работа посвящена оценке уровня основных параметров окислительного стресса (ОС) у пациентов на разных стадиях шизофрении. В исследование включены 125 пациентов с шизофренией и 75 здоровых добровольцев. Уровень ОС оценивался путем определения в периферической крови уровней восстановленного глутатиона (GSH), супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT), малонового диальдегида (MDA), альдегид-2,4-динитрофенилгидразонов (АДНФГ), кетон-2,4-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) плазмы крови. Уровни маркеров оценивали спектрофотометрическим методом. В результате было выявлено снижение у пациентов с шизофренией уровня антиоксидантов GSH и CAT, повышение уровня прооксидантов. Выявлены статистически значимые корреляции клинико-психопатологических особенностей и уровня маркеров ОС у пациентов с шизофренией, преимущественно на ранних стадиях заболевания.

Ключевые слова: шизофрения, оксидативный стресс, когнитивные функции.

REDOX IMBALANCE IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA, ITS ASSOCIATION WITH CLINICAL AND PSYCHOPATHOLOGICAL FEATURES

A.S. Piatokina

GBUZ NO "Clinical Psychiatric Hospital No. 1 of Nizhny Novgorod", Nizhny Novgorod

Annotation

This work is devoted to assessing the level of the main parameters of oxidative stress (OS) in patients at different stages of schizophrenia. The study included 125 patients with schizophrenia and 75 healthy volunteers. The OS level was assessed by determining the peripheral blood levels of reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazones (ADNPH), ketone-2,4-dinitrophenylhydrazones (KDNPH) in peripheral blood. Marker levels were assessed

by spectrophotometric method. The results revealed a decrease in the level of antioxidants GSH and CAT in patients with schizophrenia, an increase in the level of prooxidants. Statistically significant correlations of clinical and psychopathological features and the level of OS markers were found in patients with schizophrenia, mainly in the early stages of the disease.

Key words: schizophrenia, oxidative stress, cognitive functions.

Актуальность. Шизофрения остается одной из ведущих причин инвалидности в мире, преимущественно в связи с низкой эффективностью антипсихотиков в отношении негативных и когнитивных симптомов и дефицитом патогенетических терапевтических подходов [1]. Проблемы терапии шизофрении связаны прежде всего с недостаточными данными о молекулярных механизмах патогенеза данного заболевания. В настоящее время рассматривается теория о том, что одним из нейробиологических факторов развития шизофренического процесса является ОС, являющийся обособленным патогенетическим звеном шизофрении, на которое традиционная антипсихотическая терапия не оказывает значимого воздействия [2].

Себестоимость однократного лабораторного анализа биохимических маркеров ОС и применения у пациента доказано эффективных антиоксидантов ничтожна по сравнению со стоимостью основного психофармакологического лечения, а также по сравнению с социальным бременем шизофрении в целом. При этом ожидаемый эффект с учетом полученных к настоящему времени предварительных данных может иметь большую клиническую, социальную и экономическую значимость.

Цель исследования – выявление особенностей клинической симптоматики и когнитивного функционирования при шизофрении, ассоциированных с биохимическими маркерами окислительного стресса.

Материал и методы

Исследование проводилось с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол и информированное согласие для участников исследования были одобрены Локальным этическим комитетом №1 Приволжского исследовательского медицинского университета (13.03.2019). Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие и обработку данных.

Было обследовано 125 пациентов и 75 здоровых добровольцев. Критериями включения пациентов в исследование являлись подтверждение диагноза шизофрении с помощью структурированного клинического диагностического «Международного нейропсихиатрического интервью» для психотических расстройств Диагностического и статистического руководства 5-й версии (MINI для DSM-5); способность пациента дать осознанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; отсутствие хронических соматических заболеваний и неврологических расстройств, ассоциированных с оксидативным стрессом.

Критериями включения здоровых добровольцев в исследование являлись отсутствие зарегистрированных ранее на протяжении жизни психических расстройств (здоровый доброволец не наблюдается у психиатра и ранее не обращался к психиатрам по поводу проблем с психическим здоровьем), социальной дезадаптации, злоупотребления психоактивными веществами; соответствие по полу и возрасту пациентам, включенным в исследование; отсутствие хронических соматических заболеваний и неврологических расстройств, ассоциированных с оксидативным стрессом.

После подписания добровольного информированного согласия все пациенты прошли психодиагностическое обследование по следующим шкалам: шкала психопатологии PANSS, шкала социального функционирования PSP, шкала тяжести побочных эффектов UKU, шкала депрессии CDRS, шкала ангедонии SHAPS, шкала оценки когнитивного функционирования BACS.

Образцы крови собирали утром после ночного голодания (не менее 6 часов) из локтевой вены одновременно с 8 до 9 часов утра.

Активность SOD в гемолизате эритроцитов оценивали по методу, основанному на способности фермента конкурировать с нитросинимтетразолием за супероксидные анионы, образующиеся в результате взаимодействия восстановленной формы НАДН2 и феназин-метасульфата. Количественное определение активности CAT в гемолизате эритроцитов проводилось по методу, основанному на свойстве H2O2 разлагаться под влиянием CAT на H2O и O2. Содержание GSH оценивали спектрофотометрически, основываясь на способности сульфгидрильной группы GSH вступать в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана).

Определение концентрации малонового диальдегида (MDA) в плазме крови проводилось по методу Folch et al. Степень ОМБ оценивали по методу Levine R.L. в модификации Дубининой Е.Е., основанному на определении содержания в плазме крови карбонильных производных, образующихся в результате спонтанного окисления (СО) и металл-катализируемого окисления (МКО) аминокислотных остатков в белковой молекуле свободных радикалов (СР) или АФК. СО происходит без катализаторов, оно показывает уровень модифицированных белков при обычных условиях, при МКО в реакции участвует железо, катализирующее генерацию СР, МКО показывает резервно-адаптационные возможности организма противостоять окислению.

Оценка нормальности распределения данных в выборках производилась с помощью критерия Шапиро-Вилка (W-тест Shapiro-Wilk). Так как распределения полученных данных в изучаемых выборках отличались от нормального, применялись непараметрические критерии: Манна-Уитни U-тест для сравнения двух групп (далее MWU-test), критерий χ^2 с поправкой Йетса; для оценки корреляции между биохимическими параметрами использовался критерий ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

При сравнении уровня параметров редокс-дисбаланса среди пациентов с шизофренией с длительностью заболевания менее 3 лет, более 3 лет и здоровых добровольцев были выявлены статистически значимые различия (рис.1).

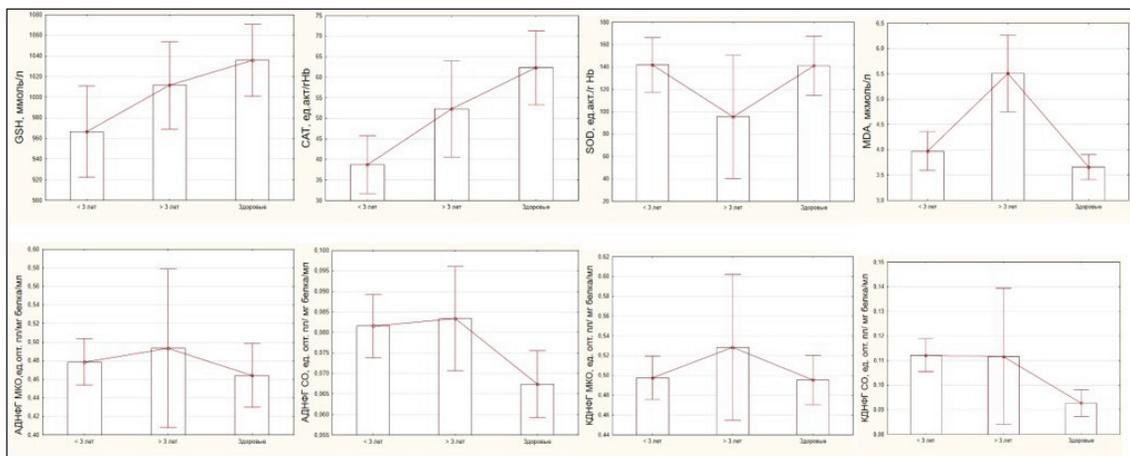


Рис. 1. Сравнение уровня антиоксидантов и продуктов перекисного окисления у пациентов с шизофренией и здоровых добровольцев

Статистически значимые отличия пациентов с шизофренией от здоровых доноров крови:

1. Дефицит GSH выявлен у 37,6% пациентов с шизофренией (47/125) против 26,6% здоровых добровольцев (20/75)
2. Снижен уровень антиоксидантного фермента CAT ($z=-3,37$; $p=0,0007$)
3. Повышен уровень окисленных модификаций белка (фракция свободного окисления КДНФГ и АДНФГ- $z=3,96$; $p=0,000076$ и $z=2,25$; $p=0,025$ соответственно)
4. Повышен уровень перекисного окисления липидов (MDA - $z=-5,8$; $p=0,007$)

При сравнении маркеров ОС у пациентов с различной длительностью заболевания выявлено:

1. Отсутствие статистически значимых отличий уровня антиоксидантов среди пациентов с длительностью заболевания менее и более 3 лет. Однако статистически значимые различия уровня GSH выявляются между группами пациентов с длительностью заболевания менее 1 года и более 1 года ($z=-2,28$; $p=0,023$)

2. Дефицит GSH выявлен у 44,3% пациентов с шизофренией с длительностью заболевания до 3 лет (31/70) против 29,1% пациентов с шизофренией с длительностью заболевания более 3 лет (16/55)

3. По мере прогрессирования заболевания нарастает уровень продуктов перекисного окисления липидов и белков

Выявленные различия не связаны с полом, возрастом пациентов, типом, дозой и выраженностью побочных эффектов принимаемой медикаментозной терапии.

Результаты оценки корреляции параметров оксидативного стресса с клинико-психопатологическими особенностями на различных этапах заболевания представлены в табл. 1,2.

Корреляция уровня маркеров окислительного метаболизма с клинико-психопатологическими особенностями и когнитивным профилем у пациентов с первым эпизодом шизофрении (n=75)

	КДНФ СО	АДНФ СО	КДНФ МКО	АДНФ МКО	MDA	SOD	CAT	GSH
Общий балл UKU	0,173403	0,250873	-0,043498	0,051543	-0,136820	0,066647	0,026882	-0,295392
Неврологические побочные эффекты UKU	0,002015	0,110673	0,218547	0,185571	0,047854	0,214727	0,095132	-0,348400
Позитивная подшкала PANSS	-0,072895	-0,123964	0,067112	-0,064325	-0,056381	-0,295603	-0,045582	0,154308
Негативная подшкала PANSS	-0,169417	-0,237158	0,112647	0,087687	0,083052	0,157081	-0,342189	-0,055106
Шкала общей психопатологии PANSS	-0,261046	0,042664	0,007177	-0,139345	-0,088031	-0,014092	0,116521	0,023013
PSP	0,046144	0,098340	-0,130624	0,106042	-0,177946	-0,184957	-0,107244	0,185576
SNAPS	0,105149	0,099719	0,119846	0,074323	0,209357	0,170257	0,210589	-0,098667
CDRS	-0,009522	-0,007304	-0,116744	-0,093144	-0,152239	-0,087441	-0,157514	0,117525
Слухоречевая память	0,209766	-0,076811	-0,316760	0,107791	-0,055390	-0,305113	0,014838	0,070754
Последовательность чисел	0,306094	0,046026	-0,206524	0,172040	-0,154169	-0,227272	-0,003636	0,092714
Моторные навыки	0,063601	-0,089823	-0,168526	-0,178284	-0,079269	-0,249448	-0,064478	0,111689
Речевая беглость	0,165564	0,049262	-0,070084	-0,102009	-0,062254	-0,345485	-0,168540	0,178198
Кодирование символов	0,093146	-0,057994	-0,112910	-0,089999	-0,132813	-0,205894	-0,095974	0,147345
Тест "Башня Лондона"	0,048946	-0,107708	-0,257089	0,047072	-0,024368	-0,217782	-0,096175	0,253352

Корреляция уровня маркеров окислительного метаболизма с клинико-психопатологическими особенностями и когнитивным профилем у пациентов с хронической шизофренией (n=50)

	КДНФ СО	АДНФ СО	КДНФ МКО	АДНФ МКО	MDA	SOD	CAT	GSH
Общий балл UKU	0,030359	-0,033806	0,000000	-0,028989	0,118729	0,600000	-0,028571	-0,063118
Неврологические побочные эффекты UKU	-0,062531	-0,835573	0,089562	-0,343322	0,027698	0,617914	-0,676763	-0,067699
Позитивная подшкала PANSS	0,250122	-0,069631	0,925476	0,492592	-0,101987	0,382518	0,029424	-0,023863
Негативная подшкала PANSS	-0,091077	-0,507093	0,637748	0,057977	0,106632	0,714286	-0,257143	-0,005318
Шкала общей психопатологии PANSS	-0,092406	-0,360147	0,808824	0,382353	0,226409	0,463817	0,231908	-0,029845
PSP	0,123208	0,394447	-0,779412	-0,264706	-0,194781	-0,521794	-0,057977	0,173662
SNAPS	0,061604	0,411597	0,058824	0,323529	0,065427	0,231908	0,579771	-0,022230
CDRS	-0,516100	-0,439480	0,347863	0,057977	0,206734	-0,085714	0,314286	-0,084356
Слухоречевая память	0,860309	0,516185	0,552632	0,763158	-0,360792	-0,205196	0,461690	0,063324
Последовательность чисел	0,447214	0,670820	0,205196	0,820783	-0,264110	-0,100000	1,000000	-0,052741
Моторные навыки	0,670820	0,894427	0,153897	0,666886	-0,259687	-0,600000	0,700000	0,019883
Речевая беглость	0,782624	0,335410	0,666886	0,666886	-0,153657	-0,100000	0,300000	0,020801
Кодирование символов	0,573539	0,573539	0,342105	0,921053	-0,241397	0,051299	0,974679	0,039640
Тест "Башня Лондона"	0,458831	0,802955	0,131579	0,763158	-0,253819	-0,307794	0,974679	-0,037228

Выявлены статистически значимые корреляции клинико-психопатологических особенностей и уровня маркеров оксидативного стресса у пациентов с шизофренией:

1. Среди пациентов с первым эпизодом шизофрении с низким уровнем GSH более выражены общие и экстрапирамидные побочные эффекты антипсихотической терапии ($z=-0,29$; $p=0,026$ и $z=-0,34$; $p=0,007$ соответственно)

2. На ранних этапах шизофрении обнаруживается обратная корреляция уровня антиоксидантов и выраженности продуктивной, негативной симптоматики PANSS, скорости обработки информации, слухоречевой памяти, способности к проблемно-решающему поведению.

3. На поздних этапах более значимая корреляция психопатологической симптоматики с продуктами перекисного окисления белков и липидов и активности антиоксиданта CAT.

Заключение

Данная работа была направлена на оценку степени нарушения окислительного метаболизма у пациентов с шизофренией по сравнению со здоровыми добровольцами и выявление корреляции отдельных его параметров с клинико-психопатологической симптоматикой. Исходя из полученных результатов, можно сделать предварительный вывод о том, что данные маркеры могут быть одними из наиболее ранних и стабильных показателей редокс-дисбаланса у пациентов с шизофренией.

Наличие корреляций между уровнем антиоксидантов и продуктов перекисного окисления с выраженностью продуктивной, негативной симптоматики, экстрапирамидными побочными эффектами, когнитивными нарушениями говорит о имеющемся дисбалансе звеньев про- и антиоксидантной защиты, являющимся обособленным патогенетическим звеном шизофрении, требующим соответствующей фармакологической коррекции. Одним из потенциальных методов восстановления окислительного метаболизма может являться применение антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Любов Е.Б., Ястребов В.С., Шевченко Л.С., Чапурин С.А. Экономическое бремя шизофрении в России. Социальная и клиническая психиатрия 2012. Т. 22, № 3. 39.
2. Barron H., Hafizi S., Andreazza A.C., Mizrahi R. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Psychosis and Psychosis Risk. IntJMolSci. 2017 Mar 17;18(3):651.

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ДЕЗАДАПТАЦИИ И АГРЕССИИ В СТУДЕНЧЕСКОЙ СРЕДЕ

А.С. Рыбина, Е.В. Бурделова, Л.В. Ивашиненко

Тульский государственный университет, медицинский институт, г. Тула, Россия

Аннотация

Актуальность. Деадаптивное поведение в молодежной среде, в частности у студентов, представляет серьезную проблему, т.к. часто ведет к росту числа насильственных преступлений и аутоагрессивных тенденций (химическая аддикция, суицид, самоповреждение), а также негативно сказывается на процессе получения высшего образования и подготовки будущих специализированных кадров. В данной статье представлены результаты исследования психологического благополучия студентов ТулГУ, в частности таких его аспектов, как мотивация к учебе, удовлетворенность выбором будущей профессии и организацией учебного процесса, умение выстраивать гармоничные отношения с однокурсниками и преподавателями и т.д. **Цель исследования** – выявить и оценить различные аспекты психологического благополучия студентов, проинформировать медицинское и педагогическое сообщество о данной проблеме. **Материал и методы.** Анкетирование, тест Басса-Дарки в модификации Г.В. Резапкиной, тест на ранние деадаптивные схемы Янга, шкала невротизации Вассермана. **Результаты и их обсуждение.** В исследовании приняло участие более 2000 студентов ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», среди которых 48% юношей и 52% девушек. Результаты опроса демонстрируют такие проблемы, как низкий уровень мотивации к учебе, освоению будущей профессии, неудовлетворенность отношениями с однокурсниками и преподавателями, высокий уровень деадаптивных схем, ухудшение здоровья после поступления в вуз. Также обнаружены межполовые различия в структуре компонентов агрессии, установлена взаимосвязь успеваемости с физическим функционированием и самооценкой. В целом почти каждый пятый первокурсник в ТулГУ деадаптирован и нуждается в психологической помощи. **Выводы.** Представленные сведения в перспективе будут уточняться и дополняться в рамках проведения периодических мониторингов. Исследование в этом направлении позволит применить полученные знания для выявления контингента высокого риска, разработки мер профилактики и преодоления деадаптивного поведения у молодежи.

Ключевые слова: деадаптация, агрессия, деадаптивные схемы, студенты, молодежная среда, юношество.

ASSESSMENT OF THE PREVALENCE OF MALADJUSTMENT AND AGGRESSION IN THE STUDENT ENVIRONMENT

A.S. Rybina, E.V. Burdelova, L.V. Ivashinenko

Tula State University, medical institute, Tula, Russia

Annotation

Relevance. Maladaptive behavior in the youth environment, in particular among students, is a serious problem, because it often leads to an increase in the number of violent crimes and auto-aggressive tendencies (chemical addiction, suicide, self-harm), and also negatively affects the process of obtaining higher education and training future specialized personnel. This article presents the results of a study of the psychological well-being of TSU students, in particular, such aspects as: motivation to study, satisfaction with the choice of a future profession and the organization of the educational process, the ability to build harmonious relationships with classmates and teachers, etc. **The purpose of the review.** Identify and evaluate various aspects of the psychological well-being of students, inform the medical and pedagogical community about this problem. **Material and methods.** Questioning, Bass-Darkey test modified by G.V. Rezapkina, test for early maladaptive Young schemes, Wasserman neuroticism scale. **Results and its discussion.** The study involved more than 2,000 students of Tula State University, including 48% of boys and 52% of girls. The results of the survey demonstrate such problems as: a low level of motivation to study, mastering a future profession, dissatisfaction with relationships with classmates and teachers, a high level of maladaptive schemes, and deterioration in health after entering a university. Also, gender differences were found in the structure of the components of aggression, the relationship between academic performance and physical functioning and self-esteem was established. In general, almost every fifth first-year student at Tula State University is maladjusted and needs psychological help. **Conclusion.** In the future, the information provided will be refined and supplemented as part of periodic monitoring. Research in this direction will allow applying the acquired knowledge to identify a high-risk contingent, develop prevention measures and overcome maladaptive behavior among young people.

Key words: maladjustment, aggression, maladaptive schemes, students, youth environment, youth.

Актуальность. В подростковом и юношеском возрасте идет физиологическая перестройка организма, формируется эмоционально-волевая сфера личности, закладываются морально-этические ориентиры и жизненные установки [1].

Цель исследования – выявить и оценить различные аспекты психологического благополучия студентов, проинформировать медико-педагогическое сообщество о данной проблеме.

Материал и методы

Анкетирование, тест Басса–Дарки в модификации Г.В. Резапкиной, тест на ранние дезадаптивные схемы Янга, шкала невротизации Вассермана.

Результаты и обсуждение

В опросе приняли участие более 2 тыс студентов всех курсов очной формы обучения ТулГУ. Половой состав респондентов: юноши – 48,3% и девушки – 51,7%. Возрастной состав респондентов: 16–17 лет – 3,1%; 18–19 лет – 51,5%; 20–21 год – 28,2%; 22 и более – 17,2%. Распределение респондентов по месту рождения: 82% рождены в городской местности, 18% – в сельской.

Обсуждение результатов опроса. Обучение в университете – безусловно, важный этап в жизни человека, в процессе которого у студентов могут возникать различные психологические трудности, связанные с методами преподавания в вузе, недостаточностью школьной подготовки, необходимостью осмысления большого объема информации и т.д. [2]. В частности, учебная деятельность характеризуется информационными перегрузками и эмоциональными переживаниями по поводу правильности выбора профессии, возможности успеха в ней [3]. В группе наиболее высокого риска социально-психологической дезадаптации находятся первокурсники [4].

Результаты проведенного нами опроса наглядно демонстрируют негативное отношение к выбранной специальности и будущей профессии: 21% респондентов заявили, что выбор факультета был сделан не ими лично; 27% не считают получение профессиональных знаний, умений и навыков в вузе приоритетом; 6% сомневаются в перспективности выбранной профессии; 7% считают ошибочным выбор будущей профессии; 15% отмечают недостаток занятий, дающих практические навыки; 39% заявляют, что не все изучаемые дисциплины

ны понадобятся в будущей профессии; 12% предпочли бы сменить место учёбы, если бы предоставилась такая возможность.

Низкий уровень мотивации у первокурсников объясняется такими их психовозрастными характеристиками, как эмоциональная незрелость, открытость, внушаемость [5]. Но трудности, с которыми сталкиваются студенты, объясняются также и системой организации занятий. Среди опрошенных первокурсников 18% недовольны расписанием занятий; 44% отмечают, что учиться стало сложнее, чем школе; 43% признают наличие в учебной программе слишком сложных для понимания дисциплин; 51% не считают самостоятельную работу в вузе важной частью получения образования; 26% утверждают, что лекции читают слишком быстро; 17% не могут сохранять внимание в течении всей лекции; 8% плохо запоминают материал.

Адаптация к обучению в вузе включает в себя не только освоение академических дисциплин, но и формирование важных социально-личностных характеристик (ответственность, инициативность, дисциплинированность, коллективизм, уважение к людям [6]). Важное место здесь занимает навык выстраивания отношений с однокурсниками, который, согласно опросу, не развит у многих студентов: 4% респондентов испытывают дискомфорт в обществе сокурсников; 14% не общаются с ними вне института, а 15% избегают близких отношений; 17% не довольны выполнением совместных учебных заданий; 9% находятся в состоянии конфликта. Примерно каждый десятый студент негативно относится к своим сокурсникам, не хочет налаживать с ними контакт и только за первый месяц обучения уже имеет конфликты с ними.

Отношения между студентом и преподавателем значительно влияют на учебный процесс и зависят от многих факторов, в частности от уровня ожиданий обучающихся и их представлений о том, каким должен быть идеальный преподаватель [7,8]. Среди опрошенных 28% первокурсников считают, что преподаватели оценивают их неадекватно; 31% убеждены в плохом отношении преподавателей ко всем студентам, а 32% – лично к ним; 27% считают требования преподавателей завышенными; 7% находятся в состоянии конфликта. Таким образом, низкий уровень взаимопонимания между преподавателями и студентами приводит к конфликтам между ними уже на первом месяце обучения.

Обсуждение результатов психодиагностических методик. В студенческой среде широко распространены психологические затруднения и проблемы, которые зачастую являются проявлением психосоциальной дезадаптации и приводят к повышению непродуктивной агрессии и конфликтности [9]. Так, высокий уровень невротизации по Вассерману обнаружен у 23% студентов. Дезадаптивное поведение в нашем исследовании оценивалось по выраженности ранних дезадаптивных схем у студентов, результаты таковы: эмоциональная депривированность – 4%; недоверие/ожидание жестокого обращения – 11%; подавление эмоций – 21%; дефективность/стыд – 5%; социальная отчуждённость – 8%; зависимость/беспомощность – 1%; покинутость/нестабильность – 9%; уязвимость – 5%; спутанность/неразвитая идентичность – 3%; неуспешность – 7%; покорность – 6%; привилегированность/грандиозность – 12%; недостаток самоконтроля – 9%; самопожертвование – 5%; жёсткие стандарты/придирчивость – 17%; поиск одобрения – 19%; негативизм/пессимизм – 13%; пунитивность – 7%.

Уровень агрессии в нашем исследовании оценивался по тесту Басса–Дарки в модификации Г.В. Резапкиной, который позволяет не только выявить типичные для испытуемых формы агрессивного поведения, но и получить данные о склонности людей действовать определенным образом [10, 11]. Исследование проводилось в 2016 и 2019 годах.

1) Отмечается низкая распространённость физической агрессии в молодёжной среде: низкий уровень зарегистрирован у 56,4% опрошенных в 2016 г. и 52,4% – в 2019 г., а высокий только у 3,6% и 6,3% соответственно. Низкий уровень физической агрессии у юношей встречается в 1,5–2 раза реже (36,7% против 70,9% в 2016 г. и 43,3% против 63,7% в 2019 г.), а высокий в 1,5–5 раз чаще, чем у испытуемых женского пола (6,8% против 1,2% в 2016 г. и 7,7% против 4,5% в 2019 г.).

2) Высокий уровень косвенной агрессии в 2 раза чаще встречается у девушек (3,4% против 1,9% в 2016 г. и 5,7% против 2,9% в 2019 г.). Низкий уровень практически одинаково часто встречается как у девушек, так и у юношей (44,1% и 55,2% в 2016 г., 40,4% и 50,7% в 2019 г.).

3) Средний уровень раздражения наиболее распространен среди студентов и практически не имеет межполовых различий: 61,4% и 60,3% у юношей в 2016 и 2019 гг. соответственно, у девушек – 67,8% и 64,6%. Выраженное раздражение у девушек наблюдается в 2–3 раза

чаще (12,3% против 7,5% в 2016 г. и 18,9% против 6,8% в 2019 г.), а его низкий уровень в 2 раза реже, чем у юношей (19,9% против 31,1% в 2016 г. и 16,5% против 32,9% в 2019 г.).

4) В целом наблюдается преобладание среднего уровня негативизма (75,3% и 63,6% испытуемых в 2016 и 2019 гг.), что является показателем взросления. У девушек данный компонент агрессии выражен незначительно больше.

5) Для обоих полов выраженная обидчивость встречается достаточно редко (1,9% и 3,4% всех опрошенных в 2016 и 2019 гг. соответственно). Высокий уровень обидчивости преобладает у девушек (2,9% против 0,01% в 2016 г. и 4% против 2,9% в 2019 г.), и у них же примерно в 1,5 раза реже встречается её низкий уровень.

6) Уровень подозрительности в юношеском возрасте: низкий среди всех опрошенных зарегистрирован у 43,7% в 2016 г. и 37,9% в 2019 г, а средний – 53,5% и 48,5% соответственно. Существенных межполовых различий нет.

Заключение

Результаты исследования демонстрируют такие проблемы, как низкий уровень мотивации к учебе, освоению будущей профессии, неудовлетворенность отношениями с однокурсниками и преподавателями, высокий уровень дезадаптивных схем, ухудшение здоровья после поступления в вуз и др. В целом почти каждый пятый первокурсник в ТулГУ дезадаптирован и нуждается в психологической помощи. Психологическое благополучие молодёжи должно быть одним из приоритетных направлений деятельности вузов. Важно повышение информированности сотрудников и студентов о проблемах психического здоровья и возможных способах получения эффективной квалифицированной помощи. Особое внимание необходимо уделить адаптации первокурсников на пути их профессионального становления, т.к. они находятся в группе риска развития деструктивного и зависимого поведения, невротических и психосоматических заболеваний, маргинализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мачинская Р.И., Захарова М.Н., Ломакин Д.И. Регуляторные системы мозга у подростков с признаками девиантного поведения. Междисциплинарный анализ // Физиология человека. 2020. Т.46, № 3. С. 37–55.
2. Халилова З.Л., Макулова А.Б., Колесник М.А. Суицидальное поведение у студентов // Концепт. 2015. Т. 13. С. 3681–3685.
3. Воробьева М.А. Связь эмоционального интеллекта и синдрома эмоционального выгорания у студентов // Образование и наука. 2016. №4 (133). С. 80–92.
4. Горшков Е.А., Коротина Л.Д. Исследование эмоциональной тревожности студентов на разных этапах обучения в педагогическом вузе // Молодой ученый. 2015. №23(2) С. 46–51.
5. Карелин Д.О. Тревожность как личностный фактор суицидального риска у студентов вуза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №4. Публикация 1–3. С. 21–26.
6. Перескокова Т.А. О личном развитии студентов профессионального образования // НАУ. 2020. №59-1 (59). С. 17–20.
7. Ким И.Н. Студент и преподаватель в фокусе перемен // Высшее образование сегодня. 2017. №7. С. 14–22.
8. Игнатьев В.П., Архангельская Е.А. Образ идеального преподавателя будущего по мнению студентов и преподавателей // Педагогика. Психология. Философия. 2021. №4 (24). С. 53–60.
9. Иващенко Д.М. Психологические факторы развития агрессивного поведения в молодёжной среде // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №2. Публикация 7–1. С. 224–227.
10. Иващенко Д.М., Бурделова Е.В., Иващенко Л.В. Гендерные особенности агрессивного поведения в юношеском возрасте // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. 2020. № 6. С. 45–49.
11. Свободный Ф.К. Определение психологических склонностей личности преступника с помощью методики Басса-Дарки // Психопедагогика в правоохранительных органах. 2001. №2 (16). С. 114–118.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИЕЛИНИЗАЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА КАРТИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПРОТОННОЙ ФРАКЦИИ

А.А. Серегин, Д.А. Камаева

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

В работе исследованы изменения содержания миелина в головном мозге больных шизофренией с помощью неинвазивного, клинически ориентированного количественного метода визуализации – картирования макромолекулярной протонной фракции (МПФ). Были проанализированы МРТ изображения 31 больного шизофренией и 23 здоровых лиц. В результате у больных шизофренией показатель МПФ оказался достоверно снижен в сером ($p < 0,001$) и белом ($p = 0,02$) веществе. Показатель МПФ белого вещества при шизофрении показал отрицательную корреляцию с продолжительностью заболевания

(Pearson $r=-0,51$; $p=0,004$). Показано, что для шизофрении характерна глобальная микроскопическая гипомиелинизация головного мозга, связанная с длительностью заболевания. Нарушение миелинизации головного мозга при шизофрении можно обнаружить и количественно оценить с помощью метода картирования МПФ.

Ключевые слова: шизофрения, миелинизация, нейровизуализация, МРТ.

QUANTIFICATION OF BRAIN MYELINATION IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA BY MAPPING THE MOLECULAR FRACTIONS OF PROTONS

A.A. Seregin, D.A. Kamaeva

Research Institute of Mental Health, Tomsk NIMC, Tomsk, Russia

Annotation

In this work, changes in the content of myelin in the brain of patients with schizophrenia were studied using a non-invasive, clinically oriented quantitative imaging method - mapping of the macromolecular proton fraction (MPF). MRI images of 31 patients with schizophrenia and 23 healthy individuals were analyzed. As a result, in patients with schizophrenia, MMF was significantly reduced in gray ($p<0.001$) and white ($p=0.02$) matter. White matter MPF in schizophrenia was negatively correlated with disease duration (Pearson $r = -0.51$; $p=0.004$). It has been shown that schizophrenia is characterized by global microscopic hypomyelination of the brain associated with the duration of the disease. Impaired brain myelination in schizophrenia can be detected and quantified using the MPF mapping method.

Key words: schizophrenia, myelination, neuroimaging, MRI.

Актуальность. В последнее время нарушение миелинизации головного мозга при шизофрении вызывает значительный интерес [1, 2]. Недавно были разработаны несколько специфических МРТ методов визуализации миелина, основанных на эффекте переноса намагниченности [3, 4], которые не использовались для исследования больных шизофренией. Один из этих методов оценки плотности миелина с помощью молекулярной протонной фракции [5, 6] открывает возможность прижизненной количественной оценки миелинизации структур головного мозга [7–9]. МПФ был предложен как биомаркер миелина и продемонстрировал тесную линейную связь с содержанием миелина как в белом, так и в сером веществе и показал высокую специфичность МПФ к миелину [10]. Метод также продемонстрировал возможность количественной оценки минимальных изменений миелинизации на самых ранних стадиях внутриутробного развития мозга [8] и в ходе его созревания [9]. Это делает актуальной попытку применения данного метода для оценки миелинизации при шизофрении.

Цель исследования – определить количественные показатели миелинизации у больных шизофренией с использованием метода картирования макромолекулярной протонной фракции и изучить корреляцию содержания миелина с длительностью заболевания.

Материал и методы

В работе проанализированы МРТ головного мозга 31 больного шизофренией (F20.0, F20.6, МКБ 10) в возрасте $38,64\pm 8,98$ лет и длительностью заболевания $15,12\pm 7,26$ лет. Диагнозы выставлены врачами-психиатрами НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Контрольную группу составили 23 здоровых добровольца, сопоставленных по полу и возрасту с группой исследования. Критериями исключения для всех обследуемых лиц были: возраст старше 60 лет, наличие острых и хронических воспалительных, аутоиммунных или неврологических заболеваний, наличие других органических психических расстройств. Работа выполнена с соблюдением протокола, утвержденного комитетом по биомедицинской этике НИИ психического здоровья Томского НИМЦ в соответствии с Хельсинкской декларацией (протокол № 78/1 2019). МРТ изображения получены на томографе 1,5 Тл Magnetom (Siemens, Германия) согласно специально разработанному протоколу быстрого трехмерного картирования МПФ с изотропным пространственным разрешением $.25\times 1.25\times 1.25$ мм и общим временем сканирования 13 мин. Оценка среднего содержания миелина и соответствующих объемных характеристик проводилась с помощью методики количественного картирования макромолекулярной протонной фракции (МПФ) на основе одноточечного синтетического

эталонного алгоритма [5, 6] с помощью программного обеспечения FSL (FMRIB Software Library Vol. 6., Oxford, UK). Внечерепные ткани были исключены с помощью процедуры BET (Brain Extraction Tool), а затем сегментированы с использованием инструмента FAST (FMRIB's Automated Segmentation Tool) на четыре класса тканей: белое вещество, серое вещество, смешанное вещество и пограничный слой. Кроме оценки общего МПФ тканей мозга с использованием процедуры FIRST (Integrated Registration and Segmentation Tool), проведена сегментация гиппокампа и миндаля, для которых были рассчитаны средние значения МПФ без сегментирования на классы тканей. Результаты были проверены на нормальность при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения значений МПФ в тканях головного мозга между группами использовался многомерный ковариационный анализ (MANCOVA) с ковариацией по возрасту, значимость MANCOVA оценивалась Λ -критерием Уилкса. Оценка различий показателей подкорковых структур проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки взаимосвязи между показателями МПФ, возрастом и длительностью заболевания использовался коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты

Многомерный ковариационный анализ MANCOVA выявил значимое снижение плотности миелинизации у больных шизофренией ($\Lambda=0,67$, $p<0,001$) и незначительное влияние возрастной ковариаты ($\Lambda=0,89$, $F(3,49)=2,1$, $p=0,11$) на показатели МПФ в группах сравнения. При этом у пациентов с шизофренией обнаружено значительное снижение показателя средней МПФ во всех тканях головного мозга в сравнении со здоровыми добровольцами и наибольшее снижение МПФ в сером веществе (таблица).

Таблица

Значения МПФ (среднее значение \pm стандартное отклонение) в тканях головного мозга больных шизофренией и здоровых лиц

Группа	серое вещество		белое вещество		Смешанное вещество	
	МПФ (%)	λ -критерий Уилкса	МПФ (%)	λ -критерий Уилкса	МПФ (%)	λ -критерий Уилкса
Шизофрения	6,12 \pm 0,28	p<0,001	12,63 \pm 0,63	p=0,02	8,88 \pm 0,41	p=0,004
Контроль	6,44 \pm 0,24		13,04 \pm 0,56		9,22 \pm 0,40	

В результате корреляционного анализа Пирсона обнаружена значимая отрицательная корреляционная взаимосвязь в группе контроля между возрастом и показателем МПФ в сером веществе ($r=-0,45$, $p=0,03$) и тенденция к снижению МПФ белого вещества ($r = -0,34$, $p=0,11$) и смешанного вещества ($r = -0,40$, $p=0,06$). У больных шизофренией также была обнаружена значимая отрицательная корреляция слабой силы между возрастом и показателем МПФ в белом веществе ($r=-0,37$, $p=0,04$). Продолжительность болезни больных шизофренией в сравнении с МПФ показала значимую сильную корреляцию в белом веществе ($r= -0,51$ $p=0,004$) и корреляцию средней силы в пограничном слое между белым и серым веществом ($r=-0,37$ $p=0,04$). Выявленные корреляции сохранили значимость после поправки на возраст ($r = -0,39$, $p=0,04$ для смешанного вещества, $r = -0,38$, $p=0,04$ для белого вещества). Кроме того, в работе была проведена оценка содержания миелина в миндале и гиппокампе больных шизофренией и здоровых лиц. С помощью T-критерия Стьюдента выявлено статистически значимое снижение показателя МПФ миндаля слева у больных шизофренией ($p=0,037$) в сравнении со здоровыми лицами. Однако следует отметить, что у больных шизофренией прослеживается тенденция к снижению МПФ в миндале и гиппокампе по сравнению с контрольной группой. Не исключено, что факт нарушения миелинизации в данных структурах можно доказать при использовании МРТ сканеров более высокого разрешения.

Заключение

Наше исследование продемонстрировало, что шизофрения характеризуется глобальной микроскопической гипомиелинизацией головного мозга как в белом, так и в сером веществе, которую можно обнаружить и количественно оценить с помощью метода быстрого картирования МПФ. Результаты исследования позволяют предположить, что изменения миелинизации серого и белого вещества у пациентов с шизофренией могут иметь различные патологические механизмы. Однако обнаружено, что показатель МПФ в белом веществе имеет гораздо более сильную отрицательную корреляционную связь с продолжительностью заболевания по сравнению с серым веществом, и, возможно, такие различия могут свидетельствовать о разных временных промежутках дисмиелинизации белого и серого вещества при шизофрении. Это позволяет предположить, что демиелинизация серого вещества может

представлять собой признак быстрого прогрессирования заболевания на его ранней стадии либо указывать на двухстадийность шизофрении с точки зрения повреждения миелина, где дисмиелинизация серого вещества отражает нарушение интракорткальной связи в раннем проявлении болезни и затем следует постепенная демиелинизация белого вещества в процессе течения болезни [1, 2]. Корреляционный анализ также выявил значимые отрицательные корреляционные связи между длительностью заболевания и показателями МПФ в белом и смешанном веществе, которые оставались значимыми после поправки на возраст и, таким образом, снижение плотности миелина у пациентов не может быть объяснено изменениями миелинизации, связанными с нормальным старением. Полученные результаты подчеркивают важность изучения миелина для понимания биологических механизмов развития шизофрении и согласуются с результатами постмортальных и протеомных исследований [12]. Результаты исследования могут стать отправной точкой для начала применения метода быстрого картирования МРФ в клинической психиатрической практике.

Работа поддержана грантом РФФ 18-15-00053П.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gouvêa-Junqueira Danielle, Falvella Ana Caroline Brambilla, Antunes André Saraiva Leão Marcelo, Seabra Gabriela, Brandão-Teles Caroline, Martins-de-Souza Daniel, Crunfli Fernanda. Novel treatment strategies targeting myelin and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia // *Frontiers in Psychiatry*. 2020. V.11. DOI=10.3389/fpsy.2020.00379.
2. Raabe Florian J., Slapakova Lenka, Rossner Moritz J., Cantuti-Castelvetri Ludovico, Simons Mikael, Falkai Peter G., Schmitt Andrea. Oligodendrocytes as A New Therapeutic Target in Schizophrenia: From Histopathological Findings to Neuron-Oligodendrocyte Interaction // *Cells*. 2019. Vol. 8, №12. P. 1496.
3. Helms G., Dathe H., Kallenberg K. & Dechent P. High-resolution maps of magnetization transfer with inherent correction for RF inhomogeneity and T1 relaxation obtained from 3D FLASH MRI // *Magn. Reson. Med*. 2008. V. 60. P. 1396–1407.
4. Varma G., Duhamel G., de Bazelaire C. & Alsop D.C. Magnetization transfer from inhomogeneously broadened lines: a potential marker for myelin // *Magn. Reson. Med* 2015. V.73. P. 614–622.
5. Yarnykh V.L. Fast macromolecular proton fraction mapping from a single off-resonance magnetization transfer measurement// *Magn. Reson. Med*. 2012. Vol. 68. P. 166–178.
6. Yarnykh V.L. Time-efficient, high-resolution, whole brain three-dimensional macromolecular proton fraction mapping// *Magn. Reson. Med*. 2016. Vol. 75. P. 2100–2106.
7. Yarnykh V.L. Iron-insensitive quantitative assessment of subcortical gray matter demyelination in multiple sclerosis using the macromolecular proton fraction // *Am. J. Neuroradiol* 2018. Vol. 39. P. 618–625.
8. Korostyshevskaya A.M., Prihod'ko I.Y., Savelov A.A. & Yarnykh V.L. Direct comparison between apparent diffusion coefficient and macromolecular proton fraction as quantitative biomarkers of the human fetal brain maturation // *J. Magn. Reson. Imaging* 2019. Vol. 50. P. 52–61.
9. Corrigan N.M., Yarnykh V.L., Hippeb D.S., Owenb J.P., Huber E., Zhaoa T.C., Kuhla P.K. Myelin development in cerebral gray and white matter during adolescence and late childhood // *Neuroimage*. 2021. Vol. 227. P. 117678.
10. Mancini M., Karakuzu A., Cohen-Adad J., Cercignani M., Nichols T.E., Stikov N. An interactive meta-analysis of MRI biomarkers of myelin // *Elife*. 2020. e61523 DOI: 10.7554/eLife.61523.
11. Lake E.M. R. Altered intracortical myelin staining in the dorsolateral prefrontal cortex in severe mental illness// *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2017. Vol. 267. P. 369–376.
12. Смирнова Л.П., Логинова Л.В., Дмитриева Е.М., Серёгин А.А., Семке А.В., Симуткин Г.Г., Иванова С.А. Первые результаты сравнения протеомов сыворотки крови больных шизофренией и биполярным аффективным расстройством // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2016. Т. 2, № 91. С. 42–47.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ *GRIN2B* RS1805502 С ВЕДУЩЕЙ КЛИНИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКОЙ ШИЗОФРЕНИИ

В.В. Тигунцев, А.А. Гончарова, В.И. Герасимова, И.В. Пожидаев, Д.З. Падерина, Е.Г. Полтавская

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

Аннотация

Клинический полиморфизм шизофрении предполагает, что у различных пациентов на передний план может выходить как позитивная, так и негативная симптоматика, которая значительно хуже поддается коррекции. Согласно глутаматергической теории шизофрении, гены, чьи продукты участвуют в метаболизме глутамата, могут вносить вклад в предрасположенность к развитию шизофрении и формированию её клинической картины, в т.ч. ген *NR2B* субъединицы глутаматного NMDA рецептора *GRIN2B*. **Цель исследования** – сравнить частоты генотипов и аллелей *GRIN2B* rs1805502 в группах больных шизофренией с ведущей позитивной и негативной симптоматикой в русской популяции Сибирского региона. Обследовано 597 пациентов с установленным диагнозом шизофрения, проходивших

стационарное лечение в клиниках НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томской клинической психиатрической больницы, Кемеровской областной клинической психиатрической больницы. Ведущая симптоматика выявлялась в процессе клинического интервью и оценки по PANSS, а также из медицинской документации. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование *GRIN2B* rs1805502 проводили методом real-time PCR с использованием наборов SNP Genotyping Assay на приборе «StepOnePlus» (США). Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ SPSS 17.0. Распределение частот генотипов и аллелей оценивалось при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Не удалось обнаружить статистически значимых различий в частотах генотипов ($\chi^2=2,03$; $p=0,36$) и аллелей ($\chi^2=0,81$; $p=0,37$) изучаемого полиморфизма в группах пациентов с ведущей позитивной и негативной симптоматикой. Дальнейшие комплексные исследования способны пролить свет на роль генов глутаматергической системы в патогенезе и развитии клинической картины шизофрении, а также способствовать разработке программ индивидуальной фармакотерапии пациентов.

Ключевые слова: шизофрения, глутамат, глутаматергические рецепторы, генетика, однонуклеотидные полиморфизмы, ПЦР в реальном времени.

ASSOCIATION STUDY OF *GRIN2B* RS1805502 WITH LEADING CLINICAL SYMPTOMS OF SCHIZOPHRENIA

V.V. Tiguntsev, A.A. Goncharova, V.I. Gerasimova, I.V. Pozhidaev, D.Z. Paderina, E.G. Poltavskaya

Mental Health Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

Annotation

The clinical polymorphism of schizophrenia suggests that in various patients, both positive and negative symptoms can come to the fore. Negative symptoms are more difficult to treat compared to positive ones. According to the glutamatergic theory of schizophrenia, genes encoding the products involved in the metabolism of glutamate may contribute to the predisposition to the development of schizophrenia and the development of its clinical picture, including *GRIN2B* gene encoding the NR2B subunit of the NMDA receptor. **The aim of the study** was to compare the frequencies of genotypes and alleles of *GRIN2B* rs1805502 in groups of patients with schizophrenia with leading positive and negative symptoms in the Russian population of the Siberian region. We examined 597 patients diagnosed with schizophrenia who underwent inpatient treatment at the clinics of the Mental Health Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center, the Tomsk Clinical Psychiatric Hospital, and the Kemerovo Regional Clinical Psychiatric Hospital. Leading symptomatology was identified during the clinical interview and PANSS assessment, as well as from medical records. DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by the standard phenol-chloroform method. Genotyping of *GRIN2B* rs1805502 was performed by real-time PCR using SNP Genotyping Assay kits on the StepOnePlus instrument (USA). Statistical data processing was performed using the SPSS 17.0 software package. The distribution of genotype and allele frequencies was estimated using Pearson's χ^2 test with Yates correction. There were no statistically significant differences in the frequencies of rs7206256 polymorphism genotypes ($\chi^2=2,03$; $p=0,36$) and alleles ($\chi^2=0,81$; $p=0,37$) in groups of patients with leading positive and negative symptoms. Further comprehensive studies can shed light on the role of the genes of the glutamatergic system in the pathogenesis and development of the clinical picture of schizophrenia, as well as contribute to the development of an individual pharmacotherapy programs for patients.

Key words: schizophrenia, glutamate, glutamatergic receptors, genetics, single nucleotide polymorphisms, real-time PCR.

Актуальность. Клинический полиморфизм шизофрении предполагает, что у различных пациентов на передний план может выходить как позитивная симптоматика (галлюцинации, бред, психомоторное возбуждение), так и негативная (эмоциональное оскудение, апатия, социальное отчуждение) [1]. Негативные симптомы значительно хуже поддаются коррекции и часто служат основной причиной инвалидизации и социальной дезадаптации больных [2].

Глутаматергическая теория шизофрении находит подтверждение во многих исследованиях [3,4]. Согласно ей, гены, чьи продукты участвуют в метаболизме глутамата, могут вносить вклад в предрасположенность к развитию шизофрении и формированию её клинической картины. Ген *GRIN2B* кодирует субъединицу NMDA-рецептора, представителя суперсемейства ионотропных глутаматных рецепторов. В свою очередь, NMDA-рецепторы принимают

участие в глутаматергической нейротрансмиссии в центральной нервной системе. Есть данные, что их гипофункция связана с негативной симптоматикой шизофрении [5], а также публикации, показывающие вклад полиморфного варианта *GRIN2B* rs1805502 в развитие нейрокогнитивного дефицита при шизофрении [6].

Данная работа посвящена исследованию участия полиморфного варианта *GRIN2B* rs1805502 в формировании клинической картины шизофрении.

Цель исследования – сравнить частоты генотипов и аллелей полиморфизма *GRIN2B* rs1805502 в группах больных шизофренией с ведущей позитивной и негативной симптоматикой в русской популяции Сибирского региона.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 597 пациентов с установленным диагнозом шизофрении, проходившие стационарное лечение в клиниках НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томской клинической психиатрической больницы, Кемеровской областной клинической психиатрической больницы. Ведущая симптоматика выявлялась в процессе клинического интервью, оценки по PANSS [7] и из медицинской документации.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом. Генотипирование *GRIN2B* rs1805502 проводили методом real-time PCR с использованием наборов SNP Genotyping Assay на приборе Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) (ЦКП «Медицинская геномика», ТНИМЦ).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ SPSS 17.0. Распределение частот генотипов и аллелей оценивалось при помощи критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса.

Результаты. В группах пациентов с ведущей позитивной и негативной симптоматикой не было выявлено статистически значимых различий в частотах генотипов ($\chi^2=2,03$; $p=0,36$) и аллелей ($\chi^2=0,81$; $p=0,37$) изучаемого полиморфизма.

Заключение

Мы не смогли выявить статистически значимых результатов при изучении полиморфизма *GRIN2B* rs1805502, однако тема роли генов глутаматергической системы в патогенезе и развитии клинической картины шизофрении остаётся малоизученной до сих пор.

Дальнейшие комплексные исследования способны пролить свет на эту область биологической психиатрии, а также поспособствовать разработке программ индивидуальной фармакотерапии пациентов.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-15-00212 «Роль метилирования ДНК и полиморфизма генов глутаматергической системы в клинике, когнитивном дефиците и терапии шизофрении»; 2021-2023 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мосолов С.Н., Капилетти С.Г., Жигарева Н.П., Шафаренко А.А., Рыбкин П.В., Костюкова А.Б., Падкин С.Е. Длительная терапия сертинидом больных шизофренией с преобладанием негативной симптоматики // Современная терапия психических расстройств. 2011. № 2. С. 17–25.
2. Микилев Ф.Ф., Корнетова Е.Г., Лобачёва О.А., Корнетов А.Н., Семке А.В. Психометрическая оценка симптомов и клиническая динамика шизофрении в зависимости от конституционально-морфологического типа больных // Бюллетень сибирской медицины. 2016. Т. 15, № 2. С. 58–64. doi: 10.20538/1682-0363-2016-2-58-64.
3. Chiapponi C., Piras F., Piras F., Caltagirone C., Spalletta G. GABA system in schizophrenia and mood disorders: a mini review on third-generation imaging studies // Front. Psychiatry. 2016. Vol. 7, № 61. DOI: 10.3389/fpsy.2016.00061.
4. Кохан В.С. Дисбаланс глутамат/ГАМК в сравнительном анализе радиационного и травматического поражения коры головного мозга // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2019. Т. 53, № 6. С. 5–10.
5. Goff D.C., Evins A.E. Negative symptoms in schizophrenia: neurobiological models and treatment response // Harv. Rev. Psychiatry. 1998. Vol. 6, № 2. P. 59–77. DOI: 10.3109/10673229809000313.
6. Weickert C.S., Fung S.J., Catts V.S., Schofield P.R., Allen K.M., Moore L.T., Newell K.A., Pellen D., Huang X.F., Catts S.V., Weickert T.W. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia // Mol. Psychiatry. 2013. Vol. 18, № 11. P. 1185–1192. DOI: 10.1038/mp.2012.137.
7. Kay S.R., Opler L.A., Fiszbein A. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia // Fiszbein Schizophrenia Bulletin. 1987;13: 261–276.

РАССТРОЙСТВА ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ И НЕСУИЦИДАЛЬНЫЕ САМОПОВРЕЖДЕНИЯ У ПОДРОСТКОВ

Ю.В. Шапошникова, А.И. Косогова

КГБУЗ «Красноярский краевой психоневрологический диспансер № 1», г. Красноярск, Россия

Аннотация

В данной работе рассмотрена проблема несуйцидальных самоповреждений у подростков с расстройствами пищевого поведения. В ходе исследования у подростков выявлялись: акцентуации характера, высокий уровень тревоги и депрессии, недовольство своим внешним видом, тяжелое психоэмоциональное состояние, что приводило к несуйцидальным самоповреждениям.

Ключевые слова: расстройства пищевого поведения, несуйцидальные самоповреждения.

EATING DISORDERS AND NON-SUICIDAL SELF-HARM IN TEENAGERS

Yu.V. Shaposhnikova, A.I. Kosogova

KGBUZ «Krasnoyarsk regional psychoneurological dispensary No. 1», Krasnoyarsk, Russia

Annotation

In this paper, the problem of non-suicidal self-harm in adolescents with eating disorders is considered. During the study, adolescents revealed: accentuation of character, high level of anxiety and depression, dissatisfaction with their appearance, severe psycho-emotional state, which led to non-suicidal self-harm.

Key words: eating disorders, non-suicidal self-harm.

Актуальность. По данным многочисленных исследований за последние 20 лет, наблюдается значительный рост несуйцидальных повреждений. Сведения о распространённости несуйцидальных самоповреждений существенно, иногда в разы, различаются [1]. Начало несуйцидальных самоповреждений приходится в среднем на 14–16 лет [2, 3], хотя встречаются исследования, свидетельствующие о более раннем начале [4]. Естественным образом возрастает число тех, кто впервые нанес себе повреждения. В целом наблюдается закрепление в онтогенезе действий самоповреждающего характера как привычных для конкретного индивида, когда данные действия становятся частью модели, связанной с поведением в психологически нестабильных (стрессогенных) ситуациях. Peter Taylor показал, что для 63–78 % лиц, совершивших несуйцидальные самоповреждения, они выступали краткосрочной стратегией облегчения эмоционального дистресса, при этом данный способ решения проблем оказывает недолгую помощь, а в долговременной перспективе приводит лишь к ухудшению положения [5]. Также увеличивается численность подростков, страдающих расстройствами пищевого поведения. Все чаще расстройства пищевого поведения проявляются у лиц более молодого возраста. Для данной нозологии характерны многообразные клинические проявления (стремление снижать вес, идеи мнимой излишней массы тела, переядание, периодические очищения, нанесения самоповреждений), что, несомненно, затрудняет диагностику и влияет на выбор лечебной тактики. В последнее время зачастую у подростков с ранее выявленными расстройствами пищевого поведения наблюдаются несуйцидальные самоповреждения.

Цель исследования – выявление причин нанесения несуйцидальных самоповреждений при ранее выявленных расстройствах пищевого поведения.

Материал и методы

Всего обследовано 20 подростков женского пола. У всех девушек ранее диагностировано расстройство пищевого поведения, согласно МКБ-10 выставлен диагноз нервная булимия. Критерии включения: 1. Возраст 13–17 лет. Средний возраст 14±0,5 лет. 2. Наблюдение проводилось в течение 2021 г. на базе детского диспансерного отделения КГБУЗ ККПНД №1. 3.

Все наблюдаемые учились в общеобразовательных школах. 4. Нанесение поверхностных несуицидальных самоповреждений в период наблюдения. Критерии невключения: 1. Нанесение самоповреждений по бредовым мотивам. 2. Нанесение самоповреждений у пациентов с другими ранее выявленными психическими расстройствами. В ходе исследования использовались: клиническая беседа, патопсихологическое исследование (проективные методики, тест личностных акцентуаций (А.Е. Личко 1976), оценка эмоциональной сферы: уровень тревоги (цветовой тест Люшера 1949), оценка уровня депрессии (методика Дерогатис 1974, CDI (М.Ковач 1992), опросник о восприятии образа собственного тела (О.А. Скугаревский, С.В. Сивуха).

Результаты и обсуждение

В результате исследования по данным опросника личностных акцентуаций выявлено, что акцентуация характера выявляется у 17 подростков (85%) (смешанный тип акцентуации, эпилептоидный, истероидный, шизоидный типы). Отмечается высокий уровень тревожности у 10 подростков (50%), согласно проведенным методикам (цветовой тест Люшера, проективные методики). Средний уровень депрессии выявлен у 10 пациентов (50%) согласно методикам Дерогатис, CDI. Согласно опроснику о восприятии образа собственного тела, у всей группы наблюдаемых подростков выражена неудовлетворенность своим внешним видом. Во время клинической беседы подростки предъявляли жалобы на недовольство своим весом, внешним видом. Нанесение несуицидальных самоповреждений в виде самопорезов, ожогов от сигарет, являлись способом «наказания» себя за лишний вес у 3 подростков (15%), у 17 подростков (85%) с целью отвлечения от болезненных переживаний, облегчения тяжелого психоэмоционального состояния.

Выводы

Несуицидальные самоповреждения при расстройствах пищевого поведения, в частности при нервной булимии, наносятся подростками в связи с выраженной неудовлетворенностью своим внешним видом, высоким уровнем тревоги, депрессией, с целью облегчения тяжелого психоэмоционального состояния. У пациентов с нервной булимией чаще выявляются истероидный, эпилептоидный, шизоидный тип личностной акцентуации. Помимо фобических и дисморфофобических расстройств, у подростков с расстройством пищевого поведения, в том числе с нервной булимией, обнаруживается и другая психопатологическая симптоматика. У данных пациентов восприятие образа своего тела принимает специфическую психопатологическую форму, в качестве навязчивой сверхценной идеи выступает низкая масса тела. Дальнейший прогноз для данной группы пациентов напрямую зависит от своевременно оказанной психиатрической помощи и дальнейшей психологической поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Prinstein M.J.* Introduction to the special section on suicide and nonsuicidal self-injury: A review of unique challenges and important directions for self-injury science // *Journal of Consulting and Clinical Psychology.* 2008; 76(1):1–8.
2. *Nixon M.K., Cloutier P., Jansson S.M.* Nonsuicidal self-harm in youth: population-based survey // *Canadian Medical Association Journal.* 2007; 178(3):306–312.
3. *Klonsky E.D.* Non-suicidal self-injury in United States adults prevalence sociodemographic topography and functions // *Psychological Medicine.* 2011;41(09):1981–1986.
4. *Зинчук М.С., Аведисова А.С., Гехт А.Б.* Несуицидальное самоповреждающее поведение при психических расстройствах непсихотического уровня: эпидемиология, социальные и клинические факторы риска // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.* 2019. Т.119, №3, вып. 1-С. 108–119.
5. *Taylor P.J., Jomar K., Dhingra K., Forrester R., Shahmalak U., Dickson J.M.* A metaanalysis of the prevalence of different functions of non-suicidal self-injury // *Journal of Affective Disorders.* 2018. Vol. 227. P.759–769.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА И НЕЙРОБЛАСТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА, РАЗВИВАВШЕГОСЯ В УСЛОВИЯХ ВНУТРИУТРОБНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

С.Н. Шумилова^{1,2}

НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия²

Аннотация

В настоящий момент в мировой литературе представлено недостаточно данных, которые бы в полной мере описывали влияние внутриутробной алкоголизации на развитие сосудов микроциркуляторного русла (МЦР) и нейробластов головного мозга на модели человека. В данной работе на материале мозга человека, развивающегося в условиях пренатальной алкоголизации, был выявлен ряд морфометрических особенностей формирования сосудов и нейробластов большого мозга. В ходе исследования было выявлено значительное уменьшение размеров сосудов с увеличением срока гестации. Изменение нейробластного компонента в ответ на хроническую алкоголизацию, наоборот, характеризовалось значительным преобладанием размеров клеток по сравнению с контролем. Подсчет количества сосудов МЦР и нейробластов продемонстрировал значительное увеличение данного показателя с увеличением срока гестации в обоих случаях.

Ключевые слова: алкоголь, головной мозг, сосуды, нейробласты, развитие.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE MICROVASCULATURE VESSELS AND NEUROBLASTS OF THE HUMAN BRAIN THAT DEVELOPED UNDER CONDITIONS OF INTRAUTERINE ALCOHOLIZATION

S.N. Shumilova ^{1,2}

Mental Health Research Institute Tomsk NRMC, Tomsk, Russia¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

Annotation

At the moment, there are not enough data in the world literature that would fully describe the effect of intrauterine alcoholization on the development of microvasculature vessels (MCR) and brain neuroblasts in a human model. In the present work, on the material of the human brain developing under conditions of prenatal alcoholization, a number of morphometric features of the formation of blood vessels and neuroblasts of the brain were revealed. The study revealed a significant decrease in the size of the vessels with an increase in gestational age. On the contrary, changes in the neuroblast component in response to chronic alcoholism were characterized by a significant predominance of cell sizes compared to the control. Counting the number of MCR vessels and neuroblasts showed a significant increase in this indicator with an increase in gestational age in both cases.

Key words: alcohol, brain, blood vessels, neuroblasts, development.

Актуальность. Общеизвестно, что этиловый спирт оказывает неблагоприятное воздействие на процесс развития ЦНС [1]. Поскольку сосуды головного мозга непосредственно взаимодействуют с глиальными и нейрональными структурами, образуя гематоэнцефалический барьер и контролируя нейронную пролиферацию [2], наиболее значимо это воздействие на микроциркуляторное русло (МЦР) головного мозга эмбриона [3]. В настоящий момент в мировой литературе представлены данные, свидетельствующие о снижении плотности распределения и потере радиальной ориентации сосудов в ответ на внутриутробную алкоголизацию [4]. Помимо этого, имеются данные об уменьшении диаметра сосудов при воздействии этанола по сравнению с интактной группой [5].

Реакция клеточных компонентов нервной ткани характеризуется аномальной миграцией и измененным созреванием нейронов и глиальных клеток, снижением их числа, происходит задержка развития олигодендроцитов и усиление апоптоза их предшественников [6]. Описаны данные, свидетельствующие о замедлении формирования синаптических структур и снижении их способности участвовать в передаче импульсов, адресованных соседним клеткам [7]. Также имеются работы, согласно которым воздействие этанола проявляется изменением развития и функционирования нейробластов в виде апоптотической нейродегенерации вследствие ингибирования рецепторов NMDA [8].

Тем не менее практически отсутствуют данные, полученные на модели эмбрионального мозга человека. Результаты соответствующих работ на моделях животных нельзя полностью экстраполировать на человека.

Цель исследования – выявление количественных изменений, а также изменений размеров нейробластов и сосудов МЦР коры головного мозга эмбрионов и плодов человека, развивавшихся в условиях хронической алкоголизации организма матери; установление корреляционной связи между степенью дифференцировки перечисленных элементов и длительностью влияния патологического фактора (алкоголя) на процесс внутриутробного формирования ткани головного мозга.

Материал и методы

Дизайн исследования предполагал применение модели «случай-контроль». В работе был использован материал, полученный в ходе выполнения операций по искусственному прерыванию беременности по собственному желанию женщин. Всего было получено 26 эмбрионов и плодов человека. На основании срока гестации и условий развития полученные образцы были разделены на две группы, включавшие в себя по две подгруппы. Критериями включения в группу «Алкоголь» являлись: установленный диагноз «Алкоголизм I-II степени» (МКБ-10 – «Синдром алкогольной зависимости» F10.2), а также отсутствие факта употребления дисульфирама на протяжении всего периода беременности. Подгруппа «Алкоголь1» (A1) была сформирована из эмбрионов и плодов в возрасте 8–9 нед, а «Алкоголь2» (A2) – 10–11 нед внутриутробного развития. В группу «Контроль» были включены участницы без соматической или психической патологии, не имевшие контакта с тератогенными факторами и не употреблявшие алкоголь до и во время беременности. В подгруппу «Контроль1» (K1) были включены плоды на сроке 9 нед гестации, а «Контроль2» (K2) – 10–11 нед.

Процесс подготовки материала включал предварительное фиксирование в 1.5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М натрий-фосфатном буфере с pH 7,3–7,4 и дополнительное дофиксирование в однопроцентном растворе оксида осмия. Далее производилось обезвоживание в спиртах восходящих концентраций и заключение в эпоксидные смолы (Araldite). Для световой микроскопии использовались полутонкие срезы (0,5–1 мкм; ультратом «Ultracut-E» (Reichert, Австрия)), окрашенные толуидиновым синим по общепринятой методике. В работе использовались срезы на уровне промежуточного слоя. Микрофотосъемка проводилась с использованием светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) и камеры Canon G10.

Основным этапом исследования являлся морфометрический анализ, в ходе которого были оценены следующие параметры: средние периметр и диаметр каждого отдельного элемента (нейробласта или сосуда МЦР), а также среднее количество элементов на 1 мм² среза. Данные получались с использованием программы AxioVision 4.8 (рис. 1). Достоверность полученных данных проверялась с использованием критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$) в программы Statistica 10.

Результаты

На изучаемых сроках гестации сосуды МЦР дифференцированы на капилляры, вены и артериолы. Широкая капиллярная сеть представлена сосудами соматического типа – их стенка состоит из эндотелиоцитов, базальной мембраны, а также находящихся в её структуре перицитов и адвентициальных клеток. Для головного мозга характерно наличие венул безмышечного типа, стенка которых представлена эндотелиоцитами с рыхлой соединительнотканной оболочкой. В стенках артериол, напротив, отмечается расположение циркулярных гладкомышечных клеток. Средний диаметр сосудов варьируется в пределах 6–11 мкм. В просветах части сосудов отмечалось наличие форменных элементов крови.

Изучение морфометрических данных позволило установить, что для головного мозга, развивавшегося в нормальных условиях, характерно отсутствие значимых изменений размеров сосудов МЦР и умеренное увеличение их среднего количества с увеличением срока гестации (табл. 1). Это проявлялось отсутствием статистически значимых различий средней и удельной площадей сосудов среди групп K1 и K2, а также увеличением среднего количества сосудов МЦР на единицу площади для группы K2 по сравнению с K1 чуть менее чем вдвое.

Результаты, полученные в ходе изучения головного мозга, развивавшегося на фоне употребления матерью алкоголя, имели ряд значимых различий. В данном случае было выявлено постепенное уменьшение площадей сосудов при резком увеличении их количества. Были установлены достоверные статистические различия средней и удельной площадей сосудов среди групп A1 и A2, а также увеличение среднего количества сосудов МЦР на 1 мм² для группы A2 по сравнению в A1 почти в три раза.

Таблица 1

Динамика числовых показателей сосудов по группам

Анализируемый показатель	Средняя площадь, мкм ²	Удельная площадь сосудов, %	Количество сосудов на 1 мм ² , шт.
Контроль 1 (K1)	78,0	0,42	52
Контроль 2 (K2)	83,3	0,77	91
Алкоголь 1 (A1)	75,7	0,40	52
Алкоголь 2 (A2)	48,5 ^{(1),(2)}	0,37 ^{(1),(2)}	136

Примечание: 1 - достоверные отличия по сравнению с Контроль 2 (p<0.05); 2 - достоверные отличия по сравнению с Алкоголь 1 (p<0.05).

При сопоставлении групп «Алкоголь» и «Контроль» между собой было выявлено, что достоверные различия размеров сосудов МЦР имелись только среди групп A2 и K2 – отмечалось значительное преобладание размеров сосудов в группе K2. При сравнении групп A1 и K1 различий выявлено не было. В ходе анализа различий количества сосудов на единицу площади среза и в группах «Алкоголь», и в группах «Контроль» была выявлена общая закономерность – увеличение количества сосудов с увеличением внутриутробного возраста. Тем не менее прирост количества сосудов в A2 был значительно больше – почти в три раза в группах «Алкоголь» и менее чем в два раза в группах «Контроль».

Нейробласты представлены округлыми клетками с центрально расположенным ядром. Ядро имеет светлый матрикс, занимающий основной объем перикариона и включает в себя от 1 до 3 ядрышек. На этом фоне базофильная цитоплазма или нейтрофилы не выявляются. Клетки располагаются группами, размеры которых отличаются вариабельностью. Среди нейробластов отмечаются реактивные изменения, представленные появлением гиперхромных сморщенных и несморщенных клеток. В этих случаях отмечается выраженное расширение периваскулярного и перицеллюлярного пространства.

Морфометрические исследования нейробластного компонента нервной ткани позволили установить, что и в группах «Алкоголь», и в группах «Контроль» происходит уменьшение размеров нейробластов с увеличением срока гестации (табл. 2). Это проявляется статистически достоверным преобладанием средних площадей и периметров нервных клеток в группах A1 и K1 над таковыми в A2 и K2 соответственно. Тем не менее, при сравнении групп «Алкоголь» и «Контроль» между собой было выявлено, что нейробласты в образцах, полученных от матерей, которые употребляли алкоголь, имеют меньшие темпы снижения показателей площади и периметра с увеличением внутриутробного возраста. Об этом свидетельствует достоверное преобладание средних площадей и периметра в группе K2 по сравнению с группой A2.

Изменение количественных данных нейробластов имеет сходную с изменением соответствующих показателей сосудов МЦР тенденцию: по мере увеличения гестационного возраста происходит значительное увеличение клеточной популяции. Хотя изначально в группе A1 по сравнению с K1 было большее среднее количество нейробластов на единицу площади среза, темпы прироста для групп «Алкоголь» и «Контроль» являлись примерно одинаковыми.

Таблица 2

Динамика численных показателей нейробластов в исследуемых группах

Анализируемый показатель	Средняя площадь, мкм ²	Средний диаметр, мкм	Количество нейронов на 1 мм ² , шт.
Контроль 1 (K1)	39,3	7,0	945
Контроль 2 (K2)	19,2 ¹	5,1 ¹	8295
Алкоголь 1 (A1)	35,2 ¹	6,5 ¹	1574
Алкоголь 2 (A2)	25,4 ^{(2),(3)}	5,6 ^{(2),(3)}	7790

Примечание: 1 - достоверные отличия по сравнению с Контроль 1 (p<0.05); 2 - достоверные отличия по сравнению с Контроль 2 (p<0.05); 3 - достоверные отличия по сравнению с Алкоголь 1 (p<0.05).

Заключение

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что внутриутробная алкоголизация оказывает значительное влияние на формирование морфологической структуры головного мозга эмбрионов. Данное влияние проявляется уменьшением размеров клеточных

и сосудистых структур и диспропорциональностью развития компонентов ткани мозга, прогрессирующей со сроком развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. *De la Monte S.M., Kril J.J.* Human alcohol-related neuropathology // *Acta Neuropathol.* 2014. Vol. 127, № 1. P. 71–90.
2. *Pombero A., Garcia-Lopez R., Estirado A., Martinez S.* Vascular pattern of the dentate gyrus is regulated by neural progenitors // *Brain Struct Funct.* 2018 V.223, № 4. P. 1971-1987
3. *Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcorelles P., Marret S., Gonzalez B.J.* PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure // *Acta Neuropathol Commun.* 2017. № 5 (1). P. 44.
4. *Jégou S., El Ghazi F., de Lendeu P.K., Marret S., Laudenbach V., Uguen A., Marcorelles P., Roy V., Laquerrière A., Gonzalez B.J.* Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain // *Ann Neurol.* 2012. Vol. 72. P. 952–960.
5. *Raghunathan R., Wu C., Singh M., Liu C.H., Miranda R.C., Larin K.V.* Evaluating the effects of maternal alcohol consumption on murine fetal brain vasculature using optical coherence tomography // *J Biophotonics.* 2018. Vol. 11. № 5.
6. *Wilhelm C.J., Guizzetti M.* Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective // *Frontiers in integrative neuroscience.* 2016. Vol. 9. P. 65.
7. *Солонский А.В., Логвинов С.В.* Ультраструктурные и морфометрические особенности синаптогенеза мозга эмбрионов и плодов человека в условиях пренатального воздействия этанола // *Бюллетень сибирской медицины.* 2008. Т. 7, № 2. С. 35–39.
8. *Bird C.W., Barber M.J., Post H.R., Jacquez B., Chavez G.J., Faturos N.G., Valenzuela C.F.* Neonatal ethanol exposure triggers apoptosis in the murine retrosplenial cortex: Role of inhibition of NMDA receptor-driven action potential firing // *Neuropharmacology.* 2020. Vol. 162. P. 107837.

ФАРМАКОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТКАНЕВОГО КРОВотоКА МИОКАРДА МЕТОДОМ ОФЭКТ, ПО ДАННЫМ ОЦЕНКИ НАКОПЛЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ МИКРОСФЕР РАДИОФАРМПРЕПАРАТА ^{99m}Tc-ТЕХНЕТРИЛ

В.Ю. Баби́ков², В.Ю. Усов^{1,2}, В.В. Удут²

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹
Томский НИМЦ РАН, г. Томск, Россия²

Аннотация

Количественный расчет тканевого кровотока средствами радионуклидной эмиссионной томографии (однофотонной – ОФЭКТ) имеет большое значение при исследованиях кровоснабжения миокарда. Мы попытались разработать методику расчета тканевого кровотока в мл/мин/100 г, для количественной оценки кровоснабжения сердечной мышцы, по данным определения при КардиоОФЭКТ тканевого поглощения ^{99m}Tc-Технетрила в абсолютных единицах – МБк/см³. Были использованы данные обследования 14 пациентов с перенесенным инфарктом миокарда, которым была проведена ОФЭКТ с ^{99m}Tc-Технетрилом, с расчетом тканевого кровотока по представленному методу. При расчете РКМ в покое в области интактного непораженного миокарда рМиоК = 65х7 мл/мин/100 г, в сегментах с наличием жизнеспособного миокарда по данным ультразвуковой пробы с дипиридамолом рМиоК = 53 ± 7 мл/мин/100 г, тогда как в постинфарктных регионах трансмурального повреждения стенки левого желудочка без наличия жизнеспособного миокарда рМиоК = 27х8 мл/мин/100 г.

Ключевые слова: кровоток миокарда, количественная ОФЭКТ, химические микросферы, ^{99m}Tc-Технетрил, ^{99m}Tc-МИБИ

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF TISSUE MYOCARDIAL BLOOD FLOW BY SPECT, ACCORDING TO THE ASSESSMENT OF THE ACCUMULATION OF CHEMICAL MICROSPHERES OF THE RADIOPHARMACEUTICAL ^{99m}Tc-TECHNETRIL

V.Yu. Babikov², W.Yu. Ussov^{1,2}, V.V. Udut²

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹
Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

Annotation

Quantitative calculation of tissue blood flow with emission tomography (single-photon - SPECT) is of great importance in studies of myocardial blood supply. The most accessible method of radionuclide diagnostics in the routine practice of a doctor is SPECT. A unique radiopharmaceutical is ^{99m}Tc-Technetrit (MIBI - methoxyisobutylisonitrile). We tried to develop a methodology for calculating tissue blood flow in ml/min/100 g, to quantify the blood supply to the heart muscle, from the quantification of tissue uptake of ^{99m}Tc-Technetrit in absolute units – as MBq/cm³, using CardioSPECT. **Theory of the method.** We used examination data of 14 patients with myocardial infarction, who underwent SPECT with ^{99m}Tc-Technetrit, with the calculation of tissue blood flow according to the presented method. When calculating the rMBF at rest in the area of intact unaffected myocardium, rMBF = 65x7 ml/min/100 g, in segments with the presence of a viable myocardium according to an ultrasound test with dipyridamole, rMBF = 53 ± 7 ml/min/100 g, whereas in postinfarction

regions of transmural damage of the left ventricle without the presence of a viable myocardium $rMBF = 27 \times 8 \text{ ml/min/100 g}$.

Key words. Myocardial blood flow, Quantitative SPECT, Chemical Microspheres, ^{99m}Tc -Technetrit, ^{99m}Tc -MIBI

Актуальность. В исследованиях кровоснабжения сердечной мышцы в различных диагностических и лечебных ситуациях количественная оценка на основе расчетов тканевого кровотока методами радионуклидной эмиссионной томографии (позитронной – ПЭТ, и однофотонной – ОФЭКТ) имеет исключительное значение для кардиологии. Потребность в общедоступной методологически относительно несложной технологии определения тканевого кровотока миокарда постоянно возрастает [1].

Уникальным радиофармпрепаратом (РФП) с высокой и примерно одинаковой фракцией экстракции (ФЭ) как опухолями различных локализаций и гистологических типов, так и миокардом – «химическими микросферами», является ^{99m}Tc -Технетрил (МИБИ – метоксиизобутилизонитрил) [2, 3]. Он широко используется для качественной и полуколичественной визуализации миокардиального кровотока и количественного расчета кровотока в мл/мин/100 г ткани [4–6].

Возможность автоматического расчета на гамма-камере достигалась за счет выполнения ОФЭКТ с фантомами в том же режиме, что и исследование у пациентов, построения регрессионной зависимости «активность КБк/см³– сцинтилляционный счет на воксел» и определения по ней истинного накопления РФП в ткани, как КБк/см³ [7, 8].

Цель исследования – разработка методики расчета тканевого кровотока в мл/мин/100 г , на основе принципа «химических микросфер», для количественной оценки кровоснабжения сердечной мышцы, по данным определения при КардиОФЭКТ тканевого поглощения ^{99m}Tc -Технетрила в абсолютных единицах – КБк/см³.

Материал и методы

В случае если распределение РФП – «химических микросфер» (^{99m}Tc -Технетрила или сходного ^{99m}Tc -Тетрафосфина) в организме пропорционально кровотоку, т.е. органные фракции поглощения РФП равны органным фракциям сердечного выброса, как было ранее показано для этих препаратов Н.Г. Кривоноговым и соавт. (2010), то тогда

$$p_{\text{МиоК}} = [(U_{\text{миос}} / D_{^{99m}\text{Tc-MIBI}}) * 100 / V_{\text{миос}}] * MO,$$

где $p_{\text{МиоК}}$ – регионарный кровоток миокарда в мл/мин/100 г , $U_{\text{миос}}$ – накопление РФП в исследуемом регионе в МБк, $D_{^{99m}\text{Tc-MIBI}}$ – полная доза введенного РФП в МБк, MO – минутный объем сердечного выброса в мл/мин , $V_{\text{миос}}$ – объем миокарда данного региона. Определение величины $U_{\text{миос}}$ может быть прямо выполнено с помощью ОФЭКТ путем коррекции локального счета в области миокарда на томосрезе на чувствительность детектора, определенную тут же при ОФЭКТ градуированного фантома [9–11].

Мы использовали данные обследования 14 пациентов с перенесенным инфарктом миокарда, которым была проведена КардиОФЭКТ с ^{99m}Tc -Технетрилом, с расчетом тканевого миокардиального кровотока по представленному методу.

В качестве контрольной группы послужили 7 пациентов без клинически значимой патологии сердечно-сосудистой системы.

Препарат ^{99m}Tc -МИБИ (^{99m}Tc -Технетрил) приготавливался как предписано производителем (НИИ Биофизики ФМБА России). Пациенту болюсно вводился РФП ^{99m}Tc -Технетрил в дозе 650–740 МБк.

Вслед за этим пациенту проводилась ОФЭКТ сердца, записывалось 32 планарных скана в матрицу 64×64 элемента изображения, 30 с на позицию, с оборотом детектора на 180° вокруг левой половины грудной клетки (РАО 40° – ЛРО 140°), с набором не менее 50 000 импульсов сцинтилляционного счета на позицию.

В том же режиме также записывалось изображение фантома, содержавшего во флаконах с физраствором инъекционный ^{99m}Tc -Технетрил в количествах 1, 3, 5, 7, 9 КБк, для последующего пересчета сцинтилляционного локального счета ^{99m}Tc -Технетрила в ткани сердечной мышцы в абсолютную величину накопления РФП в НИ (рис. 1).

По данным планарных проекций восстанавливались поперечные срезы распределения радиофармпрепарата в грудной клетке, методом обратных фильтрованных проекций (фильтр Парзена) с использованием алгоритма программного пакета Сцинти 4.0 (НПФ Гелмос, Россия). Затем восстанавливались срезы миокарда левого желудочка, анатомически ориентированные по его длиннику, в частности, в четырехкамерной позиции (рис. 2).

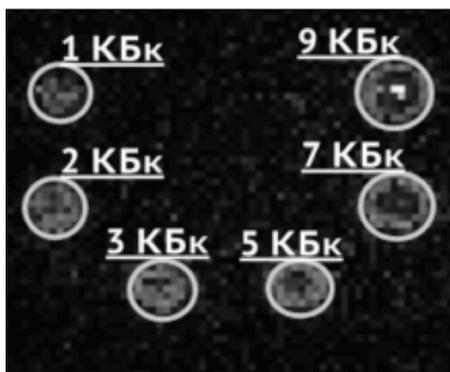


Рис. 1. Реконструированная ОФЭКТ (поперечные срезы) фантома, содержащего в стандартных флаконах по 15 мл активность ^{99m}Tc-Технетрила в количествах от 1 до 9 КБк

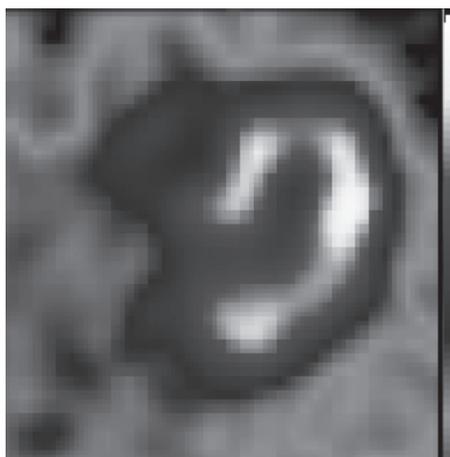


Рис. 2. Типичный перфузионный томосрез сердца при КардиОФЭКТ с ^{99m}Tc-Технетрилом

Результаты по группам сравнивались с использованием критерия Стьюдента для непарных выборок с использованием пакета прикладных программ для статобработки и представления результатов Origin 6.1 (Origin Lab, Техас) и представлены как среднее ± ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

По данным измерений фантомов, чувствительность использованных нами гамма-камер с коллиматорами высокого разрешения для ^{99m}Tc составила соответственно, для Gemini 700 – 4 800 (имп/с)/(МБк/мл), а для Symbia T16 – 12 000 (имп/с)/(МБк/мл).

Нормальные величины кровотока в различных регионах левого желудочка, полученные нами в контрольной группе лиц без заболеваний сердечно-сосудистой системы, во всех случаях превосходили 62 мл/мин/100 г ткани (в среднем 67 ± 3 мл/мин/100 г) и не отличались достоверно между различными бассейнами коронарного русла (рис. 3).

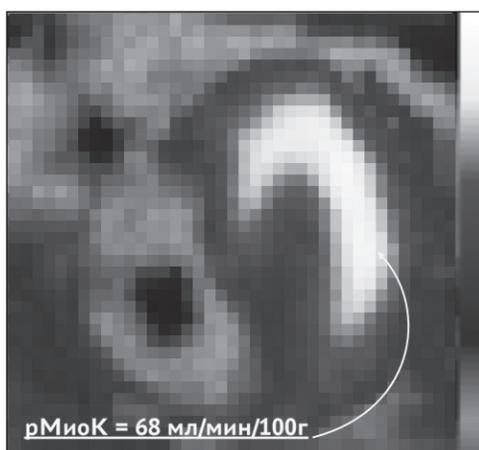


Рис. 3. Перфузионная КардиОФЭКТ с ^{99m}Tc-Технетрилом у пациента контрольной группы без признаков заболеваний сердечно-сосудистой системы, реконструированная по длинной оси левого желудочка

Величины кровотока в различных участках сердечной мышцы у пациентов с перенесенным острым инфарктом миокарда, представлены в таблице, а визуально – на рис. 4.

Таблица

Регионарный миокардиальный кровоток (рМиоК, как мл/мин/100 г) в регионах с различной жизнеспособностью миокарда после перенесенного ранее ОИМ в бассейне кровоснабжения ЛКА. n – количество сегментов миокарда с соответствующей картиной

	Интактный неповрежденный миокард (n = 153) Intact nonischemic myocardium	Сегменты с наличием жизнеспособного миокарда (n = 38) Segments with the presence of a viable myocardium	Участки необратимого повреждения с трансмуральными рубцовыми изменениями (n = 47) Areas of irreversible damage with transmural scarring
рМиоК, мл/мин/100 г MBF, as ml/min/100g	65 ± 7	53 ± 7 p < 0,05	27 ± 8 p < 0,002

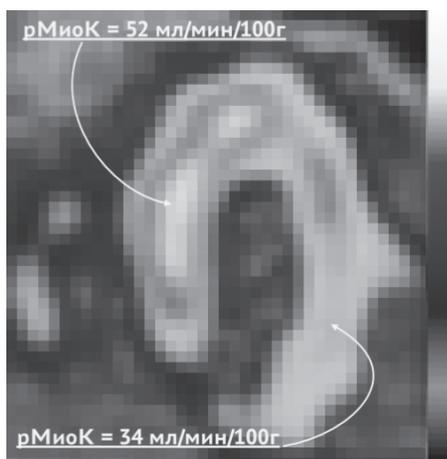


Рис. 4. Перфузионная КардиоОФЭКТ с ^{99m}Tc-Технетрилом у пациента, перенесшего за 4 мес перед этим острый трансмуральный инфаркт миокарда в бассейне левой огибающей ветви, реконструированная по длинной оси левого желудочка

При расчете РКМ в покое в области интактного непораженного миокарда рМиоК = 65x7 мл/мин/100 г, в сегментах с наличием жизнеспособного миокарда по данным ультразвуковой пробы с дипиридамолом рМиоК = 53 ± 7 мл/мин/100 г, тогда как в постинфарктных регионах трансмурального повреждения стенки левого желудочка без наличия жизнеспособного миокарда рМиоК = 27 x 8 мл/мин/100 г.

Заключение

Расчет тканевого кровотока в абсолютных физиологических единицах – мл/мин/100 г ткани, по данным ОФЭКТ – определения тканевого поглощения РФП химических микросфер ^{99m}Tc-Технетрила в абсолютных величинах (МБк/см³), может использоваться для патофизиологической оценки кровоснабжения сердечной мышцы, при использовании гамма-камер с встроеной калибровкой и/или при калибровке по фантому.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Шляхто Е.В., Баранова Е.И. Основные направления снижения сердечно-сосудистой смертности: что можно изменить уже сегодня? //Российский кардиологический журнал. 2020. Т. 25(7). С. 10–18. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3983
2. Лшманов Ю.Б., Чернов В.И., Кривоногов Н.Г., Малышева А.О., Веснина Ж.В., Реброва Т.Ю., Ефимова И.Ю. Фармакокинетические и скintiграфические исследования ^{99m}Tc-Техникарда в эксперименте // Медицина труда и промышленная экология. 1995. № (9). С. 6–9.
3. Babushkina T.A., Sergeev V.V., Medvedeva E.I., Malysheva A.O., Kodina G.E. ¹H NMR and Mössbauer studies of the main components of radiopharmaceutical «^{99m}Tc -Tekhnetril» preparation.// Russian Journal of Coordination Chemistry. 1996. Vol. 22 (9). P. 639–641.
4. Stukanov S.L., Ussov W.Yu., Kolomiets S.A., Ryannel Yu.E., Velichko S.A., Zyryanov B.N. SPECT with ^{99m}Tc-Technetrl in lung cancer // Medical Radiology and Radiation Safety. 1996. Vol. 41(6). P. 11–15.
5. Ussov W.Yu., Riannel Yu.E., Slonimskaya E.M., Velichko S.A., Kalashnikov S.D., Mihailovic J.M., Scopinaro F. Quantification of breast cancer blood flow in absolute units using Gjedde-Rutland-Patlak analysis of ^{99m}Tc-MIBI uptake // Nuclear Medicine Review CEE. 1999. Vol. 2(1). P. 4–11.
6. Усов В.Ю., Питерс А.М., Барышева Е.В., Бородин О.Ю., Майерс М.Д., Тюкалов Ю.И. Количественная оценка кровотока злокачественных опухолей костей и мягких тканей по данным динамической скintiграфии с ^{99m}Tc-МИБИ.// Медицинская визуализация. 2003. № 4. С. 114–123.
7. Усов В.Ю., Гарганеева А.А., Федоров А.Ю., Карпов П.С. Оценка кровотока миокарда в абсолютных единицах методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с ^{99m}Tc-Технетрилом(МИБИ). Методика и клиническая апробация при ИБС // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 1998. № 43(4). С. 30–36.

8. *Ussov W.Yu., Solov'ev O.V., Garganeeva A.A., Teplyakov A.T., Karpov R.S.* Quantitative scintigraphic evaluation of molsidomine effects on myocardial blood flow of coronary patients during exercise test. *Changjiang Liuyu Ziyuan Yu Huanjing*. 1998. Vol. 7(4). P. 28–35.

9. *Petretta M., Storto G., Pellegrino T., Bonaduce D., Cuocolo A.* Quantitative Assessment of Myocardial Blood Flow with SPECT // *Prog Cardiovasc Dis*. 2015. Vol. 57(6). P. 607–14. doi: 10.1016/j.pcad.2014.12.007

10. *Moretti J.L., Hauet N., Caglar M., Rebillard O., Burak Z.* To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells // *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005. Vol. 32(7). P. 836–842. doi: 10.1007/s00259-005-1840-x

11. *Bailly M., Thibault F., Courtehoux M., Metrard G., Ribeiro M.J.* Added Value of Myocardial Blood Flow Quantification and Calcium Scoring During CZT SPECT Myocardial Perfusion Imaging for Coronary Artery Disease Screening // *Clin Nucl Med*. 2019. Vol. 44(11). P. e617-e619. doi: 10.1097/RLU.0000000000002709

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ ПЕРЕВЯЗОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ЛЕЧЕБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА ОСНОВЕ ДИАЛЬДЕГИДЦЕЛЛЮЛОЗЫ

А.А. Ванюшенкова, А.А. Белов

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, кафедра биотехнологии, г. Москва, Россия

Аннотация

Создание композиций с пролонгированным, контролируемым выделением активного вещества, обладающих адресностью по отношению к пораженному органу, является одним из самых перспективных направлений разработки ранозаживляющих препаратов. При этом важным аспектом обеспечения процесса заживления ран является подбор соответствующих повязок. Правильный выбор позволяет обеспечить правильную поддерживающую терапию, сопровождающую лечение первопричины. Одной из главных проблем, встающих перед разработчиком подобных композиций, является обеспечение пролонгированного действия и контролируемого высвобождения активного вещества, способствующего достижению полноценного терапевтического эффекта с сохранением всех необходимых свойств на достаточном для ранозаживления уровне. Одной из самых распространенных основ для иммобилизации являются биополимеры, в частности, полисахариды. Однако в большинстве своем они требуют предварительной функционализации перед со-иммобилизацией на них биологически активных веществ. Современные перевязочные материалы разрабатываются и производятся на основе диальдегидцеллюлозы, хитозана и различных лечебных средств (в том числе ферментов). Диальдегидцеллюлоза, в отличие от нативной целлюлозы, подвержена значительной гидролитической и биологической деградации в организме человека при физиологических условиях. В работе была изучена кинетика гидролитической деструкции материалов на основе модифицированной целлюлозы. Процесс деструкции начинается сразу после помещения аппликации в модельную среду. При экспозиции происходит как деструкция непосредственно матрицы, так и разрыв связей носителем – терапевтический агент (ТА). В рану выделяются иммобилизованные лекарственные средства, а также альдегидсодержащие осколки носителя, обладающие антиоксидантными и биоцидными свойствами. Токсикологические исследования показали, что изученные носители и продукты их деструкции не обладают токсическим действием, не вызывают аллергических реакций и не являются мутагенами. Предложен механизм выделения терапевтического агента в раневую полость. В момент экспозиции аппликации на поврежденный участок выделяется ударная доза активного вещества, способствующая очищению раны от гнойного отделяемого; дальнейшее контролируемое выделение ТА в раневой канал обеспечивает пролонгированное терапевтическое действие перевязочного средства.

Ключевые слова: механизм действия, диальдегидцеллюлоза, хитозан, терапевтический агент, материалы для ранозаживления, ферменты.

STUDY OF THE ACTION'S MECHANISM OF WOUND-HEALING DRESSINGS WITH PROLONGED THERAPEUTIC EFFECT ON THE BASE OF DIALDEHYDECELLULOSE

A.A. Vaniushenkova, A.A. Belov

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (MUCTR), dep. Biotechnologies, Moscow, Russia

Annotation

The creation of compositions with a prolonged, controlled release of the active substance, which is targeted to the affected organ, is one of the most promising areas for the wound healing drugs's development. One of the most important aspects of ensuring the wound healing process is the selection of appropriate dressings at the same time. The right choice allows to provide the right maintenance therapy that accompanies the treatment of the underlying cause. One of the most common bases for immobilization is biopolymers, in particular polysaccharides. However, most require a preliminary functionalization prior to co-immobilization of biologically active substances on them. Modern dressings are developed and produced from cellulosic dialdehyde, chitosan and a variety of therapeutic agents (including enzymes). Unlike native cellulose, dialdehyde cellulose undergoes extensive hydrolytic and biological degradation in the human body under physiological conditions. In this work, the kinetics of the hydrolytic degradation of modified cellulose materials has been investigated. The destruction process begins immediately after the application is placed in the simulation environment. During exposure, both the destruction of the matrix itself and the breaking of the carrier - therapeutic agent (TA) bonds occurs. Immobilized drugs are released into the wound, as well as aldehyde-containing fragments of the carrier, which have antioxidant and biocidal properties. Toxicology studies have shown that the carriers studied and their degradation products are non-toxic, do not cause allergic reactions and are not mutagenic. Treatment agent's release mechanism in the wound cavity is proposed. The loading dose of the active substance is released at the time of exposure of the application to the damaged area. It helps to clean the wound from the purulent discharge. The controlled release of TA into the wound duct provides a prolonged therapeutic effect of dressing.

Keywords: Action mechanism, dialdehyde cellulose, chitosan, therapeutic agent, wound healing materials, enzymes.

Актуальность.

По данным Минздрава РФ [1], одну из лидирующих позиций по частоте обращения в медицинские учреждения на территории Российской Федерации занимают случаи с ожоговыми и раневыми повреждениями. При этом контаминации именно раневого ложа являются одними из наиболее распространенных среди всех нозокомиальных инфекций.

Среди всего перечня лекарственных средств, представленных на рынке, гелевые и аппликационные формы ранозаживляющих средств занимают значительную нишу. Материалы данного спектра являются препаратами местного действия, что позволяет обеспечить направленность действия активного вещества, входящего в их состав.

Ранозаживляющие композиции с включенными в их состав протеолитическими ферментами выступают в роли биологического скальпеля. Они способствуют полноценному очищению раневого канала от детрита, а также, согласно литературе, обеспечивают биоцидный и антиоксидантный эффект [2].

Однако несмотря на то, что существует значительное количество научных разработок по данной теме, создание и изучение механизма действия подобного препарата, обладающего комплексным действием, все еще является актуальной проблемой.

Цель исследования – создание и исследование свойств полиферментных хитозансодержащих материалов на основе модифицированной целлюлозы и ее производных для медицинских целей, в частности, изучение механизма действия полученных композиций в условиях раны.

Материал и методы

В работе использовали: хитозан (Хт) производства НПО «Биопрогресс» (г. Щелково, МО, РФ) (влажность препарата 10%, степень деацелирования 80,0%; кинематическая вязкость не менее 383,7 сСт; молекулярная масса около 500 кДа), протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ПК) (протеолитическая активность по казеину 0,9 ПЕ/мг; активность по ВАРNA 43 нМоль/мг*мин; активность по азоколлу 28 ЕД/мг, НПО «Биопрогресс» МО г. Щелково, Россия. Все остальные реактивы, если не оговорено особо, отечественного производства, квалификации не ниже «ХЧ».

Результаты

В ходе работы нашей исследовательской группы, были синтезированы, а также изучены описываемые в данном исследовании ранозаживляющие перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием на основе окисленной целлюлозы, хитозана и ферментных комплексов. Схемы последовательного получения препаратов представлены на рис. 1.

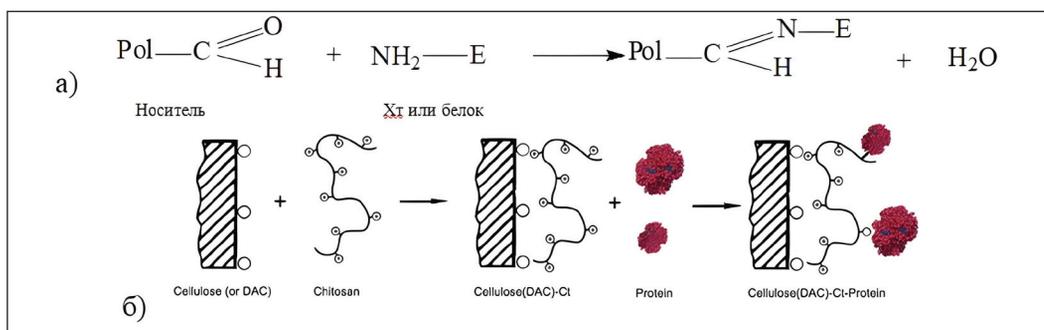


Рис. 1. Принципиальная схема получения иммобилизованных препаратов: а – схема иммобилизации хитозана и/или фермента на ДАЦ; б – поэтапная схема получения иммобилизованного препарата

Основными отличительными свойствами препаратов, произведенных по вышеописанной схеме, являются значительная сорбционная емкость по раневому экссудату, пролонгированный выход терапевтического агента в раневую полость за счет одновременно происходящей деструкции целлюлозной матрицы и разрыва связей между носителем и хитозаном, а также возможность со-иммобилизации ТА для обеспечения комплексности [3].

Основным для разрабатываемого перевязочного средства является биохимический механизм действия.

При помещении на раневую поверхность, аппликация смачивается раствором, содержащим обезболивающий агент, при необходимости. Согласно данным УФ-спектрофотометрии, в жидкой среде, отвечающей условиям раны (раствор фосфатного буфера рН 6,2, температура 37 °С), начинаются процессы деструкции [4]. Происходит разрушение матрикса носителя, начиная с наиболее лабильной ее части – аморфных структур. Деструкция протекает с выделением альдегидсодержащих осколков матрицы, что подтверждается пиком в области 240 нм, характеризующим наличие альдегидных групп. Для определения свойств выделяемых фрагментов окисленной целлюлозной матрицы были проведены исследования по определению антиоксидантной активности с применением 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила, определению биоцидного действия по отношению к культурам *St. Aureus* и *E. Coli*, а также определению их влияния на ферментативную активность включенных протеаз на примере ПК. Согласно полученным данным, продукты деструкции ДАЦ обладают антирадикальной активностью, увеличивающейся с увеличением степени окисления матрицы носителя. Это может быть объяснено накоплением в среде промежуточных продуктов распада, переходящих в различные органические кислоты [5,6]. Помимо этого, продукты распада ДАЦ, в частности высокой степени окисления, обладают слабо выраженной биоцидной активностью относительно исследованных культур в концентрациях, эквивалентных степени обсемененности гнойно-некротической раны. Наблюдается ингибирование роста микроорганизмов в течение срока реализации лекарственного средства (экспозиция в течение 24 ч). Из проведенного эксперимента по определению ферментативной активности модифицированным методом Kunitz были сделаны выводы, что продукты гидролитической деструкции модифицированной целлюлозы оказывают инактивирующее воздействие, увеличивающееся с повышением степени окисления носителя. Данное явление связывается нами с возможной модификацией белковой молекулы посредством взаимодействия осколков с активным центром фермента. Токсикологические исследования показали, что изученные носители и их продукты деструкции не обладают токсическим действием, не вызывают аллергических реакций и не являются мутагенами.

Одновременно с этим происходит разрыв связей между носителем, спейсером и терапевтическими агентами. В раневую полость выделяются инкапсулированные в хитозан лекарственные вещества, осколки целлюлозной матрицы и смесь из олигохитов.

Согласно спектрофотометрическим исследованиям, первыми в раневую полость выходят механически включенные ТА. «Ударная доза» взаимодействует с тканевыми ингибиторами, выделяемыми организмом. Оставшаяся несвязанная, часть механически включенного ферментного комплекса обеспечивает протеолиз детрита; эластолитическая и коллагенолитическая активности, в присутствии хитозана, обеспечивающего трансдермальное действие, препятствуют формированию келоидного рубца.

Следующая группа – ТА, связанные водородными связями с матрицей, силами Ван-дер-Ваальса, а также за счет сорбции. Их выход с носителя происходит под действием раз-

рушения связей ТА – полимер, входящий в состав; за счет чего препарат приобретает свое пролонгированное действие.

Последняя группа химически связанные ТА. Фермент связан азотиновой связью с активными группами носителя и выделяется в раневую полость только при целлюлозной деструкции матрицы в форме конгломератов.

Заключение

Показано, что при помещении аппликации в модельную жидкую среду начинается процесс гидролитической деструкции полисахарида. Механизм реализации лекарственного средства в ране состоит из 3 последовательных стадий. Выход «ударной дозы» терапевтического агента за счет механически включенной фракции, постепенная реализация терапевтической дозы за счет сорбированной формы и обеспечение поддерживающей дозы за счет химически связанного фермента. Контролируемый выход лекарственного средства в рану обеспечивается в течение всего максимально рекомендуемого срока использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волошина А.А., Пивоварова Г.М. Сравнительная характеристика первичной заболеваемости населения социально-значимыми заболеваниями в Российской Федерации и Санкт-Петербурге // Здоровье населения и качество жизни. 2019. Т. 6. С. 135–143.
2. Федюк А.М., Балаганский И.А., Суцинский П.Л., Радеева А.В., Грабко В.А., Гордиенко В.А. Экспериментальная оценка эффективности применения раневого покрытия из бактериальной целлюлозы с обработкой ферментом ЦБГ для лечения ожогов 3 степени // Forcipe. 2020. Т. 3. С. 912–913.
3. Медушева Е.О. Разработка, экспериментальное обоснование и внедрение в хирургическую практику раневых покрытий с комплексным некролитическим, антимикробным и антиоксидантным действием (экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 389 с.
4. Vaniushenkova A.A., Ivanova S.N., Kalenov S.V., Markvichev N.S., Belov A.A. The Hydrolytic Destruction of Modified Cellulosic Materials in Conditions Simulating a Purulent Wound // Biointerface Res. In Appl. Chem. 2020. Vol. 10. P. 7265–7277.
5. Singh M., Ray A.R., Vasudevan P. Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose // Biomaterials. 1982. Vol. 3. P.16–20.
6. Knill C.J., Kennedy J.F. Degradation of cellulose under alkaline conditions // Carbohydrate Polymers. 2003. Vol. 51. P. 281–300.

ЭКСТРАКТ СЕМЯН *SHLYBUM MARIBUM L.* КАК ПРОТЕКТОР ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ЭТОПОЗИД И МЕТОТРЕКСАТ НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А.К. Вербицкая¹, О.Н. Антосюк¹, Е.А. Шарова²

Кафедра биоразнообразия и биоэкологии, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия¹
Лаборатория интродукции травянистых растений, ФГБУН Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук (УРО РАН), г. Екатеринбург, Россия²

Аннотация

Тестировали этанольный экстракт двух видов семян расторопши пятнистой (концентрация 1% по содержанию в питательном субстрате) относительно воздействия противоопухолевых препаратов этопозид и метотрексат (концентрация 800 мкг/кг питательной среды). Определили изменение показателя ЛД после совместного использования противоопухолевых препаратов и экстракта. Также оценили изменение параметров жизнеспособности, а именно среднюю индивидуальную плодовитость и эмбриональную летальность потомства F₁ у *Drosophila melanogaster*.

Ключевые слова: экстракт, летальность, плодовитость.

SHLYBUM MARIANUM L. EXTRACT AS A PROTECTOR WHEN EXPOSED TO ANTITUMOR DRUGS ETOPOSIDE AND METHOTREXATE ON THE EXAMPLE OF A MODEL OBJECT *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A.K. Verbitskaya¹, O.N. Antosyuk¹, E.A. Sharova²

Department of Biodiversity and Bioecology, Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia¹

2 Laboratory of Introduction of Herbaceous Plants, the Botanical Garden of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (UrB RAS), Yekaterinburg, Russia²

Annotation

Ethanol extract (1% concentration in the nutrient substrate) of two types of milk thistle seeds (*Shlybum mariannum* L.) were tested with respect to the effects of the antitumor drugs namely etoposide and methotrexate (concentration of 800 µg/kg of nutrient medium). A change in the LD index was determined after using the combination of antitumor drugs and extract simultaneously. Changes in viability parameters, namely the average individual fertility and embryonic mortality of F₁ offspring in *Drosophila melanogaster*, were also evaluated.

Key words: extract, lethality, fertility.

Актуальность. *Silybum marianum* известен, как гепатопротектор, обладающий антиоксидантной активностью. Главным компонентом, обеспечивающим данный вид протекции, является силимарин [1]. Экстракты лекарственных растений служат источником флавоноидов, используемых как цитопротекторы в постхимиотерапевтический период лечения. К тому же экспериментально описаны нефротоксические свойства *Silybum marianum* относительно противоопухолевого препарата цисплатин, обусловленные наличием флаволигнанов [2]. Последние демонстрируют протекторные свойства с применением экстракта их зрелых семян, содержащих от 1 до 4 % флаволигнанов. Предполагается также участие силимарина в ингибировании транскрипционного фактора NF-κB, регулирующего экспрессию генов, вовлеченных в цитопротекцию и канцерогенез, что может влиять на противовоспалительную активность и регуляцию апоптоза [3]. Одним из немаловажных свойств силимарина описывается его участие в репаративной активности, что обеспечивает снижение реализации генетической активности противоопухолевых препаратов [4].

Цель исследования – протестировать протекторные свойства экстракта семян *Silybum marianum* относительно токсического воздействия противоопухолевыми препаратами этопозид и метотрексат на примере лабораторной линии Oregon-R *Drosophila melanogaster*.

Материал и методы

В работе использовали противоопухолевые препараты этопозид (Этопозид-Лэнс, Россия) и метотрексат (Метотрексат-Эбаве, Россия) в концентрациях 800 мкг/кг питательной среды. Использовали 1% этанольный экстракт из двух видов семян светлого и темного цвета *Silybum marianum*, интродуцированного в Ботаническом саду УрО РАН г. Екатеринбурга. Экстракты и противоопухолевые препараты доставлялись личинкам дрозофилы трофическим путем через питательную среду. Для оценки летальности использовали по 300 особей *Drosophila melanogaster* для каждой экспериментальной группы: контроль, 1 % экстракт светлых семян, 1 % экстракт темных семян, 1 % экстракт светлых/темных семян совместно с метотрексатом, 1 % экстракт светлых/темных семян совместно с этопозидом. После вылета имаго производили подсчет пустых пупариев и соответственно общей летальности особей. Вылетевших из пупариев имаго попарно (индивидуальные пары самец – самка) в количестве 25 пар культивировали в отдельных виалах с агаровой крышкой, ежедневно с поверхности которой производили сбор отложенных яиц и помещали их в чашки Петри. Спустя период, необходимый для эмбрионального развития, подсчитывали и идентифицировали доминантные эмбриональные летали до 6-го ч развития (ранние эмбриональные летали – РЭЛ) и после 6-го ч развития (поздние эмбриональные летали – ПЭЛ).

Результаты

При оценке общей летальности особей линии Oregon-R *Drosophila melanogaster* обнаружили, что при совместном применении 1 % экстракта из светлых семян расторопши пятнистой

с противоопухолевыми препаратами метотрексат и этопозид частота гибели особей, непосредственно получавших воздействие в ходе развития, достоверно снижается относительно частоты гибели особей контрольной выборки. При использовании 1 % экстракта из темных семян общая летальность особей дрозофилы превысила 50 %, а при совместном использовании с препаратами осталась в пределах значений контрольной выборки, что свидетельствует о большей эффективности 1 % концентрации экстракта из светлых семян (рис. 1). В отношении летальности потомства F_1 на эмбриональной стадии обнаружили повышение по показателю РЭЛ относительно контрольной выборки в группах, где одновременно применяли 1% экстракт и противоопухолевые препараты, тогда как снижения плодовитости в данных группах не зарегистрировали.

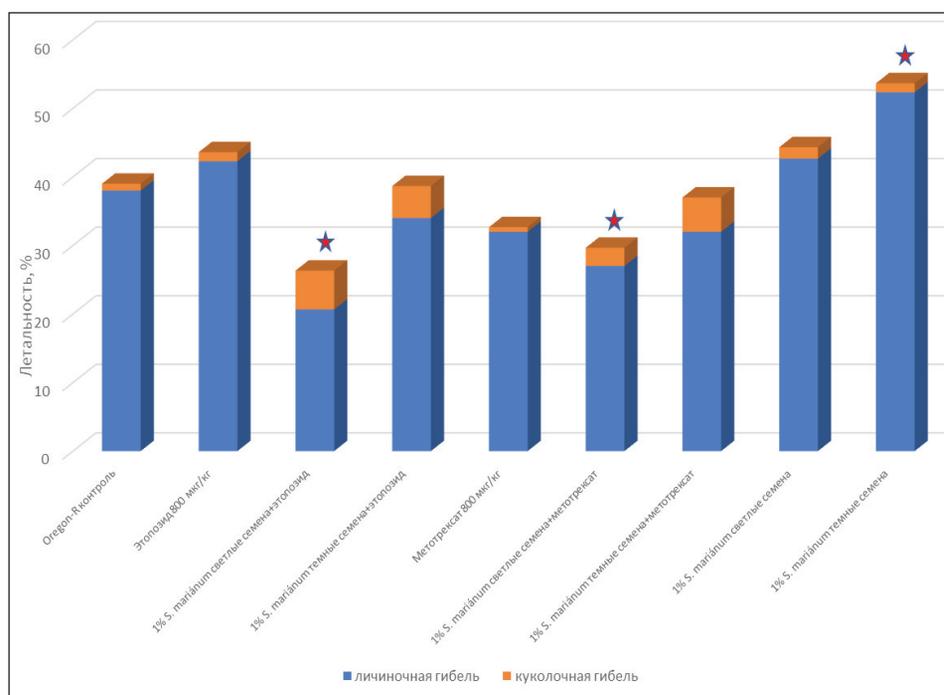


Рис. 1. Общая летальность особей различных экспериментальных групп *D. melanogaster* (звездочкой отмечены статистически значимые различия, $p \leq 0,05$)

Заключение

Несмотря на наличие антиоксидантных проявлений 1 % экстракта из светлых семян *Silybum marianum* при совместном применении с противоопухолевыми препаратами отметили пролонгированный эффект в частоте ДМЛ у F_1 . Соответственно, необходимо дальнейшее тестирование и поиск других более эффективных концентраций данного вида экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bahmani M. Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection / M. Bahmani, H. Shirzad, S. Rafeian, M. Rafeian-Kopaei // Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. Vol. 20, № 4. P. 292–301. doi: 10.1177/2156587215571116
2. Клиникова М.Г. Природные стимуляторы цитопротекторных реакций в постхимиотерапевтический период / М.Г. Клиникова, Н.В. Турсунова Н.В., Б.В. Чуринов // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 6.
3. Щекатихина А.С. Гепатопротекторные свойства флаволигнанов / А.С. Щекатихина // Труды Белорусского государственного университета. Сер.: физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2009. Т. 4, № 1. С. 27–48.
4. Силивончик Н.Н. Силимарин: традиционные и новые эффекты / Н.Н. Силивончик, Т.Н. Якубчик // Рецепт. 2021. Т. 21, № 1. С. 30–42.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕКСИДОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ФИЗИЧЕСКОГО ПЕРЕУТОМЛЕНИЯ В ОСЕННИЙ ПЕРИОД ГОДА

О.С. Дорошенко^{1,2}, А.А. Гостюхина², А.В. Прокопова^{1,2}

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия¹
 Филиал Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии,
 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирский федеральный научно-клинический центр федерального медико-биологического агентства», г. Томск, Россия²

Аннотация

По результатам проведенного экспериментального исследования нам удалось установить актопротекторное и стресспротекторное свойства мексидола в условиях ежедневной плавательной нагрузки в осенний период года. Указанное свойство проявилось в увеличении работоспособности лабораторных животных в тесте вынужденного плавания, а также в нормализации уровней гормональных и биохимических показателей таких как кортикостерон и лактат, отражающих адаптивные реакции лабораторных крыс в условиях физического переутомления.

Ключевые слова: плавательный тест, работоспособность, мексидол, осенний период, кортикостерон, лактат.

THE USE OF MEXIDOL FOR THE CORRECTION OF PHYSICAL OVERWORK IN THE AUTUMN PERIOD OF THE YEAR

O.S. Doroshenko^{1,2}, A.A. Gostyukhina², A.V. Prokopova^{1,2}

Federal state autonomous educational institution of higher education "National research Tomsk state university", Tomsk, Russia¹
 Branch of the Tomsk Research Institute of Balneology and Physiotherapy Federal State Budgetary Institution "Siberian Federal Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency", Tomsk, Russia²

Annotation

According to the results of the experimental study, we were able to establish the act-protective and stress-protective properties of mexidol under the conditions of daily swimming load in the autumn period of the year. This property was manifested in an increase in the working capacity of laboratory animals in the forced swimming test, as well as in the normalization of the levels of hormonal and biochemical parameters such as corticosterone and lactate, reflecting the adaptive reactions of laboratory rats under conditions of physical overwork.

Key words: swimming test, working capacity, mexidol, autumn period, corticosterone, lactate.

Актуальность. Современная жизнедеятельность человека реализуется в условиях интенсивного прогрессирования процесса урбанизации населения, что неуклонно влечет за собой принципиальные изменения в образ жизни современного общества (ускорение темпа жизни, снижение физической активности), а также повышение физической, информационной, психологической нагрузки на организм человека [1]. Комплексные эколого-экономические, эколого-физиологические и психофизиологические перегрузки способствуют нарушению процессов в организме, обеспечивающих адаптивно-компенсаторное поведение человека и как следствие выступают триггерным фактором для возникновения и хронизации патологических процессов [2]. Как известно все системообразующие функции организма, участвующие в формировании и реализации адаптивного потенциала организма подвержены суточным, сезонным осцилляциям, а, следовательно, проявляют разную активность в зависимости от времени суток и сезона года [3]. В связи с этим возникает необходимость учитывать биоритмы физиологических процессов для разработки и проведения оздоровительно-

восстановительных программ, направленных на эффективную реализацию адаптационных возможностей организма и повышение работоспособности и функционального состояния в целом. Ранее в наших экспериментах на лабораторных крысах установлено, что в осенний период относительно других сезонов животные демонстрируют сниженную работоспособность в тесте вынужденного плавания [4].

Цель настоящего исследования – изучить актопротекторные и стресспротекторные свойства мексидола в условиях физического переутомления в осенний период года.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проведено в осенний период на 30 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 220–250 г. За две недели до эксперимента животных случайным образом распределили на 3 группы по 10 особей в каждой. На момент проведения эксперимента животные содержались в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище. В качестве модели физического переутомления использовали методику принудительного плавания с грузом. Плавательный тест проводили в течение 5 дней подряд в одно и то же время суток. За 30 мин до предъявления теста осуществляли внутримышечное введение препарата мексидол фармацевтической компании «Фармасофт» (Россия, Покров, ООО «Эллара») в количестве 10 мг/кг массы животного. Расчет дозы производили с учетом разовой терапевтической дозы для человека, а также коэффициентом пересчета [5]. Для этого исходный 5 % раствор мексидола разводили физиологическим раствором до 1 % для последующего точного дозирования вводимого препарата из расчета 0,1 мл разведенного раствора на 100 г массы животного. Контрольным животным в аналогичных условиях вводили 0,9 % физиологического раствора в эквивалентном количестве. По окончании эксперимента животных выводили посредством декапитации под CO₂ наркозом. Для определения уровня стрессированности измеряли уровень сывороточного кортикостерона методом иммуноферментного анализа, для определения уровня гликолитических процессов в тканях измеряли уровень содержания лактата методом колориметрии. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 8.0 («StatSoft», США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий между группами определяли критерием Манна–Уитни и для сравнения зависимых рядов данных – критерием Вилкоксона. Статистически значимыми принимали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты проведенного исследования показали, что в осенний период адаптивные возможности лабораторных крыс снижены, поскольку динамика работоспособности в группе крыс, получавших только физическую нагрузку, не изменялась на протяжении всего периода тестирования. В подтверждение выдвинутого предположения у лабораторных животных после предъявления ежедневной плавательной нагрузки наблюдалось значительное повышение содержания уровня сывороточного кортикостерона ($p < 0,05$), что указывает на гиперактивацию стресс-реализующей системы. Кроме того, в этой группе животных отмечалось повышение уровня лактата – основного показателя уровня гликолитических процессов в тканях. Внутримышечное введение физиологического раствора в этот период года способствовало формированию перекрестной адаптации и повышению работоспособности животных. При этом в контрольной группе крыс отмечалось повышение уровня лактата, что может указывать на процесс тренировки животных. Введение мексидола за 30 мин до предъявления теста вынужденного плавания способствовало повышению уровня работоспособности, что проявилось в увеличении длительности плавания животных на 3-й день тестирования. При этом со стороны стресс-реализующей системы наблюдался адекватный адаптивный ответ, заключающийся в умеренном подъеме гормона кортикостерона в сыворотке крови экспериментальных животных, однако уровень лактата не отличался от контрольной группы. Вероятно, подобное изменение биохимических показателей является следствием стресс-протекторного свойства мексидола, предупреждающего истощение стресс-реализующей системы на уровне надпочечников, а также его способности к компенсаторной активации анаэробного гликолиза в условиях гипоксии.

Заключение

Таким образом, представленные выше экспериментальные результаты демонстрируют выраженное актопротекторное и стресс-протекторное свойство мексидола в осенний период года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gianaros P.J., Wager T.D. Brain-body pathways linking psychological stress and physical health // *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 2015. Vol. 24, № 4. P. 313–321.

2. Korolenko N.V., Gorsha O.V. Clinical and functional aspects of rehabilitation treatment of primary school children with cervicogenic headache on the background of instability in the cervical spine // Zdobutky klinichnoi ta eksperimental'noi medicini. 2018. № 3. P. 69–74.

3. Исаев А.П. Биологические ритмы сезонных механизмов адапционно-компенсаторных изменений функционального состояния студентов // Вестник ЮУрГУ. 2009. № 39. С. 48–52.

4. Замощина Т.А. Динамика работоспособности и уровень лактата в сыворотке крови лабораторных крыс в зависимости от сезона года // Экология человека. 2020. № 10. С. 17–22.

5. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., Утешев Д.Б., Яворский А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ОКСАДИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА СТРУКТУРУ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС В МОДЕЛИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Ю.В. Мешкова¹, И.С. Борисов², О.В. Саломатина¹, И.В. Сорокина¹,
Н.А. Жукова¹, Т.Г. Толстикова^{1,2}**

Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090,
г. Новосибирск, Россия¹

Новосибирский государственный университет, 630090, г. Новосибирск, Россия²

Аннотация

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) является одним из самых распространенных урологических заболеваний, значительно снижающих качество жизни у мужчин после 40 лет. Патогенез данного заболевания тесно связан с возрастными изменениями в организме, в том числе с гормональным дисбалансом, воспалительными процессами, а также метаболическими нарушениями. В настоящее время самыми эффективными средствами лечения ДГПЖ считаются ингибиторы 5 α -редуктазы: финастерид и дутастерид. Недостатком данных препаратов являются побочные эффекты, проявляющиеся при длительном применении (расстройства половой функции, депрессия, снижение фертильности у мужчин детородного возраста). В связи с этим, поиск малотоксичных агентов с высокой целевой простатопротекторной активностью и дополнительными ценными эффектами в отношении сопутствующих расстройств является актуальным. Ранее нами было показано, что дезоксиголевая кислота (ДХК) и ее оксадиазольные производные обладают простатопротекторными, а также гипохолестеринемическими и противовоспалительными свойствами. В настоящей работе изучаемыми соединениями являлись новые оксадиазольные производные ДХК (Р-403, Р-410 и Р-418), полученные в НИОХ СО РАН. **Целью данной работы** явилась оценка простатопротекторных свойств этих соединений на сульпиридной модели ДГПЖ. Установлено, что хроническое введение сульпирида вызывало изменения структуры железы, характерные для ДГПЖ: рост стромы, разрастание железистого эпителия и сужение просвета желез. Внутрижелудочное введение финастерида в дозе 10 мг/кг вызывало достоверное снижение объемной плотности железистого эпителия, но не влияло на показатели стромы. Оксадиазольные производные Р-403 и Р-418 в дозе 20 мг/кг не уступали финастериду в антипролиферативном действии в железистом отделе простаты, при этом Р-418 снижал объемную плотность стромы до уровня интактной нормы. Производное Р-410 не оказывало достоверного влияния на изменение объемной плотности как железистого эпителия, так и стромы относительно контрольной группы.

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы, желчные кислоты, сульпирид, производные дезоксиголевой кислоты.

THE EFFECT OF NEW OXADIAZOLE DERIVATIVES OF DEOXYCHOLIC ACID ON THE STRUCTURE OF THE PROSTATE GLAND OF RATS IN A MODEL OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

Yu.V. Meshkova¹, I.S. Borisov², O.V. Salomatina¹, I.V. Sorokina¹, N.A. Zhukova¹, T.G. Tolstikova^{1,2}

N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia¹

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia²

Annotation

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is one of the most common urological diseases that significantly reduces the quality of life in men after 40 years. The pathogenesis of this disease is closely related to age-related changes in the body, including hormonal imbalance, inflammatory processes, as well as metabolic disorders. Now, the most effective prostatoprotective drugs are 5 α -reductase inhibitors: finasteride and dutasteride. The disadvantage of these drugs are side effects that occur with prolonged use (disorders of sexual function, depression, decreased fertility in men of childbearing age). In this regard, the search for low-toxic agents with high target prostatoprotective activity and additional valuable effects in relation to concomitant disorders is relevant. Previously we have shown that deoxycholic acid (DCA) and its oxadiazole derivatives have prostatoprotective activity, as well as hypocholesterolemic and anti-inflammatory properties. In the present work, the compounds studied were new oxadiazole derivatives of DCA (P-403, P-410 and P-418) obtained at the NIOH SB RAS. *The aim of this work* was to evaluate the prostatoprotective properties of these compounds on a sulphiride model of BPH. It was found that chronic administration of sulphiride caused changes in the structure of the gland characteristic of BPH: stroma growth, proliferation of glandular epithelium and narrowing of the lumen of the glands. Oral administration of finasteride at 10 mg/kg caused a significant decrease in the volume density of the glandular epithelium, but did not affect stroma parameters. Oxadiazole derivatives P-403 and P-418 at a dose of 20 mg/kg were not inferior to finasteride in antiproliferative action in the glandular part of the prostate, while P-418 reduced the volume density of the stroma to the level of intact norm. The P-410 derivative had no significant effect on the change in the volume density of both the glandular epithelium and stroma relative to the control group.

Key words: benign prostatic hyperplasia, bile acids, sulphiride, deoxycholic acid derivatives.

Актуальность. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) – это незлокачественное увеличение клеток в периуретальном отделе предстательной железы. ДГПЖ является одним из самых распространенных урологических заболеваний у мужчин после 40 лет [1]. Возникновение и развитие ДГПЖ тесно связано с возрастным снижением уровня тестостерона и повышением в простате его метаболита (ДГТ), стимулирующего пролиферацию железистого эпителия и стромы [2]. Отмечено, что чаще всего ДГПЖ возникает на фоне хронических воспалительных процессов и нарушений липидного обмена (ожирение, гиперхолестеринемия, метаболический синдром) [3]. Основными средствами лечения данного заболевания являются ингибиторы 5 α -редуктазы: финастерид и дутастерид, а также растительные препараты и БАДы (пермиксон, Простамол-Уно и др.). Финастерид и дутастерид наиболее эффективно задерживают рост простаты, однако при длительной терапии они вызывают расстройства половой функции (снижение либидо, нарушение эякуляции, мастопатия) [4]. Фитопрепараты хорошо переносятся и обладают многими полезными эффектами (противовоспалительным, противоотечным, антиоксидантным), улучшающими состояние больного, и снижают выраженность сопутствующих симптомов в тканях железы, но их антипролиферативная активность недостаточно высокая. Таким образом, на сегодняшний день отсутствуют эффективные препараты, обладающие одновременно высокой целевой постапопротекторной активностью и дополнительными ценными эффектами в отношении сопутствующих расстройств. Исходя из этого, разработка новых постапопротекторных препаратов с плейотропными свойствами может считаться новым подходом к повышению терапевтической эффективности лечения ДГПЖ. В качестве синтетической платформы для поиска подобных агентов предлагается использовать желчные кислоты, которые обладают широким спектром нативной биологической активности. Ранее в нашей лаборатории было

показано, что дезоксихолевая кислота (ДХК) и ее оксадиазольные производные обладают простатопротекторными, а также гипохолестеринемическими и противовоспалительными свойствами [5].

Цель исследования – оценка простатопротекторных свойств новых оксадиазольных производных ДХК.

Материал и методы

Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wistar репродуктивного возраста. В качестве исследуемых агентов выступали оксадиазольные производные ДХК – Р-403, Р-410 и Р-418. Крысам контрольной, референсной и опытной групп вводили внутривентриально сульфиприд («Эглонил», «Санofi», Франция) в дозе 40 мг/кг в течение 60 сут [6, 7]. Через час опытным крысам вводили внутривентриально исследуемые агенты (20 мг/кг) в водно-твиновом растворе; референс-группе – препарат финастерид («Зентива», Чешская Республика) в дозе 10 мг/кг [8]; контрольной группе – водно-твиновую смесь. Интактные животные не подвергались воздействию. Через 2 мес всех животных выводили из эксперимента и забирали предстательную железу для гистологических исследований. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica-7. Достоверность различий определяли методами непараметрической статистики с помощью критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Хроническое введение сульфиприда вызывало достоверное относительно интактных животных увеличение объемной плотности стромы (в 1,4 раза), уменьшение просвета желез (в 1,2 раза), а также небольшое, но недостоверное увеличение железистого эпителия (в 1,1 раза) (таблица).

Таблица

Влияние исследуемых соединений на показатели объемной плотности структурных компонентов предстательной железы

Группа	Объемная плотность (Vv), у.е.		
	Желез. эпителий	Просвет желез	Строма
Интакт.	0,34±0,03	0,50±0,05	0,14±0,01
Контроль	0,39±0,03	0,42±0,02 ^И	0,19±0,02 ^И
Финастерид	0,31±0,02 *	0,56±0,02 **	0,14±0,01
Р-403	0,32±0,01 *	0,54±0,03 *	0,14±0,02
Р-410	0,33±0,04	0,55±0,03 *	0,15±0,01
Р-418	0,24±0,02 ** #	0,64±0,02 ** #	0,13±0,01 *

Примечание. Mean±SE, ^И $p < 0,05$ – достоверное отличие от интактной группы; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – достоверное отличие от контрольной группы; # $p < 0,05$ – достоверное отличие от референсного препарата.

На этом фоне соединение Р-418 достоверно снижает объемную плотность стромы относительно контрольной группы до уровня интактной нормы. Под действием соединений Р-403 и Р-418 отмечено достоверное снижение объемной плотности эпителия относительно контрольной группы (в 1,2 и 1,6 раза соответственно), что схоже с эффектом финастерида (в 1,3 раза), причем для производного Р-418 данный эффект достоверно отличается от референсного препарата (таблица). Кроме того, все исследуемые соединения и финастерид достоверно увеличивают объемную плотность просвета желез в 1,3–1,5 раза относительно контрольной группы. Производное Р-410 не оказывает достоверного влияния на изменение объемной плотности как железистого эпителия, так и стромы относительно контрольной группы.

Заключение

Таким образом, в модели ДГПЖ, индуцированной сульфипридом, оксадиазольные производные ДХК обладают простатопротекторным действием. Соединения Р-403 и Р-418 уменьшают пролиферативную активность эпителия предстательной железы и нормализуют объемные показатели просвета желез; кроме того, Р-418 восстанавливает строму до уровня интактной нормы. По своему антипролиферативному действию соединение Р-403 не уступает референсному препарату – финастериду в его эффективной дозе, а агент Р-418 превосходит его.

ЛИТЕРАТУРА

1. American Urological Association guideline on management of benign prostatic hyperplasia. Diagnosis and treatment recommendations. AUA Practice Guidelines Committee // J. Urol. 2003. № 170. P. 530–547.

2. *Vignera S.La, Condorelli R.A., Russo G.I., Morgia G. and Calogero A.E.* Endocrine control of benign prostatic hyperplasia // *Andrology*. 2016. Vol. 4. P. 404–411.
3. *Тюзинов И.А., Калинин С.Ю.* Доброкачественная гиперплазия предстательной железы как системное гормонально-метаболическое заболевание: время изменить парадигмы патогенеза и фармакотерапии // *Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология*. 2016. Т. 33, № 4. С. 32–46.
4. *Gormley G.J., Stoner E., Bruskewitz R.C., Imperato-McGinley J., Walsh P.C., McConnell J.D., Andriole G.L., Geller J., et al.* Finasterid Study Group, The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia // *J. Urol*. 2002. № 167. P. 1102–1107.
5. *Сорокина И.В., Попадюк И.И., Жукова Н.А., Низомов С.А., Мешикова Ю.В., Баев Д.С., Борисов С.А., Саломатина О.В., Толстикова Т.Г., Салахутдинов Н.Ф.* 1,2,4-Оксадиазольные производные дезоксихолевой кислоты, обладающие протатопротекторным действием, гиперхолестеринемической и противовоспалительными активностями. Патент RU 2 750 488, заявка 2020118189 от 03.06.2020, опубликовано: 28.06.2021, бюл. №19.
6. *Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Ермолаева Л.А., Вычужанина А.В., Пахомова А.В., Полуэктова М.Е., Шемерова Ю.А.* Сравнительная оценка эффективности протатотропных средств прородного происхождения при экспериментальной доброкачественной гиперплазии предстательной железы // *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2013. Т. 155, № 1. С. 43–77.
7. *Van Coppenolle F., Slomianny C., Carpentier F. O., Le Bourhis X., Ahidouch A., Croix D., Legrand G., Dewailly E., Fournier S., Cousse H., Authie D., Raynaud J.-P., Beauvillain J.-C., Dupouy J.-P., Prevarskaya N.* Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen-dependence // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001. Vol. 280. P. 120–129.
8. *Woo-Young Jeon, Ohn Soon Kim, Chang-Seob Seo, Seong Eun Jin, Jung-Ae Kim, Hyeun-Kyoo Shin, Yong-ung Kim and Mee-Young Lee.* Inhibitory effects of Ponciri Fructus on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017. Vol. 17:384. P. 1–10.

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ

А.В. Озерская^{1,2}, К.В. Белугин²

НИ Томский политехнический университет, г. Томск, Россия¹

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», г. Красноярск, Россия²

Аннотация

В настоящее время в Центре ядерной медицины ФСНКЦ ФМБА России ведется научно-исследовательская работа по теме «Синтез диагностических радиофармпрепаратов». Целью данной работы является разработка радиофармпрепаратов на основе аптамера LC18, специфически связывающихся с опухолевыми клетками рака легкого.

Ключевые слова: позитронно-эмиссионная томография, радиофармацевтический лекарственный препарат, аптамер, радионуклид, синтез.

APRAMER-BASED SYNTHESIS OF RADIOPHARMACEUTICALS

A.V. Ozerskaya^{1,2}, K.V. Belugin²

Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia¹

The Federal State Financed Institution «Siberian Research Clinical center» under Federal Medical and Biological Agency, Krasnoyarsk, Russia²

Annotation

Currently, the Nuclear Medicine Centre, FSFI FSRC under FMBA of RUSSIA is conducting the research for the topic «Synthesis of diagnostic radiopharmaceuticals». **The aim** of this work is to develop LC18 aptamer-based radiopharmaceuticals which are specifically bound to lung cancer tumor cells.

Key words: positron emission tomography, radiopharmaceutical, aptamer, radionuclide, synthesis.

Актуальность. Ранняя диагностика злокачественных новообразований остаётся одной из наиболее актуальных задач современной медицины, поскольку позволяет своевременно использовать все доступные средства лечения онкологических заболеваний. Одним из наиболее чувствительных методов диагностики является позитронно-эмиссионная томография с компьютерной томографией, использующая радиофармацевтические лекарственные препараты. Для выявления процесса злокачественных новообразований,

определения стадии и распространенности опухолевого процесса применяют ^{18}F -фтордезоксиглюкозу, ^{11}C -метионин, ^{11}C -холин и другие РФЛП. Однако несмотря на высокую чувствительность метода, сами используемые РФЛП не проявляют высокую специфичность, поскольку могут накапливаться не только в злокачественных опухолях, но и во всех очагах с высокой метаболической активностью (например, имеющих воспалительный характер). Поэтому в настоящее время активно ведутся работы по созданию РФЛП нового поколения, адресно связывающихся только со злокачественными клетками. В качестве доставляющих агентов в настоящее время представляют интерес устойчивые к нуклеазам олигонуклеотиды – аптамеры. Аптамеры – это РНК- или ДНК-олигонуклеотиды, обладающие высокой аффинностью и специфичностью по отношению к своей мишени, получаемые с помощью технологии SELEX из библиотек ДНК-олигонуклеотидов. Преимуществом использования аптамеров для создания РФЛП является их свободная циркуляция в крови, быстрый клиренс и высокая специфичность по отношению к своей мишени [1, 2].

Цель исследования – разработка радиофармпрепаратов на основе аптамера LC18, специфически связывающихся с опухолевыми клетками рака легкого.

Материал и методы

Нами была разработана методика синтеза комплекса $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер с аптамером LC18, имеющего стабильную структуру. Провелась оценка эффективности фармацевтической субстанции $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер-аптамер LC18 на клетках железистого рака легкого.

Клетки рака легкого дважды отмывали путем центрифугирования в фосфатном буфере, содержащем катионы кальция и магния. Затем 5 млн клеток разводили в 400 мкл фосфатного буфера, содержащего 0,01 нг YRNA для маскировки неспецифических сайтов связывания, и инкубировали на шейкере 30 мин при комнатной температуре [3, 4].

Отбирали 200 мкл приготовленных клеток и 50, 100, 150, 300 мкл соответственно полученного раствора с $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер-аптамер LC18. Измерение проводили в трех параллелях в восьми вариациях. Время инкубации составляло 30 мин, после чего излишки комплекса смывались буферным раствором (PBS) и удалялись центрифугированием. Радиоактивность полученных проб измерялась на дозкалибраторе Talete-НС горячей камеры Comescer (Италия) (рис. 1, А).

Также способность комплекса $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер-аптамер LC18 находить опухолевые очаги и метастазы в организме оценивали на экспериментальных мышах с привитой опухолью рака легкого методом ПЭТ/КТ (рис. 1, Б).

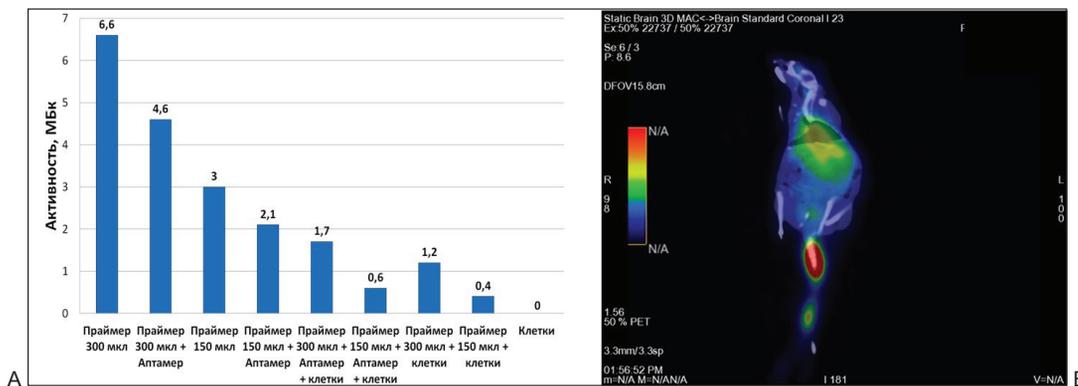


Рис. 1. А – средние результаты измерений активности радиоактивных веществ в пробе на дозкалибраторе Talete-НС; Б – визуализация методом ПЭТ/КТ с применением комплекса $3' \text{-}^{11}\text{C}$ -праймер-аптамер LC18

Результаты

В ходе выполнения научно-исследовательской работы был получен комплекс, обладающий специфичностью к клеткам рака легкого. Результаты исследований активности фармацевтической субстанции, показывают, что субстанция связывается с рецепторами внутри клеток железистого рака легкого и пропорциональна добавляемому количеству комплекса $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер-аптамер LC18.

Заключение

Комплекс $3' \text{-}^{11}\text{C}_3\text{-S}$ -праймер-аптамер LC18 показал высокую эффективность связываться с клетками рака легкого, что необходимо для точной диагностики опухолевых очагов методом ПЭТ/КТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кульбачинский А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням // Ежегодник Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 193–224.
2. Коловская О.С., Замай Т.Н., Замай А.С., Глазырин Ю.Е., Спивак Е.А., Зубкова О.А., Кадкина А.В., Еркаев Е.Н., Замай Г.С., Саицкая А.Г., Труфанова Л.В., Петрова Л.Л., Березовский М.В. Взаимодействие ДНК-аптамер/белок как причина апоптоза и остановки пролиферации в клетках асцитной карциномы Эрлиха // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии. 2013. № 30 (5–6). С. 398–411.
3. Yoon S., Rossi J. Targeted molecular imaging using aptamers in cancer // Pharmaceuticals. 2018.
4. Wu A.M. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer // Methods. 2014. Vol. 65. P. 139–147.

ОЦЕНКА НЕФРОТОКСИЧНОСТИ ГИДРОКСИДА АЛЮМИНИЯ, ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА МИНЕРАЛЬНО-СОЛЕВЫХ АДЪЮВАНТОВ, В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Д.А. Смолянкин¹, Л.А. Рафикова², Д.О. Каримов¹, Н.Ю. Хуснутдинова¹, С.С. Байгильдин¹, М.М. Зиатдинова¹, А.С. Фазлыева³, Э.Ф. Репина¹

Отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия¹
Клинико-диагностическая лаборатория ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия²
Химико-аналитический отдел ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия³

Аннотация

Успех современных вакцин обусловлен их связью с выбранными адъювантами, которые повышают иммуногенность и продлевают продолжительность эффективной защиты. Адъюванты - это химические вещества, которые усиливают иммунный ответ против ассоциированных антигенов. Установлено, что мощные адъюванты коррелируют с более высокой токсичностью на организм. В настоящее время для повышения эффективности вакцин в экспериментальных и клинических исследованиях применяют адъюванты минерально-солевого происхождения, в частности, на основе гидроксида алюминия (Al(OH)₃). Несмотря на широкое использование, алюминий (Al) относится к токсическим металлам. Одним из основных органов-мишеней воздействия Al являются почки, которые играют важную роль в предотвращении накопления металла путем мочеиспускания. Накопление алюминия в почках способствует дегенерации клеток почечных канальцев, индуцируя нефротоксичность. **Целью исследования** явилась оценка изменений концентрации мочевой кислоты (МК), мочевины и креатинина в сыворотке крови лабораторных животных после интоксикации гидроксидом алюминия (Al(OH)₃) в подостром эксперименте. Трех группам белых беспородных крыс в течение 28 дней ежедневно 5 раз в неделю интрагастрально через желудочный зонд, вводили водный раствор гидроксида алюминия в следующих дозах: 0,015, 0,15 и 1,5 мг/кг. С помощью определения основных почечных биохимических маркеров в сыворотке крови лабораторных животных, мочевой кислоты, мочевины и креатинина установлено наличие выраженных нарушений функционального состояния органа. Было показано существенное изменение концентрации мочевой кислоты (p=0,001), мочевины и значительное дозозависимое увеличение уровня креатинина (p=0,001), по сравнению с отрицательным контролем, что свидетельствует о выраженном нефротоксическом эффекте гидроксида алюминия. Снижение концентрации мочевины в 1-й опытной группе крыс на 12 % относительно контроля может быть связано с опосредованным нарушением метаболической функции печени, индуцированным гепатотоксичностью металла. В дальнейших исследованиях следует более тщательно рассмотреть некоторые потенциальные эффекты токсического влияния алюминия на живые организмы.

Ключевые слова: вакцины, адъюванты, гидроксид алюминия, нефротоксичность, лабораторные животные, биохимические маркеры, мочевая кислота, мочевина, креатинин.

EVALUATION OF THE NEPHROTOXICITY OF ALUMINUM HYDROXIDE, THE MAIN COMPONENT OF MINERAL SALT ADJUVANTS, IN A SUBACUTE EXPERIMENT ON LABORATORY ANIMALS

D.A. Smolyankin¹, L.A. Rafikova², D.O. Karimov¹, N.Yu. Khusnutdinova¹, S.S. Baigildin¹, M.M. Ziatdinova¹, A.S. Fazlyeva³, E.F. Repina¹

Department of Toxicology and Genetics with Experimental Clinic for Laboratory Animals
FBSI "Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology", Ufa, Russia¹

²Clinical diagnostic laboratory FBSI "Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology", Ufa, Russia²

³Chemical-analytical department FBSI "Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology", Ufa, Russia³

Annotation

The success of modern vaccines is due to their association with selected adjuvants that increase immunogenicity and prolong the duration of effective protection. Adjuvants are chemicals that enhance the immune response against associated antigens. It has been found that powerful adjuvants correlate with higher toxicity to the body. Currently, to improve the effectiveness of vaccines in experimental and clinical studies, adjuvants of mineral-salt origin, in particular, based on aluminum hydroxide (Al(OH)₃), are used. Despite its widespread use, aluminum (Al) is a toxic metal. One of the main target organs of Al exposure is the kidneys, which play an important role in preventing metal accumulation through urinary excretion. Accumulation of aluminum in the kidney promotes degeneration of renal tubular cells, inducing nephrotoxicity. The aim of the study was to evaluate changes in the concentration of uric acid (UA), urea and creatinine in the blood serum of laboratory animals after intoxication with aluminum hydroxide (Al(OH)₃) in a subacute experiment. Three groups of white outbred rats for 28 days, daily, 5 times a week, intragastrically through a gastric tube, were injected with an aqueous solution of aluminum hydroxide in the following doses: 0,015 mg/kg, 0,15 mg/kg and 1,5 mg/kg. By determining the main renal biochemical markers in the blood serum of laboratory animals, uric acid, urea and creatinine, the presence of pronounced violations of the functional state of the organ was established. A significant change in the concentration of uric acid ($p=0,001$), urea and a significant dose-dependent increase in the level of creatinine ($p=0,001$), compared with the negative control, was shown, which indicates a pronounced nephrotoxic effect of aluminum hydroxide. The decrease in the concentration of urea in the 1 experimental group of rats by 12% relative to the control may be associated with a mediated violation of the metabolic function of the liver induced by hepatotoxicity of the metal. Further research should look more closely at some of the potential effects of aluminum toxicity on living organisms.

Key words: vaccines, adjuvants, aluminum hydroxide, nephrotoxicity, laboratory animals, biochemical markers, uric acid, urea, creatinine.

Актуальность. В настоящее время для повышения эффективности вакцин в экспериментальных и клинических исследованиях применяют адъюванты минерально-солевого происхождения, в частности, на основе гидроксида алюминия (Al(OH)₃). Помимо этого, в фармакологическом производстве, алюминий (Al) входит в состав антацидных препаратов, вакцин, наполнителей целого ряда нестероидных противовоспалительных препаратов, играя роль буфера. Однако несмотря на широкое использование, алюминий относится к токсическим металлам.

Одним из основных органов-мишеней воздействия Al являются почки, которые играют важную роль в предотвращении накопления металла путем мочеиспускания. Алюминий, связываясь с липидами, белками и ДНК, генерирует активные формы кислорода, вызывая дисбаланс про- и антиоксидантов на клеточном уровне; нарушает работу почечных канальцев, индуцируя нефротоксичность [1, 2].

По данным ВОЗ, главными специфическими маркерами нефротоксичности Al являются изменения уровня концентрации ряда функциональных биохимических параметров [3]. Кроме того, обнаружено, что содержание алюминия в крови человека наиболее выражено в сыворотке (0,024–0,070 мг/мл).

Цель исследования – оценка изменений концентрации мочевой кислоты (МК), мочевины и креатинина в сыворотке крови лабораторных животных после интоксикации гидроксидом алюминия (Al(OH)₃) в подостром эксперименте.

Материалы и методы. Исследование выполнено на самках белых беспородных крыс (n=40) со средней массой тела 200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные получали сухой сбалансированный корм и воду в режиме *ad libitum*. С помощью метода случайной выборки крыс разделили на 4 группы по 10 животных в каждой. В течение 28 дней крысам интрагастрально вводили водный раствор гидроксида алюминия в следующих дозах: 0,015, 0,15 и 1,5 мг/кг. По окончании исследования животные были выведены из эксперимента путем мгновенной декапитации.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21 (IBM, USA). Критический уровень значимости (p) принят равным 0,05.

Результаты

Результаты настоящего исследования подтверждают, что ежедневное пероральное введение $Al(OH)_3$ в различных дозах экспериментальным животным в течение 28 дней вызывает значительное изменение уровня мочевой кислоты (МК), мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Так, при анализе средних значений уровня мочевой кислоты в экспериментальных группах показаны достоверные различия ($F=16,153$; $p=0,001$). Выявлены статистически значимые тенденции ($p=0,001$) увеличения концентрации показателя во 2-й группе крыс относительно контроля и 1-й группы на 78,5 и 59,5 %, соответственно (рис. 1).

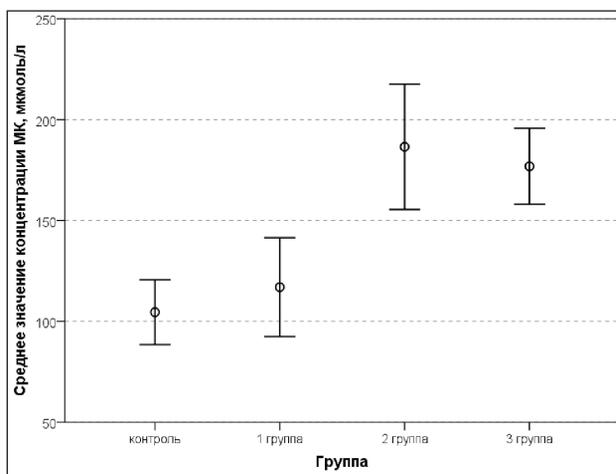


Рис. 1 Изменение концентрации мочевой кислоты (МК) в зависимости от дозы воздействия гидроксида алюминия

Кроме того, статистически значимое повышение ($p=0,001$) на 69,2 и 51,2 % наблюдалось в 3-й группе, относительно контрольной и 1-й группы, соответственно. Существенные сдвиги уровня концентрации МК как одного из основных биомаркеров функции почек указывают на серьезное повреждение специфических тканей органа.

На рис. 2 представлены изменения уровня мочевины после введения $Al(OH)_3$. Концентрация исследуемого биохимического параметра в сыворотке крови крыс 2-й и 3-й групп фактически сопоставима с контрольным значением. Одновременно в 1-й группе животных определялось снижение уровня мочевины на 12,0 % относительно контроля, что может быть следствием уменьшения синтеза белка в печени крыс в результате гепатотоксичности алюминия.

Известно, что мочевина, являясь основным азотистым продуктом распада аминокислот катаболизма белка, вырабатывается в печени. В почках она фильтруется клубочками, частично всасывается канальцами и выводится с мочой. Поэтому концентрация мочевины в сыворотке крови зависит не только от скорости клубочковой фильтрации, но и от функциональной способности печени к метаболизму.

Другое азотистое соединение – креатинин, образующееся в качестве необратимого конечного продукта распада креатина в мышцах, является более специфическим показателем функции почечных клубочков. Спустя 28 дней от начала введения токсиканта при анализе содержания креатинина в сыворотке крови экспериментальных крыс определялись статистически значимые различия ($F=5,457$; $p=0,006$). На рис. 3 показано, что в 1-й группе животных регистрировали увеличение уровня биохимического параметра на 14,3%; во 2-й группе – на 25,6 %, относительно контрольного показателя. При сравнении 3-й группы эксперименталь-

ных животных и контроля между собой, определялось достоверное повышение ($p=0,006$) концентрации мочевины на 27,6 %.

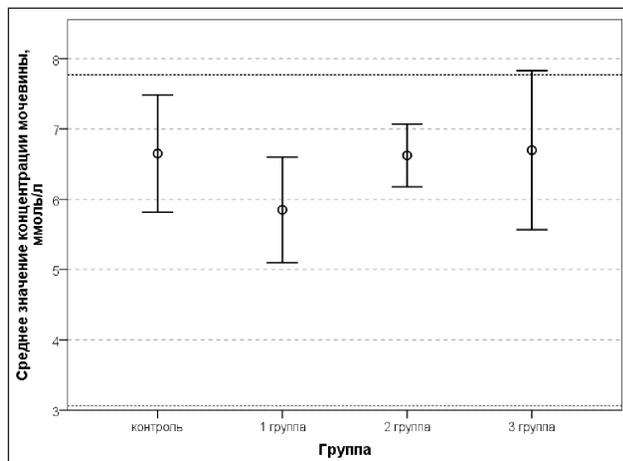


Рис. 2. Изменение концентрации мочевины в зависимости от дозы воздействия гидроксида алюминия

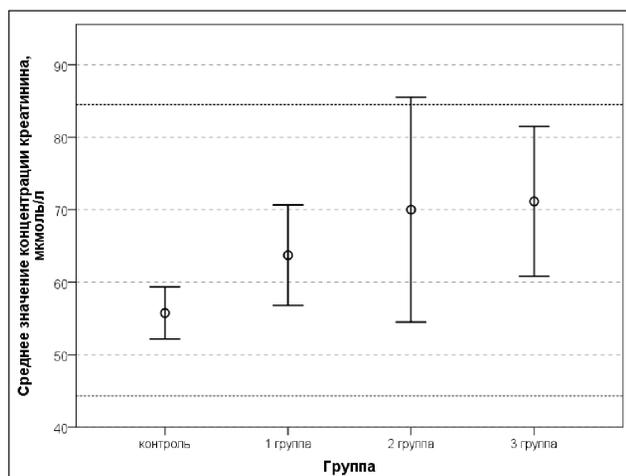


Рис. 3 Изменение концентрации креатинина в зависимости от дозы воздействия гидроксида алюминия

Увеличение содержания в сыворотке креатинина может быть результатом критического накопления алюминия в органе, что, в конечном итоге, приводит к развитию нефротоксичности. Данное положение согласуется с выводами Е. Акрангунг et al. [4].

Заключение

В настоящей работе определение почечных биохимических маркеров в сыворотке крови лабораторных животных, получавших перорально $Al(OH)_3$ в различных дозах, позволило установить наличие выраженных нарушений функционального состояния органа. В ходе подострого эксперимента было показано существенное изменение концентрации мочевой кислоты ($p=0,001$), мочевины и значительное дозозависимое увеличение уровня креатинина ($p=0,001$) по сравнению с отрицательным контролем, что свидетельствует о нефротоксическом эффекте гидроксида алюминия. Важно подчеркнуть, что снижение концентрации мочевины в 1-й группе крыс предположительно связано с опосредованным нарушением метаболической функции печени, индуцированным гепатотоксичностью металла. В дальнейших исследованиях следует более тщательно рассмотреть некоторые потенциальные эффекты влияния металла на живые организмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hadj F., Kadda H., Eh A.D., Mostapha B., Zakaria M., Khaled K., Miloud S.* Nephroprotective effect of Aqueous Extract of the *Hordeum vulgare* L. in wistar rats intoxicated by Aluminium chloride // *South Asian Journal of Experimental Biology*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 44–51.
2. *Baranauskaite J., Sadauskiene I., Liekis A., Kasauskas A., Lazauskas R., Zlabiene U., Masteikova R., Kopustinskiene D.M., Bernatoniene J.* Natural Compounds Rosmarinic Acid and Carvacrol Counteract Aluminium-Induced Oxidative Stress // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 1807.

3. Othman M.S., Fareid M.A., Abdel Hameed R.S., Abdel Moneim A.E. The Protective Effects of Melatonin on Aluminum-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rats // Oxid Med Cell Longev. 2020. Vol. 2020. P. 7375136.

4. Akpanyung E.O., Noah U.T., Bassey U.E., Udotong J.R.I. Protective potential of ethanol leaf extract of Vernonia amygdalina against aluminium chloride induced renal toxicity in male Wistar rats // Journal of Medicinal Plants Studies. 2020. Vol. 8, № 3. P. 39–43.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ДОННИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*MELILOTUS OFFICINALIS*) НА РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ОСТРОГО СТРЕССА У МЫШЕЙ

Л.А. Соколова², Е.А. Киселева¹, В.Ю. Андреева³

НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томский НИМЦ, г. Томск, Россия¹

НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия³

Аннотация

В настоящее время большое внимание уделяется поиску и исследованию различных растительных препаратов ввиду разнообразия их терапевтического действия, низкой токсичности и возможности длительного применения. Перспективным объектом для создания фитопрепаратов является двулетнее травянистое растение семейства бобовых (*Fabaceae*) донник лекарственный (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.). В настоящем исследовании в эксперименте на белых аутбредных мышцах-самцах CD1 в условиях острого стресса исследовано действие экстракта из надземной части донника лекарственного (*M. officinalis* (L.) Pall.) на 70 % этаноле. Степень стрессированности животных оценивали по изменениям массы внутренних органов: надпочечников, селезенки, тимуса, а также по количеству язвочек в слизистой оболочке желудка. Показано, что у животных, получавших экстракт донника лекарственного в дозах 1 и 5 мл/кг, степень выраженности стрессорной реакции не изменялась. Установлено, что исследуемый экстракт не обладает антистрессорной активностью.

Ключевые слова: донник лекарственный, стресс-реакция.

STUDY OF THE EFFECT OF SWEET CLOVER (*MELILOTUS OFFICINALIS*) EXTRACT ON THE DEVELOPMENT OF ACUTE STRESS RESPONSE IN MICE

L.A. Sokolova², E.A. Kiseleva¹, V.Yu. Andreeva³

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia³

Annotation

Today, much attention is paid to the search and study of various herbal preparations due to the diversity of their therapeutic effects, low toxicity and the possibility of long-term use. A promising object for the creation of phytopreparations is a biennial herbaceous plant of the legume family (*Fabaceae*) - sweet clover (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.). In an experiment on white outbred CD1 male mice under conditions of acute stress, the effect of an extract from the aerial part of sweet clover (*M. officinalis* (L.) Pall.) in 70% ethanol was studied. The degree of stress in animals was assessed by changes in the mass of internal organs: adrenal glands, spleen, thymus, as well as by the number of ulcers in the gastric mucosa. It was shown that in animals treated with sweet clover extract at doses of 1 and 5 ml/kg, the severity of the stress reaction did not change. It was found that the studied extract does not have anti-stress activity.

Key words: sweet clover, stress reaction.

Актуальность. В настоящее время большое внимание уделяется поиску и исследованию различных растительных препаратов ввиду разнообразия их терапевтического действия,

низкой токсичности и возможности длительного применения. Перспективным объектом для создания фитопрепаратов является представитель семейства бобовых (*Fabaceae*) донник лекарственный (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.). Статья «Донника трава» включена в Фармакопею Европы (01/2008:2120) и Российской Федерации (ФС.2.5.0011.15). Известно, что экстракты донника лекарственного обладают достаточно широким спектром фармакологической активности: антикоагулянтной, антигипоксической, противомикробной, антигипертензивной, противовоспалительной, спазмолитической [1, 2]. Фитохимические исследования показали наличие в траве донника лекарственного большого разнообразия биологически активных соединений: кумаринов и их производных (кумарин, дикумарол, гликозид мелилотозид), флавоноидов (кемпферол, кверцитин), фенолокислот, сапонинов, тритерпеновых гликозидов, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ [2, 3]. В народной медицине трава донника лекарственного используется при лечении артритов, бронхитов, геморроя, ножных язв, отеков; при болезненных менструациях, неврастении, бессоннице [4]. Экспериментально доказано, что экстракт донника лекарственного не обладает токсичностью [3]. В опытах на мышцах был обнаружен также седативный, анксиолитический, антиноцицептивный эффект препарата [5]. В связи с широким спектром фармакологической активности представляла интерес оценка влияния экстракта донника лекарственного на развитие стрессорной реакции у животных.

Цель исследования – оценка влияния экстракта донника лекарственного (*M. officinalis* (L.) Pall.) на развитие реакции острого стресса у мышей.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено на 40 белых аутбредных мышцах-самцах CD1 массой 32–34 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами [6]. Экстракт из наземной части донника лекарственного (*M. officinalis* (L.) Pall.) получен на кафедре фармацевтического анализа СибГМУ методом двукратной экстракции на 70 % этаноле. Полученный экстракт деалкоголизировали на водяной бане, разводили дистиллированной водой до первоначального объёма и вводили животным перорально в дозах 1 и 5 мл/кг ежедневно в течение 3 сут. Последнее введение препаратов проводилось за 1 ч до начала стрессорного воздействия. Животным группы «контроль-стресс» в эквивалентном количестве вводили воду. Состояние острого стресса моделировали подвешиванием животных корнцангами за шейную складку на 24 ч. О выраженности стрессорной реакции у мышей судили по изменениям массы внутренних органов: селезенки, тимуса, надпочечников, а также по количеству изъязвлений в слизистой оболочке желудка. Производили расчёт массы внутренних органов в пересчете на 20 г массы тела и определяли изменение их массы в процентах (%) к норме (у интактных мышей). Выраженность стрессорной реакции оценивали при помощи шкалы интегральной оценки стрессированности животных, предложенной Ю.И. Добряковым [7]. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Подвешивание за шейную складку на 24 ч вызывало у животных типичную картину стресса (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экстракта донника лекарственного (ЭДЛ) на развитие реакции острого стресса у мышеч-самцов CD1

Группа наблюдения, доза X количество введений (количество животных)	Масса мышши (X ± m), г	Масса внутренних органов (X ± m), мг			Количество язв в слизи-стой желудка (X ± m)	Количество мышшей с язвами, %
		селезенки	тимуса	надпочечников		
1. Интактные мышши (10)	32,1±0,4	130,0±6,5	63,3±4,0	12,4±1,1	0	0
2. Контроль-стресс (10)	27,9±0,5 $_{1-2}p < 0,01$	73,7 ± 5,0 $_{1-2}p < 0,01$	38,2±1,8 $_{1-2}p < 0,01$	8,8±0,9 $_{1-2}p < 0,01$	0,7±0,2	60 $_{1-2}p < 0,05$
3. ЭДЛ, 1 мл/кг x 3 (10)	26,9±0,4 $_{2-3}p < 0,05$	72,7±3,6	38,1±3,9	7,0±0,5	0,6±0,3	40
4. ЭДЛ, 5 мл/кг x 3 (10)	27,1±0,5	70,3±3,8	35,0±2,4	8,2±0,6	0,5±0,2	50

Примечание. Перед уровнем значимости p указаны номера сравниваемых групп.

Так, в сравнении с интактной группой у животных группы контроль-стресс происходило достоверно значимое ($p < 0,01$) уменьшение массы тела и стресс-компетентных органов (см. табл. 1). Масса селезенки, тимуса, надпочечников уменьшилась на 35, 31, 19 % соответственно (табл. 2). Изъязвления в слизистой оболочке желудка обнаружены у 60 % мышей данной группы (см. табл. 1). Введение экстракта донника лекарственного в дозах 1 и 5 мл/кг не способствовало коррекции нарушений, обусловленных стрессорным воздействием. Показатели массы внутренних органов (селезенки, тимуса, надпочечников) и изъязвлений в слизистой оболочке желудка у животных опытных групп достоверно не отличались от таковых у группы «контроль-стресс» (см. табл. 1). Разница в выраженности стресса между группой «стресс-контроль» и у животных, получавших экстракты донника лекарственного, составила 9 и 10 баллов, что свидетельствует об отсутствии у исследуемого экстракта стресс-протекторного эффекта (табл. 2).

Таблица 2

Влияние экстракта донника лекарственного (ЭДЛ) на степень выраженности стрессорной реакции у мышей-самцов CD1

Группа наблюдения, доза X количество введений (число животных)	Изменения массы внутренних органов % / норма (масса органов рассчитана на 20 г массы тела)				Выраженность стрессорной реакции в баллах			
	селезенка	тимус	надпочечники	селезенка	тимус	надпочечники	степень изъязвления	сумма
2. Контроль-стресс (10)	65	69	81	3	3	2	1	9
3. ЭДЛ, 1 мл/кг x 3 (10)	67	72	67	3	3	3	1	10
4. ЭДЛ, 5 мл/кг x 3 (10)	64	66	78	3	3	3	1	10

Заключение

Оценка влияния экстракта донника лекарственного (*M. officinalis* (L.) Pall.) в дозе 1 и 5 мл/кг на развитие реакции острого стресса показала, что экстракт не обладает стресс-протекторной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu Y.T., Gong P.H., Xiao F.Q., Shao S., Zhao D.Q., Yan M.M., Yang X.W. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 2. P. 271–283.
2. Al-Snafi A.E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus officinalis* – a review // *IOSR Journal of Pharmacy*. 2020. Vol. 10. P. 26–36.
3. Харлампович Т.А. Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края: дис. ... канд. фарм. наук. Барнаул, 2014. 197 с.
4. Киселева Т.Л., Карпеев А.А. Гомеопатия и фитотерапия в лечении сердечно-сосудистых болезней / под ред. Т.Л. Киселевой, А.А. Карпеева. М.: Мосгорпечат, 1997. 686 с.
5. Rashidi A., Jahandideh A., Hassanpour S., Asghari A. Anti-nociceptive mechanisms of *Melilotus officinalis* Linn. Ethanolic extract in mice: Involvement of opioidergic, nitregeric and muscarinic receptors// *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology*. 2020. V.8. №2. P. 7–14.
6. ГОСТ Р-53434–2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ, 2010.
7. Добряков Ю.И. Скрининговый метод оценки антистрессорного действия препаратов // *Стресс и адаптация*. Кишинев: Штиинца, 1978. С. 172.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА, СОДЕРЖАЩЕГО ФУРОКУМАРИНЫ, НА ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПАКЛИТАКСЕЛА

М.В. Филонова^{1,2}, Е.П. Федорова¹, Л.Ю. Котловская^{1,2}, А.А. Чурин^{1,2}

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹
 НИ Томский государственный университет, г. Томск, Россия²

Аннотация

В проведенном исследовании на аутбредных мышах-самках выявлено, что паклитаксел в максимально переносимой дозе 40 мг/кг вызывает переходящие изменения гемостатического потенциала (ГП): от гиперкоагуляции к гипокоагуляции и повторной гиперкоагуляции. Введение экстракта, содержащего

фурокумарины и полученного из культуры клеток *Conium maculatum* L., в качестве корректора нарушений ГП, индуцированных введением паклитаксела, не вызывало значимых изменений. Таким образом, обладающие антикоагулянтным действием варфарин и экстракт, содержащий фурукумарины, в использованных дозировках не обеспечивают коррекцию гиперкоагуляционного сдвига, вызванного однократным введением паклитаксела.

Ключевые слова: аутбредные мыши, паклитаксел, нарушение гемостаза, варфарин, фурукумарины.

EFFECT OF AN EXTRACT CONTAINING FUROCUMARINS ON THE HEMOSTATIC POTENTIAL OF OUTBRED MICE TREATED WITH PACLITAXEL

M.V. Filonova^{1,2}, E.P. Fedorova¹, L.Y. Kotlovskaya^{1,2}, A.A. Churin^{1,2}

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia²

Abstract

In a study on outbred female mice was found that paclitaxel at a maximum tolerated dose of 40 mg/kg causes transient changes in hemostatic potential from hypercoagulation to hypocoagulation and repeated hypercoagulation. The introduction of an extract containing furocoumarins obtained from a cells culture *Conium maculatum* L. as a corrector of GP disorders induced by the administration of paclitaxel did not cause significant changes. Thus, warfarin and an extract containing furocoumarins in the dosages used do not provide a correction of the hypercoagulable shift caused by a single injection of paclitaxel.

Key words: outbred mice, paclitaxel, hemostasis disorder, warfarin, furocoumarins.

Актуальность. Пациенты со злокачественными новообразованиями имеют повышенный риск развития тромботических осложнений (ТО) в сравнении с общей популяцией. Дополнительным фактором, увеличивающим риск возникновения ТО, считается применение противоопухолевых препаратов [1]. Известно, что применение паклитаксела, эффективного в отношении широкого спектра раковых заболеваний, может повышать вероятность тромбообразования [2, 3]. В связи с вышеперечисленным, актуальным является поиск фармакологических корректоров, способных нивелировать токсические эффекты химиотерапевтических препаратов на систему гемостаза. В данном ключе в качестве корректоров интерес представляет группа фурукумаринов (ФК), обладающая широким спектром фармакологической активности. При этом ранее было показано, что экстракт, содержащий фурукумарины, оказывает корректирующее действие в модели цисплатин-индуцированного нарушения гемостаза у мышей-самок [4].

Цель исследования – изучить возможность коррекции паклитаксел-индуцированных нарушений системы гемостаза экстрактом, содержащим фурукумарины.

Материал и методы

Исследование проведено на 120 мышах-самках линии CD 1 массой 18–25 г (питомник НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Для моделирования нарушений в свертывающей системе крови мышам вводили паклитаксел (Интаксел, «Фрезениус Каби», Германия) внутривентриально однократно в максимально переносимой дозе 40 мг/кг (МПД). Контрольным животным в аналогичных условиях в эквивалентном объеме вводили физиологический раствор. В качестве корректора использовали экстракт, содержащий сумму фурукумаринов, полученный из культуры клеток болиголова пятнистого (*Conium maculatum* L.) [4]. Экстракт вводили в дозе 30 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали варфарин в дозе 4 мг/кг. Корректоры вводили внутривентриально в течение четырех дней начиная с 4-х суток после введения цитостатика.

Для оценки состояния и изменения гемостатического потенциала использовали глобальный метод низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) [5]. Изучение показателей проводилось на 5, 7, 10, 15, 20 и 30-е сут после введения цитостатика. Забор крови осуществ-

вляли пункцией сердца, пробу в объеме 0,45 мл переносили в кювету за период времени, не превышающий 20 с.

Исследование ГП крови методом НПТЭГ выполняли на пьезоэлектрическом тромбозастрографе АРП-01М «Меднорд» («Меднорд-Техника», Россия) с использованием компьютерной программы ИКС «ГЕМО-3», где определялись и оценивались следующие показатели: константа тромбиновой активности (КТА, показывает активность тромбина), t3 (время желирования), интенсивность коагуляционного драйва (ИКД, отражает активность протеолитического этапа).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10. Межгрупповые различия были оценены с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты

Применение паклитаксела в МПД приводило к двукратному увеличению КТА в сравнении с величинами группы контроля на 7-е сут исследования (табл. 1). К 15-м сут при нахождении КТА на уровне величин контрольных животных наблюдается снижение ИКД (табл. 3) и рост значений t3 на 26,5 и 75,9 % соответственно (см. табл. 2). На 20-е и 30-е сут у животных, получавших паклитаксел в МПД, в сравнении со значениями контрольных животных КТА возрастал в два раза (см. табл. 1), а показатель t3 оставался ниже на 34,3 % (см. табл. 2). Таким образом, в результате однократного введения паклитаксела в МПД у мышей-самок наблюдалась волнообразная динамика ГП: гиперкоагуляция на 7-е сут сменялась гипокоагуляционным состоянием на 15-е сутки с переходом к повторной гиперкоагуляции на 20-е сут.

Таблица 1

Динамика константы тромбиновой активности после применения экстракта, содержащего фурукумарины, на фоне действия паклитаксела

Группа	Сутки					
	5	7	10	15	20	30
контроль	142,9[125,0; 142,9]	125,0[111,1; 142,9]	125,0[83,3; 125,0]	125,0[120,9; 136,7]	125,0[90,9; 136,7]	125,9[120,9; 142,9]
паклитаксел	125,0[100,0; 154,5]	250,0[200,0; 283,3]*	169,4[111,1; 250,0]	155,0[125,0; 170,0]	250,0[200,0; 250,0]*	250,0[200,0; 280,3]*
экстракт с ФК	166,7[125,0; 167,7]#	225,0[200,0; 250,0]*#	200,0[166,7; 250,0]*	150,3[125,0; 166,7]	179,2[100,0; 250,0]	225,0[200,0; 250,0]*
варфарин	125,0[100,0; 137,5]	166,7[145,2; 200,0]^	200,0[190,9; 233,3]*	131,1[100,0; 166,7]	210,7[142,9; 250,0]*	191,9[142,9; 250,0]*

Примечание. Здесь и далее в таблицах 2-3, * – знак достоверности отличий (P<0,05) при сравнении с группой контроля; ^ – знак достоверности отличий (p<0,05) при сравнении с группой паклитаксела; # – знак достоверности отличий (p<0,05) при сравнении с группой варфарина.

Таблица 2

Динамика времени желирования после применения экстракта, содержащего фурукумарины, на фоне действия паклитаксела

Группа	Сутки					
	5	7	10	15	20	30
контроль	3,7 [2,6; 4,7]	3,0[2,7; 3,7]	3,7[2,7; 4,4]	2,9[2,7; 3,5]	3,5[2,7; 4,0]	3,4[2,7; 4,0]
паклитаксел	4,7 [3,6; 5,9]	2,4 [2,2; 3,6]	3,4 [2,3; 4,9]	5,1 [3,7; 6,7]*	2,3 [2,3; 3,4]*	2,4 [2,2; 4,4]
экстракт с ФК	5,5[4,5; 7,8]*#	2,4[2,3; 3,1]	3,4[2,3; 4,5]	3,7[3,5; 6,5]	2,5[2,3; 4,9]	2,4[2,3; 2,4]*#
варфарин	3,7[2,7; 3,9]	2,5[2,4; 3,4]	2,4[2,2; 3,7]*	5,0[3,5; 6,0]*	3,7[2,3; 4,0]	4,8[4,3; 7,6]*

При использовании экстракта, содержащего фурукумарины, на фоне применения паклитаксела по параметрам КТА, t3 и ИКД не обнаружено отличий с группой цитостатика. При этом отмечено увеличение показателя t3 на 48,6 % как от контрольных, так и от величин в группе препарата сравнения варфарина на 5-е сутки (см. табл. 2). На 7-е сут отмечен рост КТА на 35,0 % в сравнении с группой варфарина и на 80,0% от значений контроля (см. табл. 1). На 10-е сутки КТА у мышей-самок, получавших экстракт на фоне применения паклитаксела, также оставалась выше контрольных значений (на 60 %) (см. табл. 1). На 30-е сут исследования у животных, получавших экстракт, отмечено увеличение КТА на 80 % (см. табл. 1), а также сокращение t3 на 30,9 % от значений группы контроля и на 51,0 % от значений группы получавшей варфарин (см. табл. 2).

Таблица 3

Динамика интенсивности коагуляционного драйва после применения экстракта, содержащего фурукумарины, на фоне действия паклитаксела

Группа	Сутки					
	5	7	10	15	20	30
контроль	77,4 [70,0; 95,8]	84,4[70,1; 86,1]	78,8[69,5; 84,4]	79,7[76,6; 79,8]	78,5[72,4; 84,4]	83,5[37,5; 84,4]
паклитаксел	72,1 [62,0; 97,7]	80,6 [68,1; 92,3]	65,8 [42,6; 83,9]	58,6 [49,4; 66,0]*	89,8 [55,0; 107,5]	78,3 [62,1; 94,8]
экстракт с ФК	66,2[44,9; 81,8]	71,7[61,9; 85,8]	71,8[52,6; 86,5]	69,4[54,8; 83,1]	86,7[49,0; 138,7]	88,5[74,2; 116,1]
варфарин	73,2[65,9; 82,6]	79,6[78,3; 113,6]	86,3[37,5; 110,9]	57,2[48,5; 64,0]*	78,1[65,5; 98,3]	71,2[38,3; 101,3]

Введение варфарина на фоне применения паклитаксела в МПД приводило к снижению КТА на 33,3 % на 7-е сут исследования (см. табл. 1). В сравнении с контрольной группой у животных, получавших варфарин, на 10-е сут отмечено увеличение КТА на 60 % (см. табл. 1) и сокращение t3 на 35,1 % (см. табл. 2). На 15-е сут отмечено рост t3 на 71,4 % (см. табл. 2) и снижение ИКД на 28,0 % в сравнении со значениями контрольных животных (табл. 3). При применении варфарина был отмечен рост значений КТА от контрольных величин на 20-е и 30-е сут на 68,6 и 53,5 % соответственно (см. табл. 1), а также увеличение t3 на 41,2 % на 30-е сут (см. табл. 2).

Заключение

В результате проведенного исследования выявлено, что применение паклитаксела в МПД вызывает переходящие изменения гемостатического потенциала от гиперкоагуляции к гипокоагуляции и повторной гиперкоагуляции, сохранявшейся до конца срока наблюдения. Применение экстракта, содержащего фурукумарины, в качестве корректора нарушений ГП, индуцированных введением паклитаксела, не вызывало значимых изменений исследуемых показателей. Препарат сравнения варфарин на пике своего действия (7-е сут) вызвал снижение КТА в сравнении с показателями группы паклитаксела, однако на последующих сроках значимых отличий не выявлено. Таким образом, обладающие антикоагулянтным действием варфарин и экстракт, содержащий фурукумарины, в использованных дозировках не обеспечивают коррекцию гиперкоагуляционного сдвига, вызванного однократным введением МПД паклитаксела.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abdol Razak N.B., Jones G., Bhandari M., Berndt M.C., Metharom P.* Cancer-Associated Thrombosis: An Overview of Mechanisms, Risk Factors, and Treatment // *Cancers (Basel)*. 2018. Vol. 10, № 10. P. 380.
2. *Park S.H., Byon J.S., Lee S.W., Lee S.J., Jin D.K., Shin W.Y.* Coronary Artery Thrombosis Associated With Paclitaxel in Advanced Ovarian Cancer // *Korean Circ J*. 2009. Vol. 39, № 3. P. 124–127.
3. *Стенина М.Б.* Таксол (паклитаксел): механизм действия фармакинетика и взаимодействие с другими препаратами // Сборник «Таксол в клинической практике» / под ред. Переводчиковой Н. И. М.: «Полина», 2001. С. 18–24.
4. *Filonova, M.V., Fedorova E.P., Churin A.A., Kotlovskaya L.Y., Solov'ev M.A., Udut V.V.* Pharmacological Correction of Cisplatin-Induced Hemostatic Disorders // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020. Vol. 170, № 11. P. 62–626.
5. *Удут В.В., Тютрин И.И., Соловьев М.А., Клименкова В.Ф., Малюгин Е.Ф., Карчагина О.С., Бородулина Е.В., Туренко А.В.* Реалии и перспективы глобальных тестов в оценке функционального состояния про- и антикоагулянтной системы // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015. Т. 159, № 2. С. 162–166.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

РОЛЬ ФАКТОРА, ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ, (HIF-1) В РЕГУЛЯЦИИ P-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ СИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА *IN VITRO*

Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников, А.А. Сеидкулиева, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия

Аннотация

На клетках линии Caco-2 исследовано влияние D,L-бутионинсульфоксими́на (BSO, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) на количество фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), и P-гликопротеина (Pgp). Получено, что при снижении концентрации глутатиона, которое вызывал BSO в концентрациях 10 и 50 мкМ, повышалось количество HIF-1 α и Pgp, что нивелировалось при использовании KC7F2 (ингибитор HIF-1 α). Доказано, что HIF-1 α участвует в регуляции Pgp при ингибировании синтеза глутатиона *in vitro*.

Ключевые слова: P-гликопротеин; фактор, индуцируемый гипоксией; глутатион, D,L-бутионинсульфоксимин.

THE ROLE OF HYPOXIA-INDUCED FACTOR (HIF-1) IN THE REGULATION OF P-GLYCOPROTEIN IN INHIBITION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS *IN VITRO*

Yu.V. Abalenikhina, P.Yu. Mylnikov, A.A. Seidkuliyeva, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Annotation

The effect of D,L-butyonine sulfoximine (BSO, a gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitor) on the amount of hypoxia-induced factor (HIF-1 α) and P-glycoprotein (Pgp) was studied on cells of the Caco-2 line. It was found that with a decrease in the concentration of glutathione caused by BSO at concentrations of 10 and 50 microns, the amount of HIF-1 α and Pgp increased, which was leveled when using KC7F2 (HIF-1 α inhibitor). It has been proven that HIF-1 α participates in the regulation of Pgp when inhibiting glutathione synthesis *in vitro*.

Key words: P-glycoprotein; hypoxia-induced factor; glutathione, D, L-butyonine sulfoximine.

Актуальность. HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) – основной транскрипционный фактор, который участвует в адаптации клеток к условиям гипоксии [1]. Транскрипционный фактор HIF-1 состоит из двух белковых субъединиц – HIF-1 α и HIF-1 β . Функциональный статус HIF-1 определяется экспрессией и активностью его α -субъединицы [2]. В настоящее время имеются данные, что активация HIF-1 зависит от редокс-статуса клетки, в том числе и баланса внутриклеточного глутатиона [3]. Известно, что HIF-1 α участвует в регуляции транскрипции различных генов-мишеней не только в ответ на гипоксию, но и при патологических состояниях, протекающих на фоне окислительного стресса. Так, например, он принимает участие в регуляции экспрессии гена *MDR1* (P-гликопротеин, Pgp) во многих опухолях человека (карцинома толстой кишки, гепатоцеллюлярная карцинома и др.) [4]. Ра-

нее в наших работах было показано, что изменение тиолового статуса клетки под действием D,L-бутионинсульфоксими́на (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) стимулирует повышение количества Pgp, но вклад HIF-1 α в этот процесс не был оценен [5].

Цель исследования – определить роль HIF-1 α в регуляции Pgp в условиях ингибирования синтеза глутатиона *in vitro*.

Материал и методы

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, являющиеся моделью тонкой кишки *in vitro*. Дефицит уровня глутатиона моделировали добавлением в культуральную среду ингибитора его синтеза – D,L-бутионинсульфоксими́на (БСО, «Sigma-Aldrich», Германия) [6] в конечных концентрациях 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубацией в течение 24 ч. Контрольные клетки инкубировали с чистой питательной средой (растворитель БСО). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, после окончания экспозиции снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25 % трипсина и 0,2 % ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и готовили клеточные лизаты по протоколу [7]. Далее определяли уровень небелковых SH-групп по реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB, «Serva», Германия) [8]. Количество HIF-1 α и Pgp оценивали методом гетерогенного иммуноферментного анализа (ElisaKits BlueGene, Китай) в лизате клеток, приготовленных в результате трехкратного цикла заморозки-разморозки. Концентрацию белка в пробах анализировали методом Бредфорда. Для оценки роли HIF-1 α в регуляции Pgp клетки культивировали в питательной среде при добавлении БСО в тестируемых концентрациях совместно с ингибитором HIF-1 α N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил)) бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид (KC7F2, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ [9]. Ингибитор добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения БСО. После экспозиции 24 ч клетки снимали с поверхности 6-луночных планшетов, готовили клеточные лизаты и определяли количество Pgp методом вестерн-блот [10].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью дисперсионного анализа, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Инкубирование клеток линии Caco-2 после их дифференцировки в энтероцитоподобные клетки с БСО в течение 24 ч в концентрации 5 мкМ не влияло на уровень небелковых SH-групп, а в концентрациях 10, 50, 100, 500 мкМ вызывало их снижение на 40,7 % ($p=0,002$), 57,6 % ($p=0,0004$), 67,8 % ($p=0,0002$), 55,9 % ($p=0,0004$) соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Влияние D,L-бутионинсульфоксими́на на концентрацию небелковых SH-групп, количество фактора, индуцируемого гипоксией, и P-гликопротеина в клетках линии Caco-2 (M \pm SD)

Концентрация БСО, мкМ	Концентрация небелковых SH-групп, мкмоль/мг белка	Количество HIF-1 α , нг/мг белка	Количество Pgp, нг/мг белка
контроль	0,118 \pm 0,015	6,85 \pm 1,65	117,9 \pm 6,8
5	0,117 \pm 0,022	8,98 \pm 0,15	138,5 \pm 40,4
10	0,070 \pm 0,010*	10,08 \pm 0,17*	202,4 \pm 6,2*
50	0,050 \pm 0,004*	10,14 \pm 0,27*	178,3 \pm 8,7*
100	0,038 \pm 0,008*	10,49 \pm 0,12*	147,5 \pm 15,1

Примечание. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$ (критерий Ньюмана–Кейлса).

Поскольку небелковые SH-группы в клетках в основном представлены глутатионом, полученные результаты свидетельствуют о снижении концентрации глутатиона под действием БСО.

В данных условиях наблюдались следующие изменения уровня HIF-1 α : при концентрации БСО 10, 50 и 100 мкМ количество HIF-1 α увеличивалось на 47,2 % ($p=0,012$), 48,0 % ($p=0,014$) и 53,1 % ($p=0,008$). Количество Pgp также статистически значимо увеличивалось при концентрациях БСО 10 и 50 мкМ относительно значений контрольной группы на 71,6 % ($p=0,002$) и на 51,2 % ($p=0,007$), а при концентрации 100 мкМ, несмотря на усугубление

окислительного стресса, поддерживалось на уровне значений нормы. БСО в концентрации 5 мкМ не влиял на количество HIF-1 α и Pgr (см. табл. 1).

При внесении в питательную среду БСО совместно с ингибитором HIF-1 α (KCF2) количество Pgr не изменялось, что свидетельствует об участии HIF-1 α в регуляции Pgr при ингибировании синтеза глутатиона *in vitro*.

Заключение

В ходе настоящего исследования было показано, что ингибирование синтеза эндогенного антиоксиданта глутатиона сопровождается повышением количества HIF-1 α и Pgr. При этом ингибирование HIF-1 α приводит к нормализации уровня Pgr. Полученные результаты указывают на вклад фактора, индуцируемого гипоксией, в процесс регуляции Pgr в условиях ингибирования синтеза глутатиона *in vitro*.

Работа поддержана грантом Президента РФ (МК-1856.2020.7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schofield C.J., Ratcliffe P.J. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 338, № 1. P. 617–626.
2. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) // *Mol Pharmacol.* 2006. Vol. 70, № 5. P. 1469–80.
3. Haddad J.J., Olover R.E., Land S.C. Antioxidant/prooxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 28. P. 21130–9.
4. Xie J., Li D., Chen X., Wang F., Dong P. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells // *Oncol Lett.* 2013. Vol. 6, № 1. P. 232–238.
5. Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Сеидкулиева А.А., Порошина М.О., Судакова Е.А., Якушева Е.Н. Белок множественной лекарственной устойчивости P-гликопротеин в условиях ингибирования синтеза глутатиона *in vitro* // *Технологии живых систем.* 2021. Т. 18. №3. С. 5-17.
6. Moine L., Rivoira M., Díaz de Barboza G., Pérez A., Tolosa de Talamoni N. Glutathione depleting drugs, antioxidants and intestinal calcium absorption // *World J Gastroenterol.* 2018. Vol. 24, № 3 (44). P. 4979–4988.
7. Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Seidkulieva A.A., Shchul'kin A.V., Yakusheva E.N. Funktsionirovanie pregnan X retseptora v usloviakh nitrozativnogo stressa // *Biomed Khim.* 2021. Vol. 67, № 5. P. 394–401.
8. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Определение тиоловых групп в ткани мозга при помощи THIO-GLO // *Биомедицинская химия.* 2004. Т. 50, № 4. С. 390–397.
9. Narita T., Yin S., Gelin C.F., Moreno C.S., Yepes M., Nicolaou K.C., Van Meir E.G. Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor // *Clin Cancer Res.* 2009. Vol. 15, № 19. P. 6128–36.
10. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортера P-гликопротеина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022. Т. 173, № 1. С. 2–6.

УРОВЕНЬ СТРЕССА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОВЫШЕННЫХ УРОВНЕЙ ОБЩЕЙ ВИБРАЦИИ И ШУМА И ПРИ КОРРЕКЦИИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА

А.А. Гостюхина, А.В. Проколова, О.С. Дорошенко

Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии» филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии «Федерального медико-биологического агентства», г. Томск, Россия
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Аннотация

Стресс и физические нагрузки, нередко встречающиеся на тяжелом производстве, приводят к истощению адаптационных возможностей организма с последующим развитием утомления. На сегодняшний день социально-гигиеническое значение вибрационной патологии определяется относительно большим удельным весом в структуре потери трудоспособности вследствие профессиональных заболеваний, молодых возрастом лиц, утративших профессиональную трудоспособность. Поскольку применяемая на данный момент терапия недостаточна для реабилитации пациентов с вибропатологией, то с позиции восстановления адаптационных систем организма применение клеточной терапии может рассматриваться как многообещающий метод коррекции негативных эффектов такого воздействия. **Цель работы:** определить уровень стресса у лабораторных крыс при длительном воздействии повышенных уровней общей вибрации и шума и при коррекции клетками костного мозга (ККМ). Установлено, что после 1 мес вибрационно-шумового воздействия полученные результаты параметров поведенческой активности животных в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте» свидетельствовали о стресс-индуцирующем действии повышенных уровней общей вибрации и шума. Испытания животных в тесте

принудительного плавания позволили зафиксировать двукратное снижение уровня физической работоспособности. Уровень кортикостерона статистически значимо увеличился. Гистологический анализ надпочечников, бедренной мышцы, мозжечка, миокарда и брыжейки у крыс при действии повышенных уровней вибрации и шума выявил различные виды микроангиопатий с признаками дистрофических изменений тканей. У группы крыс с моделью вибрационно-шумового воздействия при имплантации скеффолдов, несущих ККМ, сравнительный анализ продемонстрировал положительную динамику показателей психоэмоционального статуса, улучшение физической работоспособности, нормализацию уровней кортикостерона сыворотки крови и тенденцию к восстановлению гистологической структуры органов-мишеней у крыс с моделью вибрационно-шумового воздействия.

Ключевые слова: вибрационно-шумовое воздействие, скеффолд, клетки костного мозга, поведенческая активность, кортикостерон.

THE LEVEL OF STRESS IN LABORATORY RATS DURING PROLONGED EXPOSURE TO INCREASED LEVELS OF GENERAL VIBRATION AND NOISE AND WHEN CORRECTED BY BONE MARROW CELLS

A.A. Gostyukhina, A.V. Prokopova, O.S. Doroshenko

Tomsk Scientific Research Institute of Balneology and Physiotherapy branch Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia», Tomsk, Russia

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «National Research Tomsk State University», Tomsk, Russia

Annotation

Stress and physical activity, often encountered in heavy production, lead to the depletion of the body's adaptive capabilities, followed by the development of fatigue. To date, the social and hygienic significance of vibration pathology is determined by a relatively large proportion in the structure of disability due to occupational diseases, the young age of people who have lost their professional ability to work. Since the currently used therapy is insufficient for the rehabilitation of patients with vibropathology, from the standpoint of restoring the body's adaptive systems, the use of cell therapy can be considered as a promising method for correcting the negative effects of such an impact. Purpose of the work: to determine the level of stress in laboratory rats during prolonged exposure to increased levels of general vibration and noise and during correction by bone marrow cells (KKM). Determined that, after 1 month of vibration-noise exposure, the obtained results of the parameters of the behavioral activity of animals in the "open field" and "elevated plus maze" testified to the stress-inducing effect of increased levels of general vibration and noise. Animal tests in the forced swimming test allowed us to record a two-fold decrease in the level of physical performance. The level of corticosterone increased statistically significantly. Gistologicheskii analiz nadpochechnikov, bedrennoy myshtsy, mozzhechka, miokarda i bryzheyki u kryс pri deystvii povyshennykh urovney vibratsii i shuma vyyavil razlichnyye vidy mikroangiopatii s priznakami distroficheskikh izmeneniy tkaney. In a group of rats with a model of vibration-noise exposure during implantation of scaffolds bearing KKM, a comparative analysis showed a positive dynamics of psycho-emotional status, improvement in physical performance, normalization of blood serum corticosterone levels and a tendency to restore the histological structure of target organs in rats with a model of vibration- noise impact.

Key words: vibration-noise exposure, scaffold, bone marrow cells, behavioral activity, corticosterone.

Актуальность. Сохранение и укрепление здоровья работающего населения, составляющего основу экономического благополучия общества, является одной из приоритетных задач отечественного здравоохранения. Стресс и физические нагрузки, нередко встречающиеся на тяжелом производстве, приводят к истощению адаптационных возможностей организма с последующим развитием утомления. Следствием этого является снижение производительности труда, физической и умственной работоспособности [1, 2]. Неблагоприятное воздействие факторов рабочей среды наиболее выражено на предприятиях угольной промышленности, цветной и черной металлургии, энергетического и тяжелого машиностроения [3, 4]. В структуре профессиональной заболеваемости работников этих отраслей стабильно ведущее место занимают заболевания, связанные с воздействием физических факторов –

38,6 %, на долю вибрационной патологии приходится 17 % [3]. Социально-гигиеническое значение вибрационной патологии определяется относительно большим удельным весом в структуре потери трудоспособности вследствие профессиональных заболеваний, молодым возрастом лиц, утративших профессиональную трудоспособность. Поскольку применяемая на данный момент терапия недостаточна для реабилитации пациентов с вибропатологией, то с позиции восстановления адаптационных систем организма применение клеточной терапии может рассматриваться как многообещающий метод коррекции негативных эффектов вибрационно-шумового воздействия.

Цель работы – определить уровень стресса у лабораторных крыс при длительном воздействии повышенных уровней общей вибрации и шума и при коррекции клетками костного мозга (ККМ).

Материал и методы

Эксперимент выполняли на 40 половозрелых крысах-самцах породы Wistar, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном рационе со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с международными правилами и нормами [5]. Животные были разделены на 4 группы: 1 – крысы, которые находились в клетках, установленных на неработающей виброплатформе Clear Fit G-PLATE Compact 101; 2 – крысы, которых подвергали воздействию общей вертикальной вибрации (частотой 35–40 Гц) и шума (94 Дба) с помощью виброплатформы Clear Fit G-PLATE Compact 101; 3 – крысы, которых подвергали воздействию общей вертикальной вибрации и проводили манипуляции по имплантации скеффолдов с культивированными на нем ККМ; 4 – крысы, которых подвергали воздействию общей вертикальной вибрации и проводили манипуляции по формированию подкожного «кармана» в правой подмышечной области без введения скеффолда.

Процедуру вибрационно-шумового воздействия выполняли ежедневно по 1 ч в течение 30 дней. Выделение и культивирование моноклеарных клеток костного мозга проводили по стандартной методике [6]. Жизнеспособность ядродержащих клеток костного мозга в полученных суспензиях $93,3 \pm 6,2$ %. Показатели поведенческой активности животного исследовали при помощи установки «открытое поле» [7]. Уровень тревожности животного определяли с помощью установки «приподнятый крестообразный лабиринт». Уровень физической работоспособности крыс исследовали в тесте принудительного плавания [8]. Плавание проводили в специальной боксированной установке с утяжеляющим грузом равным по весу 10 % от массы тела конкретной особи при температуре воды 26 °С. Все указанные выше тесты проводили до начала эксперимента и через 30 дней. После завершения всех экспериментальных воздействий крыс выводили из эксперимента под CO₂-наркозом. Определение уровня гормона в сыворотке периферической крови выполняли с помощью ИФА на программируемом фотометре STAR FAX 303 PLUS (США). Микроскопию полученных препаратов, изготовление снимков и измерения осуществляли с использованием системы из микроскопа Axio Lab A1, камеры AxioCam ERc 5s и программного обеспечения ZEN 2012 (Германия).

При обработке полученных данных были использованы методы статистического описания, включающие проверку на нормальность распределения исследуемого признака по критерию Шапиро–Вилка, расчет среднего (\bar{X}), ошибки среднего (m), внутригрупповое и межгрупповое сравнение показателей с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна–Уитни соответственно. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$ [9].

Результаты

Установлено, что после 1 мес вибрационно-шумового воздействия полученные результаты параметров поведенческой активности животных в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте» свидетельствовали о стресс-индуцирующем действии повышенных уровней общей вибрации и шума. Испытания животных в тесте принудительного плавания позволили зафиксировать двукратное снижение уровня физической работоспособности ($33,10 \pm 3,58$ с) по отношению контролю ($67,50 \pm 5,40$ с) на 30-й день эксперимента. При этом уровень кортикостерона у данной группы крыс статистически значимо увеличился до $369 \pm 0,5$ нг/мл по отношению к группе, которая находилась в клетках, установленных на неработающей виброплатформе: $87,7 \pm 0,6$ нг/мл. Это подтверждало выявленное с помощью тестов поведенческой активности стрессогенное влияние данного неблагоприятного производственного фактора. Высокий уровень кортикостерона (аналог кортизола у человека) является одним из механизмов адаптации организма к стрессу. При этом эффектами данного гормона являются

повышение системного артериального давления, чувствительности миокарда и стенок сосудов к катехоламинам, стимуляция эритропоэза в костном мозге и др. [10].

Гистологическая оценка состояния внутренних органов крыс при моделировании длительного вибрационно-шумового воздействия показала, что структура миокарда у всех крыс групп 1 и 2 не отличалась от нормы. В корковом веществе надпочечников у животных при действии вибрации и шума наблюдалась мелкоочаговая делипоидизация цитоплазмы клеток (рис. 1).

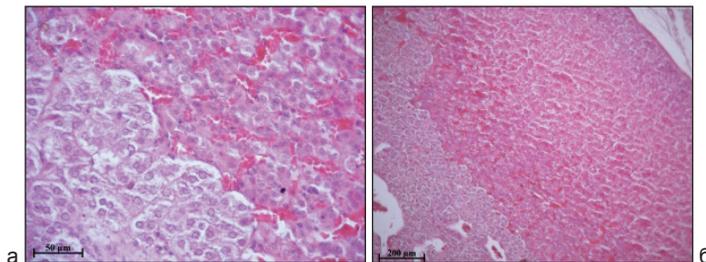


Рис. 1. Надпочечник крысы группы 2. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: а – х400, б – х200

Кровенаполнение варьировало от участков слабо умеренного кровенаполнения до очагов резко выраженного капиллярно-венозного полнокровия с эритростазами. Микроциркуляторные расстройства были значительно выражены в глубоких частях пучковой зоны и сетчатой зоне. В мышечной ткани группы 2 выявлено венозно-капиллярное полнокровие с «монетными столбиками» эритроцитов в капиллярах (рис. 2).

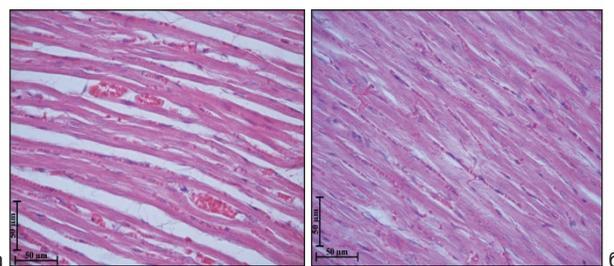


Рис. 2. Бедренная мышца крыс группы 2: венозно-капиллярное полнокровие (а, б) с «монетными столбиками» эритроцитов (б), присутствуют отёки разной степени выраженности (а) и нарушение тинкториальных свойств миоцитов (б). Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: х400

В молекулярном и зернистом слоях мозжечка сосуды были выражено полнокровны и резко расширены (рис. 3).

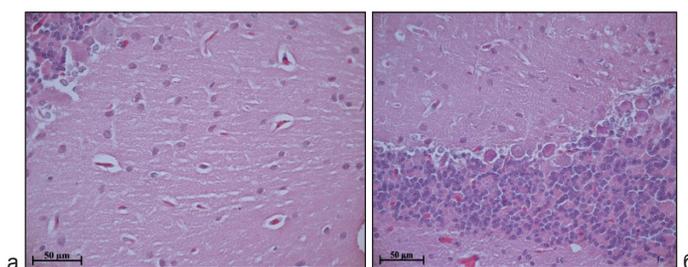


Рис. 3. Мозжечок крыс группы 2: перичеллюлярный отек (а), полнокровие капилляров в зернистом слое (б). Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: х400

На пленочных препаратах брыжейки у животных 2 группы встречается повышенное количество тучных клеток относительно контроля (группа 1), что может свидетельствовать о реакции соединительной ткани на присутствующие микротравмы.

У группы животных, которые были подвержены воздействию общей вертикальной вибрации и манипуляции по имплантации скеффолдов с культивированными на нем ККМ, сравнительный анализ продемонстрировал положительную динамику показателей психоэмоционального статуса, значимое улучшение физической работоспособности до $63 \pm 5,3$ с, нормализацию уровней кортикостерона сыворотки крови до $72,3 \pm 0,04$ нг/мл и тенденцию к восстановлению гистологической структуры органов-мишеней к остальным экспериментальным группам 1, 2, 4 (рис. 4).

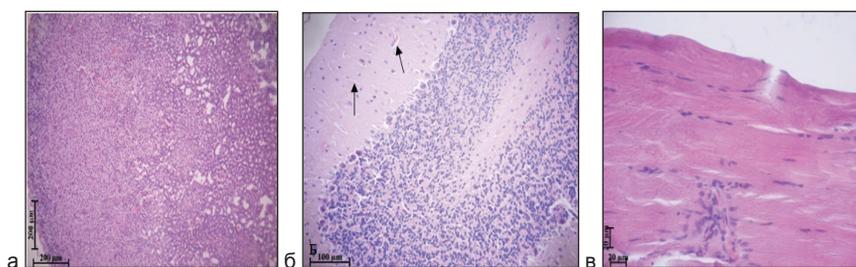


Рис. 4. Органы-мишени у крыс с моделью вибрационно-шумового воздействия после клеточной терапии: а – участки слабого кровенаполнения в надпочечниках; б – периваскулярный отек в мозжечке (обозначено стрелками); в – гиперплазия миосателлитов в бедренной мышце. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: $\times 200$

Использованная в эксперименте модель негативного влияния вибрационно-шумового производственного фактора была эффективна в оценке перспективности использования стволовых клеток, в качестве одного из подходов в решении задач регенеративной медицины. В области теоретической медицины и в системе практического здравоохранения полученные результаты и образцы изделий могут быть положены в основу разработки высокотехнологичной помощи, обоснованной программой профилактики профессиональных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

- Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. Москва: Медицина. 1988. (256 с.).
- Nicolaidis M.J. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course. // *Sports Med.* 2008. Vol. 38, № 7. P. 579-606.
- Измерова Н.Ф., Кириллова В.Ф. Гигиена труда// учебник /под ред. Н.Ф. Измерова, В.Ф. Кириллова. ГЭОТАР-Медиа. 2010. (592 с.).
- Косарев В.В., Бабанов С.А. Профессиональные болезни Москва: ИНФРА-М. 2011. (252 с.).
- ГОСТ Р-53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. Москва: Стандартинформ. 2010.
- Шахов В.П., Попов, С.В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. Томск: STT. 2004. (170 с).
- Завьялов Е.Л., Герлинская Л.А., Овчинникова Л.Е., Евсиков В.И. Стресс и территориальная организация локального поселения водяной полевки // *Зоол. журнал.* 2007. №2. С. 242-251.
- Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций. Челябинск: Б.и. 2000. (167с.).
- Exbrayat J.M. Classical methods of visualization. Histochemical and cytochemical methods of visualization. London, New York: CRC Press Taylor and Francis Group. 2013. (58 p.)
- Медик В.А. Статистика в медицине и биологии. Москва: Медицина. 2000. (120 с.).
- Newman E.M., Soma K.K. Corticosterone and dehydroepiandrosterone in songbird plasma and brain: effects of season and acute stress // *Eur. J. Neurosci.* 2009. V. 29, №9. P. 1905-1914.

ПЕРЕРЕЗКА СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА: ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ E2F1 В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

В.А. Дзряян, М.А. Питинова

Лаборатория «Молекулярная нейробиология», Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Нейротравма является одной из основных причин инвалидности и смертности человека. Однако механизмы, опосредующие выживание и гибель клеток периферической нервной системы, до сих пор полностью не изучены. Фактор транскрипции E2F1 – один из ключевых белков, определяющих судьбу клетки, включая репарацию ДНК, клеточный цикл, метаболизм и апоптоз. Но участие E2F1 в регуляции выживания и гибели периферических нервных клеток после аксотомии ранее не изучалось. Мы впервые изучили вызванные аксотомией изменения экспрессии и локализации E2F1 в ганглиях задних корешков (DRG) спинного мозга крысы после перерезки седалищного нерва. Иммуноблоттинг использовали для анализа экспрессии и внутриклеточной локализации E2F1 и ее изменений после аксотомии. Также мы оценили, способствует ли этот транскрипционный фактор апоптозу клеток в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс. По результатам данной работы аксотомия вызывает сверхэкспрессию E2F1 уже через 4 ч после аксотомии, тогда как к 7-м сут уровень белка стремится к минимуму. При этом уровень экспрессии E2F1 повышался как в цитоплазме, так и в ядрах клеток DRG. Повышенная колокализация

E2F1-позитивных клеток с маркером апоптоза TUNEL по сравнению с неповрежденными DRG указывает на то, что апоптоз в аксотомированных ганглиях был связан со сверхэкспрессией E2F1. Таким образом, сверхэкспрессия E2F1 является ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и отдаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и подготавливает последующие изменения других белков и общий ответ клеток на повреждение. E2F1 и последующие факторы-мишени могут рассматриваться как многообещающие молекулярные мишени для разработки потенциальных нейропротекторных агентов.

Ключевые слова: апоптоз, ганглии задних корешков, E2F1, нейротравма, DRG.

THE SCIATIC NERVE TRANSECTION: CHANGES IN THE EXPRESSION AND INTRACELLULAR LOCALIZATION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR E2F1 IN THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM OF RATS AFTER AXOTOMY

V.A. Dzreyan, M.A. Pitinova

Laboratory of Molecular Neurobiology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Annotation

Neurotrauma is among the main causes of human disability and mortality. However, the mechanisms that mediate the survival and death of cells in the peripheral nervous system are still not fully understood. The transcription factor E2F1 - one of the key proteins that determine the fate of cells, including DNA repair, cell cycle, metabolism, and apoptosis. But the involvement of E2F1 in the regulation of survival and death of the peripheral nerve cells after axotomy has not been previously studied. We for the first time studied axotomy-induced changes in the expression and localization of E2F1 in the dorsal root ganglia (DRG) of the rat spinal cord after sciatic nerve transection. Immunoblotting was used for analysis of expression and intracellular localization of E2F1 and its changes after axotomy. In this work, axotomy causes overexpression of E2F1 as early as 4 hours after axotomy of rat DRG. The level of E2F1 expression increased both in the cytoplasm and the nuclei of DRG. The increased colocalization of E2F1-positive cells with the apoptosis marker TUNEL, compared with control contralateral DRG, suggests that apoptosis in axotomized ganglia was associated with overexpression of E2F1. Thus, overexpression of E2F1 is a key event in the initiation of apoptosis of neurons and distant glial cells in axotomized DRG and prepares subsequent changes in other proteins, and the general response of ganglion cells to damage. E2F1 and downstream target factors may be considered as promising molecular targets for development of potential neuroprotective agents.

Keywords: apoptosis, dorsal root ganglion; E2F1, nerve injury, DRG.

Актуальность. Повреждение периферических нервов – сложный процесс, и понимание его нейронных и молекулярных механизмов требует дальнейших исследований. Нейротравма имеет место быть при бытовых и спортивных травмах, дорожно-транспортных происшествиях, ошибках медперсонала при проведении инъекций и т.д. Помимо этого, повреждение аксона сопровождается ранние стадии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, а кроме того, аксональная дегенерация является одним из основных клинических и патологических факторов развития бокового амиотрофического склероза [1]. Эффективных нейропротекторов для защиты нервных клеток в первые часы после травмы на сегодняшний день не существует, поэтому исследования молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропротекции на различных модельных объектах нейротравмы остаются актуальными. В ядре клетки E2F1 как фактор транскрипции контролирует экспрессию различных белков, регулирующих многие процессы, в том числе апоптоз [2]. Но в цитоплазме E2F1 может действовать нетранскрипционным путем, напрямую взаимодействуя с митохондриями [3]. Все это делает этот белок интересным объектом для изучения. Лишь несколько исследований продемонстрировали участие этого белка при травматическом повреждении периферических нервов [4, 5]. При этом, участие E2F1 в регуляции выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при аксотомии ранее не изучалось.

Цель исследований – изучить изменения экспрессии и локализации E2F1 в ганглиях задних корешков крыс (DRG) в ответ на перерезку седалищного нерва. В результате работы мы впервые продемонстрировали участие этого белка в запуске апоптоза, индуцированного аксотомией.

Материал и методы

Опыты проведены на самцах крыс линии *Wistar* (2–2,5 мес; 200–250 г), на которых уже отработана методика перерезки седалищного нерва в нашей лаборатории [6, 7]. Седалищный нерв крыс содержит аксоны сенсорных и моторных нейронов, расположенных, в основном, в 4-м и 5-м DRG. Тела мотонейронов находятся в спинном мозге внутри позвонков, а сенсорных нейронов – в DRG вне позвоночника. Каждый сенсорный нейрон (около 15 % всех клеток DRG) окружен своим слоем глиальных клеток [8, 9]. Перерезку седалищного нерва и изоляцию DRG осуществляли по стандартному протоколу [10]. После перерезки седалищного нерва нейроны DRG оказываются аксотомированными. Декапитацию гильотиной проводили через 1, 4, 24 ч или 7 дней после односторонней перерезки правого седалищного нерва. Контроль – симметричные ганглии с контралатеральной стороны того же животного. Уровень экспрессии E2F1 оценивали с помощью вестерн-блот-анализа. Иммуноблоттинг проводили методом полусухого переноса с помощью системы Trans blot Turbo (BioRad) через 1, 4, 24 ч или 7 дней после аксотомии, объединяя 4-м и 5-м DRG от трех крыс. Для анализа хемилюминесценции использовали систему гель-документирования Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция). Визуализацию апоптотических клеток проводили с помощью анализа TUNEL (метка концов dUTP, опосредованная терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазой (TdT)), который маркирует разрывы цепей ДНК с использованием набора для обнаружения гибели клеток *in situ*, TMR red (# 12156792910, Roche). Индекс апоптоза (ИА) рассчитывали для TUNEL-положительных клеток по формуле

$$\text{ИА} = \frac{\text{Количество TUNEL-положительных клеток}}{\text{Общее количество клеток (окрашенных Hoechst 33342)}} \times 100.$$

Оценку колокализации E2F1 с TUNEL-положительными клетками (коэффициент Мандерса M1) осуществляли с помощью программы Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, accessed on 4 October 2021) с плагином JACoP, где рассчитывали по формуле

$$(\text{E2F1} + \text{TUNEL}) / \text{TUNEL}.$$

Статистический анализ проводили по One Way Anova RM.

Результаты

Односторонняя перерезка правого седалищного нерва вызывала повышение уровня белка E2F1 относительно интактных ганглиев как в цитоплазматической, так и в ядерной фракциях крыс DRG уже через 4 ч после перерезки. Иммуноблоттинг показал, что как в аксотомированных, так и в контрольных интактных ганглиях экспрессия белка значительно возрастала через 4 и 24 ч по сравнению с уровнем, определенным через 1 ч после перерезки седалищного нерва, что отражает неспецифический ответ нервной системы крыс на повреждение. В то же время увеличение белка в ядерной фракции в течение первых суток после травмы было более выраженным (табл. 1).

Таблица 1

Экспрессия E2F1 в клетках DRG после перерезки седалищного нерва

Время после аксотомии	Аксотомированные DRG	Неповрежденные DRG
Ядерная фракция		
1 ч	0,305±0,104	0,365±0,104
4 ч	1,371±0,12*#	0,993±0,07#
24 ч	1,121±0,171#	1,190±0,174#
Цитоплазматическая фракция		
1 ч	0,340±0,1	0,305±0,1
4 ч	0,993±0,07*#	0,681±0,09#
24 ч	0,777±0,09#	0,663±0,08#

Примечание. Данные иммуноблоттинга, выраженные в относительных единицах: отношение оптической плотности полосы исследуемого белка (E2F1) к оптической плотности полосы маркера белковой нагрузки (β-актина). One Way ANOVA. Среднее значение ± стандартная ошибка среднего. * – $p < 0,05$ относительно неповрежденных DRG. # – $p < 0,01$ относительно значений через 1 час после аксотомии, $n = 7$.

Для оценки участия E2F1 в индуцированном аксотомией апоптозе клеток DRG мы использовали коэффициент колокализации E2F1 с TUNEL-положительными клетками. Повышенная колокализация E2F1-позитивных клеток с маркером апоптоза TUNEL по сравнению с контрольными контралатеральными DRG предполагает, что апоптоз в аксотомированных ганглиях был связан со сверхэкспрессией E2F1 (табл. 2).

Таблица 2

Апоптотический индекс и коэффициент колокализации E2F1 с TUNEL-положительными клетками в DRG крысы через 7 дней после перерезки седалищного нерва

Показатель	Аксотомированные DRG	Неповрежденные DRG
Апоптотический индекс	65±3,5*	5±1,8
Коэффициент Мандерса M1	1,24±0,1*	0,25±0,1

Примечание. One Way ANOVA. Среднее значение ± стандартная ошибка среднего. * – p<0,01 относительно неповрежденных DRG, n=7.

Полученные данные предполагают ранний E2F1-зависимый ответ нейронов и глиальных клеток, развивающийся при стрессе. В случае цитоплазматической локализации одной из возможных функций E2F1 является его взаимодействие с митохондриями и регуляция их функций, например, путем прямого взаимодействия с белком Bcl-xL на наружной митохондриальной мембране и регуляции ее проницаемости [5].

Заключение

E2F1 – универсальный белок, играющий важную роль во внутриклеточной передаче сигналов. Наши данные указывают на то, что E2F1 является важной терапевтической мишенью, поскольку проведенные исследования продемонстрировали участие фактора транскрипции E2F1 в запуске повреждения нейронов DRG и глиальных клеток после аксотомии. Детальный анализ нарушения пути аксотомия – E2F1 важен для понимания процессов запуска и развития нейродегенерации. Открытие E2F1-зависимых путей апоптоза в нейронах и глии аксотомированных ганглиев может выявить новые мишени для лечения нейротравмы и ее последствий. Эти соображения и будут предметом нашей следующей работы. Такая стратегия будет направлена на спасение клеток от гибели и иметь терапевтический эффект, направленный, например, на восстановление количества нейронов после нейротравмы, как концептуальная альтернатива трансплантации клеток. Наши новые данные указывают на то, что E2F1 может быть потенциальным биомаркером на ранних стадиях после нейротравмы, а ингибиторы E2F1 могут быть рассмотрены в качестве терапевтических средств в этот ранний период после повреждения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028 и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rishal I., Fainzilber M. Axon-soma communication in neuronal injury // Nat Rev Neurosci. 2014. Vol. 15, № 1. P. 32–42.
2. Polager S., Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death // Nat Rev Cancer. 2009. V. 9. № 10. P. 738-48.
3. Biswas A.K., Johnson D.G. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage // Cancer Res. 2012. Vol.72, № 1. P. 13–7.
4. Ma L., Yu H.J., Gan S.W., Gong R., Mou K.J., Xue J., Sun S.Q. p53-Mediated oligodendrocyte apoptosis initiates demyelination after compressed spinal cord injury by enhancing ER-mitochondria interaction and E2F1 expression // Neurosci Lett. 2017. Vol. 644. P. 55–61.
5. Raimundo N., Song L., Shutt T.E., McKay S.E., Cotney J., Guan M.X., Gilliland T.C., Hohuan D., Santos-Sacchi J., Shadel G.S. Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness // Cell. 2012. Vol. 148, № 4. P. 716–26.
6. Dzreyan V.A., Rodkin S.V., Pitinova M.A., Uzdensky A.B. HDAC1 Expression, Histone Deacetylation, and Protective Role of Sodium Valproate in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection // Mol Neurobiol. 2021. Vol. 58, № 1. P. 217–228.
7. Dzreyan V., Rodkin S., Nikul V., Pitinova M., Uzdensky A. The Expression of E2F1, p53, and Caspase 3 in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection // J. Mol Neurosci. 2021. Vol. 71, № 4. P. 826–835.
8. Esposito M.F., Malayil R., Hanes M., Deer T. Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation // Pain Med. 2019. Vol. 20, № 1. P. S23–S30.
9. Martin S.L., Reid A.J., Verkhatsky A., Magnaghi V., Faroni A. Gene expression changes in dorsal root ganglia following peripheral nerve injury: roles in inflammation, cell death and nociception // Neural Regen Res. 2019. Vol. 14. № 6. P. 939–947.
10. Savastano L.E., Laurito S.R., Fitt M.R., Rasmussen J.A., Gonzalez Polo V., Patterson S.I. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery // J. Neurosci Methods. 2014. Vol. 227. P. 166–80.

БАЛАНС ПРОТЕАЗ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ИХ ИНГИБИТОРОВ В КУЛЬТУРАХ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Максимова, И.М. Ращупкин, Т.В. Тыринова

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Аннотация

Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток врожденного иммунитета. Они имеют важное значение для репарации тканей, поскольку являются основными клетками-регуляторами данного процесса. Помимо регуляции функциональной активности фибробластов, макрофаги оказывают прямое влияние на внеклеточный матрикс, контролируя процесс его синтеза/деградации с помощью продукции различных факторов, в частности, матричных металлопротеиназ и их ингибиторов. Однако на сегодняшний день неясно, как дифференцировочные и поляризующие стимулы влияют на продукцию данных факторов макрофагами. В настоящем исследовании оценивали продукцию металлопротеиназы 9 (MMP-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (TIMP-1) макрофагами человека, дифференцированными M-CSF или GM-CSF и поляризованными липополисахаридом, IL-4, дексаметазоном и взаимодействием с апоптотическими клетками (эффероцитоз). M-CSF-дифференцированные макрофаги вне зависимости от поляризующего стимула отличались более высоким уровнем продукции MMP-9, крайне низким уровнем TIMP-1 и, соответственно, высоким индексом MMP-9/TIMP-1 по сравнению с GM-CSF-дифференцированными аналогами. При этом между собой культуры M-CSF-дифференцированных макрофагов значимо не различались. В культурах GM-CSF-дифференцированных клеток выделялись макрофаги, поляризованные в M2 направлении в результате эффероцитоза, поскольку высоко продуцировали TIMP-1. Условия поляризации GM-CSF-дифференцированных макрофагов влияли также на соотношение MMP-9/TIMP-1. Так, макрофаги, поляризованные дексаметазоном, характеризовались более высоким значением MMP-9/TIMP-1 по сравнению с другими GM-CSF-дифференцированными подтипами, в то время как макрофаги, поляризованные в результате эффероцитоза, напротив, демонстрировали минимальный уровень MMP-9/TIMP-1. Обобщая полученные данные, можно заключить, что M-CSF направляет дифференцировку макрофагов в клетки с выраженной фибролитической активностью, в то время как GM-CSF-дифференцированные макрофаги являются более гетерогенной популяцией клеток, и в зависимости от поляризующего стимула могут проявлять как антифиброгенную (дексаметазон), так профиброгенную (эффероцитоз) активность.

Ключевые слова: макрофаги, поляризующие стимулы, внеклеточный матрикс, матричные металлопротеиназы.

BALANCE OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEASES AND THEIR INHIBITORS IN CULTURES OF VARIOUS FUNCTIONAL PHENOTYPES OF HUMAN MACROPHAGE

A.A. Maksimova, I.M. Rashchupkin, T.V. Tyrinova

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Annotation

Macrophages are a heterogeneous population of innate immune cells. They are important for tissue repair because they are the main regulators of this process. In addition to the orchestration of the functional activity of fibroblasts, macrophages have a direct effect on the extracellular matrix, controlling the process of its synthesis/degradation through the production of various factors, in particular, matrix metalloproteinases and their inhibitors. However, it is unclear how differentiation and polarization stimuli affect macrophages' production of these factors. This study evaluated the production of metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) by human macrophages differentiated by M-CSF or GM-CSF and polarized with lipopolysaccharide, IL-4, dexamethasone, and by interaction with apoptotic cells (efferocytosis). M-CSF-differentiated macrophages, regardless of the polarizing stimulus, were characterized by a higher level of MMP-9 production, an extremely low level of TIMP-1, and a high MMP-9/TIMP-1 ratio compared to GM-CSF-

differentiated analogs. But the M-CSF-differentiated macrophage cultures did not differ significantly from each other. Macrophages polarized in the M2 direction by efferocytosis were characterized by the highest TIMP-1 production compared to other GM-CSF-differentiated cells. The polarization state of GM-CSF-differentiated macrophages also affected the MMP-9/TIMP-1 ratio. Thus, macrophages polarized by dexamethasone were characterized by a higher level of MMP-9/TIMP-1 compared to other GM-CSF-differentiated subtypes, while macrophages polarized by efferocytosis, on contrary, showed a minimal level of MMP-9/TIMP-1. Summing up the results, M-CSF induces macrophages with pronounced fibrolytic activity, whereas GM-CSF-differentiated macrophages are a more heterogeneous cell population, and they can be both anti-fibrogenic (dexamethasone) and profibrogenic (efferocytosis) depending on the polarizing stimulus.

Key words: macrophages, polarizing stimuli, extracellular matrix, matrix metalloproteinases.

Актуальность. Процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса занимает важное положение в репарации тканей. Его дисрегуляция приводит к развитию различных патологических состояний – неполноте восстановления ткани, с одной стороны, и избыточному отложению внеклеточного матрикса с развитием фиброза – с другой. Известно, что в воспалении и репарации поврежденных тканей ведущую роль играют макрофаги, которые, секретируя различные факторы, регулируют скорость пролиферации и характер дифференцировки клеток [1]. Так, одним из возможных способов регуляции процесса синтеза/деградации внеклеточного матрикса является продукция коллагеназ (матриксных металлопротеиназ (ММП), катепсина и др.) и их эндогенных супрессоров (тканевых ингибиторов металлопротеиназ – ТИМП и пр.) [2]. Однако механизмы про- и антифиброгенной активности макрофагов человека изучены недостаточно. Более того, макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, и на сегодняшний день неясно, как дифференцировочные и поляризирующие стимулы влияют на продукцию данных факторов макрофагами человека.

Цель исследования – оценить продукцию ММП-9 и ТИМП-1 различными функциональными фенотипами макрофагов человека.

Материал и методы

M-CSF и GM-CSF-дифференцированные M1 (LPS, липополисахарид), M2a(IL-4), M2c(Dex, дексаметазон) макрофаги получали из адгезивной фракции моноклеарных клеток (МНК) периферической крови доноров, как описано в [3]. Культуры M2(LS, Low Serum) генерировали согласно оригинальному протоколу, в котором ключевым механизмом индукции M2-фенотипа является эффероцитоз. Для этого МНК культивировали в среде RPMI-1640, дополненной GM-CSF (50 нг/мл) и 2 % аутоплазмы (условия дефицита ростовых / сывороточных факторов) в течение 7 дней; время адгезии увеличивали до 18 ч. Концентрацию ММП-9 и ТИМП-1 определяли в 7-суточных супернатантах макрофагов с помощью соответствующих ELISA kit (R&D System, США) согласно инструкции производителя. Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения Statistica 8.0. Данные представлены в виде медианных значений. Значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона и критерия Манн–Уитни; различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Мы оценили уровень продукции ММП на примере ММП-9 как наиболее важной протеазы, продуцируемой макрофагами и принимающей участие в развитии фиброза. Макрофаги, дифференцированные M-CSF, активно продуцировали ММП-9 на хорошо детектируемом уровне, который не зависел от используемого поляризирующего сигнала – LPS, IL-4 или дексаметазон (8690, 9140 и 9000 пг/мл соответственно) (рис. 1, А). В свою очередь, GM-CSF-дифференцированные клетки характеризовались значимо более низким (практически в 2 раза) уровнем продукции ММП-9 (рис. 1, Г). При этом среди исследуемых фенотипов значимых различий, как и для M-CSF-дифференцированных клеток, обнаружено не было.

Далее мы оценили уровень продукции ТИМП-1. M-CSF-дифференцированные макрофаги слабо продуцировали ТИМП-1 (на нижнем уровне чувствительности метода, <80 пг/мл) (рис. 1, Б). Напротив, GM-CSF-дифференцированные макрофаги активно продуцировали данный ингибитор (рис. 1, Д). При этом максимальный уровень продукции ТИМП-1 был характерен для M2(LS) – 1710 пг/мл, что значимо превышало таковой для LPS, IL-4 или дексаметазона ($p_w = 0,018$; $0,018$ и $0,027$ соответственно). Поскольку известно, что ТИМП-1 у человека является индуцибельным ингибитором [4], можно предположить, что условия дифференцировки влияют на способность макрофагов продуцировать ТИМП-1.

Так как в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани важную роль играет баланс ММП и ТИМП [5], мы также проанализировали значение соотношения

MMP-9/TIMP-1. Поскольку M-CSF-дифференцированные макрофаги отличались низкой TIMP-1-продуцирующей активностью, для всех исследуемых функциональных фенотипов был характерен максимально высокий индекс MMP-9/TIMP-1. Напротив, GM-CSF-дифференцированные макрофаги характеризовались значимо более низкими показателями MMP-9/TIMP-1 ($p_U = 0,001$). Более того, величина соотношения в этом случае зависела от используемого поляризирующего стимула. Так, M2c(Dex) отличались максимальным значением индекса MMP-9/TIMP-1, которое составляло 9,66, что значимо превышало показатели M1(LPS), M2a(IL-4) (5,61 и 9,0 соответственно, $p_W = 0,05$) и M2(LS) (3,28; $p_W = 0,018$). Данная особенность GM-CSF-дифференцированных M2c(Dex) может отражать один из вероятных механизмов антифиброгенной активности этих клеток. Напротив, M2(LS) характеризовались значимо более низкими значениями MMP-9/TIMP-1 по сравнению с M2a(IL-4) и M2c(Dex) ($p_W = 0,018$). Высокий уровень продукции TIMP-1 и низкие значения индекса MMP-9/TIMP-1 могут свидетельствовать о профиброгенном потенциале этих клеток.

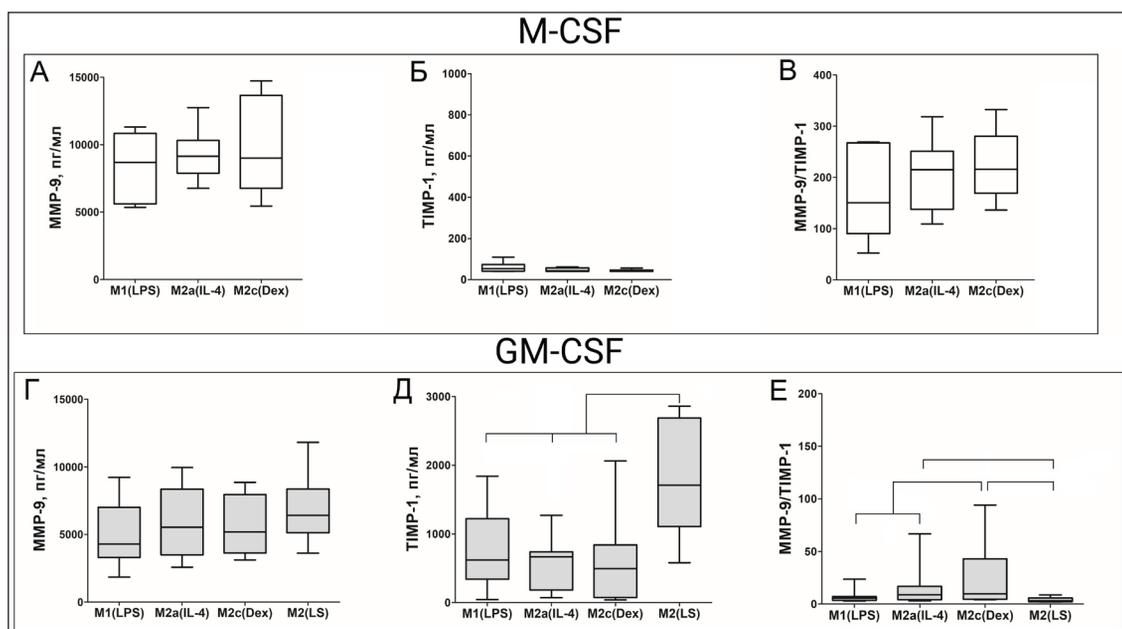


Рис. 1. Продукция MMP-9 и TIMP-1 и индекс MMP-9/TIMP-1 в культурах макрофагов, дифференцированных M-CSF (A–B) и GM-CSF (Г–Е). Данные представлены в Me, LQ–UQ, 25–75 % и min–max, $n=15$, $p<0,05$

Заключение

M-CSF-дифференцированные макрофаги вне зависимости от поляризирующего стимула характеризуются выраженным фибролитическим потенциалом, о чем свидетельствует смещение баланса MMP-9/TIMP-1 в сторону низкого уровня продукции TIMP-1. В культурах GM-CSF-дифференцированных макрофагов, в целом активно продуцирующих TIMP-1, соотношение MMP-9/TIMP-1 варьирует в зависимости от поляризирующего стимула, что свидетельствует о наличии как антифиброгенной (при поляризации дексаметазоном), так и профиброгенной (при поляризации эфферозитозом) активности. Тем не менее для получения однозначных выводов необходимо проанализировать продукцию остальных типов протеаз внеклеточного матрикса и ингибиторов.

Работа выполнена в рамках НИР (№ госрегистрации 122011800324-4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lis-López L., Bauset C., Seco-Cervera M., Cosin-Roger J. Is the Macrophage Phenotype Determinant for Fibrosis Development? // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 12. P. 1747.
2. Braga T., Agudelo J., Camara N. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe // *Frontiers in Immunology*. 2015. Vol. 25, № 6. P. 602.
3. Yankovskaya A.A., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Dome A.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Allostimulatory activity as a criterion of the functional phenotype of human macrophages // *Human Immunology*. 2019. Vol. 80, № 10. P. 890–896.
4. Pardo A., Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling // *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006. Vol. 3, № 4. P. 383–388.
5. Robert S., Gicquel T., Victoni T., Valença S., Barreto E., Bailly-Maître B., Boichot E., Lagente V. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis // *Bioscience Reports*. 2016. Vol. 36, № 4. P. e00360.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИЗАТА АУТОЛОГИЧНЫХ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОГРАММЕ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ НА ФОНЕ «ТОНКОГО» ЭНДОМЕТРИЯ

А.К. Нуркина, М. Оспанова, С.А. Абдрахманова

РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан

Аннотация

Описан положительный эффект применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), на рецептивность эндометрия при подготовке женщин к экстракорпоральному оплодотворению. ПОРФТ изготавливали на базе РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Нур-Султан. Применение данной плазмы в качестве терапии проводилось на базе клиники экстракорпорального оплодотворения и репродуктивного здоровья «Геном». После терапии с применением ПОРФТ у пациенток наблюдалось увеличение толщины эндометрия, а у 62,5 % пациенток – наступление беременности.

Ключевые слова: лизат аутологичных тромбоцитов, плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, экстракорпоральное оплодотворение, «тонкий» эндометрий, лечение бесплодия, регенеративные факторы.

THE USE OF AUTOLOGOUS PLATELET LYSATE IN THE INFERTILITY TREATMENT PROGRAM AGAINST THE BACKGROUND OF A «THIN» ENDOMETRIUM

A.K. Nurkina, M. Ospanova, S.A. Abdrakhmanova

RSE on PCV "Scientific and Production Center of Transfusiology" of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Nur-Sultan, Republic Kazakhstan

Annotation

This article describes the positive effect of plasma enriched with soluble platelet factors (PORFT) on endometrial receptivity in preparing women for in vitro fertilization. PORFT was manufactured on the basis of the Republican State Enterprise on the REM "Research and Production Center of Transfusiology" of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Nur-Sultan city. The use of this plasma as a therapy was carried out on the basis of the clinic for in vitro fertilization and reproductive health «Genome». After therapy with PORFT, patients experienced an increase in the thickness of the endometrium, and 62,5 % of patients experienced pregnancy.

Key words: autologous platelet lysate, plasma enriched with soluble platelet factors, in vitro fertilization, "thin" endometrium, infertility treatment, regenerative factors.

Актуальность. Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), или, другими словами, лизат тромбоцитов на сегодняшний день набирает обороты в применении и является эффективной терапией при таких заболеваниях как: хроническая ишемия нижних конечностей, остеоартрит, травмы опорно-двигательного аппарата, незаживающие язвы, кератоконъюнктивиты, гинекологические заболевания и т.д. ПОРФТ также активно применяют в косметологии и репродуктивной медицине [1, 2].

На сегодняшний день выявлены возможности приготовления аутологичной и аллогенной ПОРФТ, и разработан метод ее получения и хранения. В результате экспериментальных исследований ученых по всему миру получены новые сведения о пролиферативной активности лизата тромбоцитов в отношении фибробластов животных и человека. Изучено и доказано рост-стимулирующее действие ПОРФТ на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека, определена оптимальная концентрация регенеративных факторов, стимулирующих пролиферацию МСК [3, 4].

Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, активно применяется в репродуктивной медицине, так как при лизировании высвобождаются регенеративные факторы тромбоцитов, которые, в свою очередь, дают положительные результаты в лечении гинекологических заболеваний, например бесплодие на фоне «тонкого» эндометрия [5].

Использование лизата аутологичных тромбоцитов для улучшения рецептивности эндометрия привлекает все большее внимание в технологиях вспомогательной репродукции. Важная роль цитокинов и факторов роста при имплантации эмбриона известна давно. Эти сигнальные молекулы присутствуют и высвобождаются клетками крови во время физиологического, нормального роста эндометрия и имплантации. Аналогичные медиаторы крови высвобождаются из гранул тромбоцитов при повреждении кровеносного сосуда [6,7].

Несмотря на широкое применение, данная терапия требует изучения, так как аутологичный лизат тромбоцитов изготавливается из цельной крови, что увеличивает вероятность присутствия факторов роста, которые высвобождаются мононуклеарными клетками периферической крови [8, 9].

Применение терапии плазмой, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, является весьма привлекательным благодаря многочисленным положительным результатам. Методы её применения в репродуктологии находятся на стадии изучения.

Цель исследования – оценить эффективность лечения плазмой, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, пациенток с бесплодием на фоне «тонкого» эндометрия, улучшить качество эндометрия и показатели имплантации после введения ПОРФТ.

Материал и методы

Лизат тромбоцитов изготавливали на базе Научно-производственного центра трансфизиологии. Периферическую кровь пациенток собирали в гемаконы, затем центрифугировали их дважды. На первом этапе центрифугирования (1200 об/мин, 10 мин при температуре +22 °С, с минимальным торможением) получали обогащенную тромбоцитами плазму. На втором получали концентрат тромбоцитов (3200 об/мин, 15 мин при температуре +22 °С). Оптимальная концентрация тромбоцитов регулировалась в пределах 1200–2000x10⁹/л).

Концентрат тромбоцитов без криопротектора помещали в рефрижератор на температуру –80 °С. После получения результатов анализов на стерильность концентрат тромбоцитов снова центрифугировали (3200 об/мин, 15 мин при температуре +22 °С) и в стерильных условиях ламинарного бокса разливали по флаконам, которые в дальнейшем репродуктологи использовали в терапии.

В рамках исследования участвовали 16 пациенток клиники экстракорпорального оплодотворения и репродуктивного здоровья «Геном», в возрасте от 29 до 53 лет с «тонким» эндометрием в анамнезе. Исключением стали пациентки без неудачных попыток ЭКО и пациентки с предшествующим ЭКО, но без «тонкого» эндометрия.

Аутологичную плазму, обогащенную растворимыми факторами тромбоцитов, вводили путем инфузии с помощью катетера в полость матки на десятый день заместительной гормональной терапии, а затем через 48–72 ч после первого введения. В зависимости от заключения репродуктолога, инфузия проводилась трижды.

Результаты

В результате применения ПОРФТ параллельно с заместительной гормональной терапией можно отметить следующее:

- В 62,5 % положительные результаты тестов на беременность (10 пациенток), из которых 4 живорождения (25 %), 3 развивающиеся беременности (18,75 %) и 3 замершие беременности (18,75 %);
- В 37,5 % отрицательные результаты.

Анализируя заключение гинекологического ультразвукового исследования, можно заметить, что средняя толщина эндометрия в пролиферативной фазе составляла 3,4 мм, что являлось неблагоприятной толщиной для переноса эмбрионов. После терапии с применением ПОРФТ толщина эндометрия, которая фиксировалась перед переносом эмбрионов, достигала в среднем до 8,1 мм, что увеличивало шансы на прикрепление эмбриона.

Заключение

ПОРФТ легко изготовить из цельной крови, она имеет низкую стоимость и содержит высокую концентрацию факторов роста, что обеспечивает широкое применение. Поскольку лизат тромбоцитов является аутологичным препаратом, следовательно, нетоксичным и неаллергенным, его можно использовать при различных заболеваниях в качестве вспомогательного средства к традиционному лечению.

Исследования в области репродуктологии показали отличный результат, который позволяет рекомендовать ПОРФТ в качестве вспомогательной терапии.

Работа поддержана Научно-производственным центром трансфузиологии и клиники репродуктивного здоровья «Геном».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tandulwadkar S.R., Naralkar M.V., Surana A.D., Selvakarthick M., Kharat A.H.* Autologous intrauterine platelet-rich plasma instillation for suboptimal endometrium in frozen embryo transfer cycles: a pilot study // *J. Hum Reprod Sci.* 2017. Vol.10, № 3. P. 208–12.
2. *Molina A., Sánchez J., Sánchez W., Vielma V.* Platelet-rich plasma as an adjuvant in the endometrial preparation of patients with refractory endometrium // *JBRA Assisted Reproduction.* 2018. Vol. 22, № 1. P. 42–8.
3. *Farimani M., Poorolajal J., Rabiee S., Bahmanzadeh M.* Successful pregnancy and live birth after intrauterine administration of autologous platelet-rich plasma in a woman with recurrent implantation failure: a case report // *Int J. Reprod Biomed.* 2017. Vol. 15, № 12. P. 803–6.
4. *Nazari L., Salehpour S., Hoseini S., Zadehmodarres S., Ajori L.* Effects of autologous platelet-rich plasma on implantation and pregnancy in repeated implantation failure: a pilot study // *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2016. Vol. 14, № 10. P. 625–8.
5. *Aghajanova L., Houshdaran S., Balayan S., Manvelyan E., Irwin J.C., Huddleston H.G. et al.* In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration // *J. Assist Reprod Genet.* 2018. Vol. 35, № 5. P. 757–70.
6. *Marques L.F., Stessuk T., Camargo I.C., Sabe Junior N., dos Santos L., Ribeiro Paes J.T.* Platelet rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. *Platelets* // 2015. Vol. 26. P. 101–13.
7. *Metcalf E.S.* The effect of platelet-rich plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE) // *J. Equine Vet Sci.* 2014. Vol. 34. P. 128.
8. *Reghini M.F.S., Neto C.R., Segabinazzi L.G., Chaves M.B.B.C., Dell'Aqua CPF, Bussiere M.C.C. et al.* Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology.* 2016. Vol. 86. P. 516–22.
9. *Marini M.G., Perrini C., Esposti P., Corradetti B., Bizzaro D., Riccaboni P. et al.* Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation *in vitro* // *Reprod Biol Endocrinol.* 2016. Vol. 14. P. 58–75.

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК SH-SY5Y В УСЛОВИЯХ, МОДУЛИРУЮЩИХ ИШЕМИЮ/ГИПОКСИЮ IN VITRO

И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Т.В. Тыринова

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Аннотация

Макрофаги (Мф) человека, представленные в ЦНС микроглией и Мф моноцитарного происхождения, играют важную роль в запуске и опосредовании нейрорегенеративных процессов. Одним из ключевых свойств Мф является пластичность, т.е. способность изменять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения. Известно, что Мф с М1-фенотипом обладают провоспалительной и тканедеструктивной активностью, в то время как М2-клетки имеют противовоспалительные свойства, участвуют в разрешении воспаления и стимуляции репаративных процессов. М2-фенотип макрофагов индуцируется под действием различных факторов: IL-4/IL-13, IL-10, дексаметазона, а также в условиях эффероцитоза (поглощения апоптотического материала). Учитывая, что эффероцитоз является важным этапом регенерации, ранее нами был разработан оригинальный протокол генерации М2 Мф, в котором М2-фенотип Мф формируется в результате взаимодействия с апоптотическими клетками. Полученные по такому протоколу М2 (LS, Low Serum) Мф имеют высокий уровень продукции нейротрофических факторов. Ранее нами был показан стимулирующий эффект М2(LS) на пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников в условиях депривации сывороточных факторов. Однако нейропротективный эффект Мф с данным фенотипом изучен не был. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния растворимых факторов М2(LS) Мф в сравнении с «классическими» М1 (IFN-γ) и М2a(IL-4) на жизнеспособность клеток линии нейробластомы SH-SY5Y в условиях, модулирующих ишемию/гипоксию *in vitro*. Условия ишемии моделировали посредством частичной депривации сывороточных факторов (1 % FBS), гипоксии - добавлением CoCl₂ стабилизатора фактора, индуцируемого гипоксией (HIF). В условиях ишемии/гипоксии жизнеспособность клеток SH-SY5Y снижалась уже на ранних сроках культивирования (3-и сут) с последующим более чем двукратным снижением к 7-м сут. Присутствие кондиционной среды (КС) М2(LS), в отличие от КС-М1(IFN-γ) и КС-М2a(IL-4), оказывало протективный эффект уже на 3-и сут культивирования. На позднем этапе культивирования, к 7-м сут, присутствие как КС-М2(LS), так и КС-М2a(IL-4) повышало жизнеспособность клеток SH-SY5Y, однако влияние КС-М2(LS) было значимо более выраженным. Обобщая полученные данные, можно сделать

вывод о нейропротективном эффекте M2(LS) Мф в модели ишемии/гипоксии *in vitro*, значимую роль в опосредовании которого играют растворимые факторы.

Ключевые слова: макрофаги, растворимые факторы, нейропротекция, ишемия, гипоксия, клетки SH-SY5Y.

THE EFFECT OF HUMAN MACROPHAGES-DERIVED SOLUBLE FACTORS ON THE VIABILITY OF SH-SY5Y CELLS UNDER CONDITIONS MODULATING ISCHEMIA/HYPOXIA *IN VITRO*

I.M. Rashchupkin, A.A. Maksimova, T.V. Tyrinova

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Annotation

Human macrophages, represented in the CNS by microglia and macrophages of monocytic origin, play an important role in triggering and mediating neuroregenerative processes. A characteristic feature of macrophages is plasticity, i.e. ability to change their functional phenotype depending on the micromilieu. It is known that macrophages with M1 phenotype have pro-inflammatory and tissue-destructive activity, whereas M2 cells have anti-inflammatory properties, are involved in resolving inflammation and stimulating reparative processes. M2 phenotype of macrophages is induced by various factors: IL-4/IL-13, IL-10, dexamethasone, as well as under conditions of efferocytosis (the uptake of apoptotic material). Taking into account that efferocytosis is an important step in regeneration, we previously developed an original protocol for the generation of M2 macrophages. According to this protocol, the M2 phenotype of macrophages is formed as a result of interaction with apoptotic cells. The M2(LS, Low Serum) macrophages obtained in this way are characterized by a high level of neurotrophic factors production. Previously, we have shown the stimulating effect of M2(LS) on the proliferation and differentiation of neural progenitors under conditions of serum factors deprivation. However, the neuroprotective effect of these macrophages has not been studied. The aim of this study was to evaluate the effect of M2(LS)-derived soluble factors in comparison with the "classical" M1(IFN- γ) and M2a(IL-4) factors on the viability of SH-SY5Y neuroblastoma cells under conditions that modulate ischemia/hypoxia *in vitro*. Conditions of ischemia were modeled by partial deprivation of serum factors (1% FBS), hypoxic conditions - by adding CoCl₂, a hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizer. Under ischemic/hypoxic conditions the viability of SH-SY5Y cells decreased already at the early stages of cultivation (day 3) followed by a more than twofold decrease by day 7. The presence of conditioned medium (CM) of M2(LS), unlike CM-M1(IFN- γ) and CM-M2a(IL-4), had a protective effect already on the day 3 of cultivation. At the late stage of cultivation, by day 7, the presence of both CM-M2(LS) and CM-M2a(IL-4) increased the viability of SH-SY5Y cells, but the effect of CM-M2(LS) was significantly more pronounced. Summarizing the obtained data, we can conclude that M2(LS) macrophages have a neuroprotective effect in the *in vitro* model of ischemia/hypoxia, which is mediated by soluble factors.

Key words: macrophages, soluble factors, neuroprotection, ischemia, hypoxia, SH-SY5Y cells.

Актуальность. Известно, что нервная система взрослого человека обладает способностью к регенерации [1]. Макрофагам (Мф) отводится ведущая роль в запуске и опосредовании нейрорегенеративных процессов. Известно, что Мф с М1-фенотипом опосредуют воспаление и обладают тканедеструктивной активностью, в то время как М2 участвуют в разрешении воспаления и стимулируют репаративные процессы [2]. Так, в модели спинномозговой травмы у мышей было показано, что высокое соотношение М2/М1 Мф в очаге повреждения способствует локализации воспалительного процесса, более быстрой репарации ткани и регенерации аксонов [3]. Известно, что М2-фенотип Мф индуцируется под влиянием различных факторов, таких как цитокины (IL-4/IL-13, IL-10, TGF- β), гормоны (дексаметазон), а также взаимодействие Мф с апоптотическим материалом (эффероцитоз) [4, 5]. Поскольку эффероцитоз является важным этапом репарации повреждений, ранее нами был разработан оригинальный протокол генерации Мф из моноцитов периферической крови человека, в котором М2-фенотип Мф формируется в результате взаимодействия с апоптотическими клетками. Полученные по этому протоколу М2 (LS, Low Serum) Мф характеризуются низкой аллостимуляторной активностью, низким уровнем продукции провоспалительных цито-

кинов (IL-1, TNF- α) и высоким – ростовых и нейротрофических факторов (VEGF, IGF-1, BDNF и др.) [6], что позволяет сделать вывод о возможном наличии у них нейропротективных свойств. Поскольку важную роль в нейрорегенерации играют нейральные стволовые клетки (НСК), особый интерес представляет исследование влияния Мф на свойства этих клеток. В качестве модели НСК нами была выбрана линия SH-SY5Y нейробластомы человека, клетки которой в недифференцированном состоянии способны к сферообразованию и экспрессируют маркеры незрелых клеток нервной ткани (нестин, даблкортин) [7]. Ранее нами был показан стимулирующий эффект M2(LS) на пролиферацию и дифференцировку клеток SH-SY5Y [8]. Однако в модели повреждения *in vitro* M2(LS) до настоящего момента исследованы не были.

Цель исследования – оценка влияния растворимых факторов M2(LS) макрофагов человека на жизнеспособность клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y в условиях гипоксии и частичной депривации ростовых/сывороточных факторов.

Материал и методы

Клетки SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 с 10 % FBS при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Пассирование клеток производилось при достижении 70–80 % монослоя. Условия ишемии моделировали посредством частичной депривации сывороточных факторов (1 % FBS), гипоксии – добавлением CoCl₂ стабилизатора фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), в дозе 100 мкмоль. Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии по включению 7-аминоактиномицина-D (7-AAD) (7-AAD⁻ клетки определяли как жизнеспособные).

Макрофаги генерировали из адгезивной фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови доноров. 3-5х10⁶/мл МНК культивировали в присутствии GM-CSF (50 нг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 7 сут. Генерацию M1 и M2a Мф осуществляли в присутствии 10 % FBS, добавляя на 5-е сут IFN-γ (200 ЕД/мл) или IL-4 (20 нг/мл) соответственно. M2(LS) генерировали в условиях дефицита ростовых/сывороточных факторов (2 % аутоплазмы) [6]. Кондиционную среду (КС) полученных Мф собирали, центрифугировали и хранили при температуре –80 °С.

Статистическая обработка полученных данных была проведена в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки (M±SE). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Результаты

При культивировании в условиях, модулирующих ишемию/гипоксию, жизнеспособность клеток SH-SY5Y снижалась до 84,7±4,9 % (против 92,5±3,8 % в нормальных условиях) через 3 сут и до 36,5±5,8 % (против 95,7±0,6%) через 7 сут (p<0,05) (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что культивирование клеток SH-SY5Y в условиях депривации ростовых факторов сыворотки и присутствии «химического» индуктора гипоксии CoCl₂ в течение 7 дней практически в 3 раза снижает их выживаемость. На следующем этапе работы мы оценили протективный эффект КС, полученных от разных субтипов макрофагов,

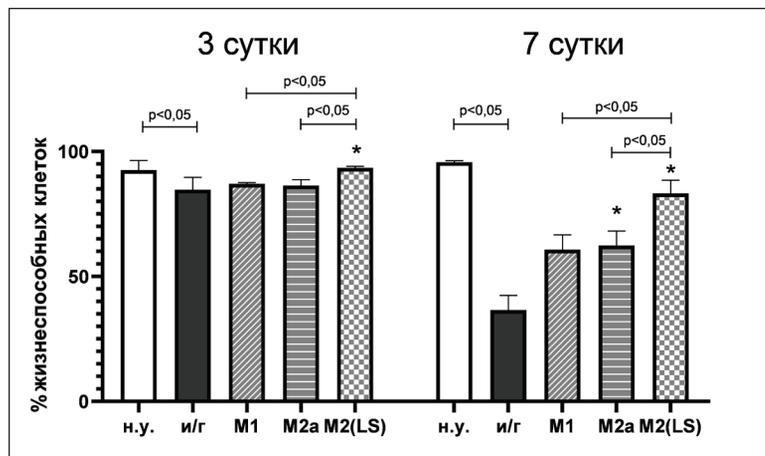


Рис. 1. Влияние кондиционных сред макрофагов на жизнеспособность клеток линии SH-SY5Y в модели ишемии/гипоксии. * – p<0,05 по сравнению с культивированием в условиях ишемии/гипоксии. н.у. – нормальные условия, и/г – ишемия/гипоксия

в модели ишемии/гипоксии. С этой целью клетки SH-SY5Y культивировали в присутствии 30 % КС (v/v). Было показано, что через 3 сут протективный эффект регистрировался только при использовании КС-M2(LS): $93,4 \pm 0,6$ % жизнеспособных клеток ($p < 0,05$). В то же время уровень жизнеспособности клеток SH-SY5Y при добавлении КС-M1 ($87,0 \pm 0,6$ %) и КС-M2a ($86,3 \pm 2,4$ %) не отличался от такового в контроле ($84,7 \pm 4,9$ %) ($p > 0,05$). На 7-е сут протективный эффект КС-M2(LS) сохранялся, причем количество жизнеспособных клеток SH-SY5Y более чем в два раза превышало контрольные значения ($83,2 \pm 5,3$ % против $36,5 \pm 5,8$ % в контроле, $p < 0,05$). Добавление КС-M2a(IL-4) также улучшало выживаемость клеток, однако выраженность протективного эффекта была значимо ниже по сравнению с КС-M2(LS) ($p < 0,05$). В отличие от растворимых факторов M2-макрофагов, КС-M1(IFN- γ) повышали жизнеспособность SH-SY5Y лишь в виде тренда ($60,7 \pm 5,9$ %, $p = 0,08$).

Заключение

Таким образом, GM-CSF-дифференцированные макрофаги человека с M2-фенотипом улучшают выживаемость клеток SH-SY5Y в условиях химической гипоксии и дефицита сывороточных факторов. При этом протективный эффект M2(LS) проявляется как на ранних, так и на поздних сроках культивирования, в то время как эффект M2a(IL-4) регистрируется только на поздних сроках. Полученные данные свидетельствуют о нейропротективном эффекте M2-макрофагов, который реализуется через растворимые факторы.

Работа выполнена в рамках темы НИР «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секретоста» (Номер гос. регистрации в ЕГИСУ НИОКТ 122011800324-4).

ЛИТЕРАТУРА

- Xu X., Warrington A.E., Bieber A.J., Rodrigues M. Enhancing CNS repair in neurological disease: challenges arising from neurodegeneration and rewiring of the network // *CNS Drugs*. 2011. Vol. 25, № 7. P. 555–573.
- Devanney N.A., Stewart A.N., Gensel J.C. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: the role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma // *Exp. Neurol*. 2020. Vol. 329. P. 113310.
- Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // *J. Neurosci*. 2009. Vol. 29 (43). P. 13435–13444.
- Xiang X., Li Y., Fu M., Xin H-B. Polarizing macrophages in vitro // *Methods in Molecular Biology*. 2018. Vol. 1784. P. 119–126.
- Lin J., Xu A., Jin J., Zhang M., Lou J., Qian C., Zhu J., Wang Y., Yang Z., Li X., Yu W., Liu B., Tao H. MerTK-mediated efferocytosis promotes immune tolerance and tumor progression in osteosarcoma through enhancing M2 polarization and PD-L1 expression // *Oncoimmunology*. 2022. Vol. 11, № 1. P. 2024941.
- Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions // *Scand J. Immunol*. 2016. Vol. 83, № 2. P. 151–159.
- Ferlemann F.C., Menon V., Condurat A.L., Rossler J., Pruszek J. Surface marker profiling of SH-SY5Y cells enables small molecule screens identifying BMP4 as a modulator of neuroblastoma differentiation. *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, №1. P. 1–14.
- Рацупкин И.М., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Влияние растворимых факторов макрофагов M2-фенотипа на дифференцировку клеток линии SH-SY5Y. *Медицинская иммунология*. 2021. Т. 23, № 4. С. 677–684.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ КОМПОЗИТА ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА С ЧАСТИЦАМИ МАГНЕТИТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

**Д.Ю. Травникова¹, Д.В. Чеснокова¹, А.А. Дудун², Е.А. Акулина¹,
И.И. Жаркова¹, Ю.Р. Мухортова³, А.С. Прядко³, Р.А. Сурменев³,
М.А. Сурменева³, А.П. Бонарцев¹**

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, г. Москва, Россия¹

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха, г. Москва, Россия²

Томский политехнический университет, г. Томск, Россия³

Аннотация

Поли-3-оксибутират (ПОБ) представляет собой биосовместимый полимер микробиологического происхождения. Физико-химические характеристики ПОБ, а также отсутствие токсичных продуктов при биодеградации делают его перспективным материалом для тканевой инженерии [1]. Недавние исследования показали, что ПОБ обладает еще и пьезоэлектрическими свойствами [2]. Для управления пьезооткликом полимера были выбраны частицы магнетита, которые в полимерной матрице будут обеспечивать отклик материала при помещении его в магнитное поле. Поскольку электрические сигналы оказывают существенное влияние на рост и дифференцировку клеток [3], мы предполагаем, что композиты ПОБ с магнитными наночастицами будут служить эффективным материалом для регенеративной медицины. В данной работе были получены композитные пленки на основе ПОБ с добавлением магнетитов разного размера и состава. Биосовместимость полученных материалов была оценена с помощью культивирования на них мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Также была изучена цитотоксичность наночастиц чистых магнетитов на культуре клеток. На основе полученных данных были отобраны образцы с наилучшими характеристиками и с этими частицами изготовлены композитные скаффолды методом электроспиннинга. Полученные скаффолды имитируют сложную структуру межклеточного матрикса и показали себя как более эффективные подложки для прикрепления и роста клеток. В дальнейшем, электроформованные композитные скаффолды имплантировали подкожно крысам для оценки тканевой реакции *in vivo* на их имплантацию. Композитные скаффолды оказывали слабо умеренное асептическое воспаление на начальных сроках, но проходящее на более поздних сроках. Таким образом, композиты ПОБ с магнитными наночастицами могут рассматриваться в качестве потенциального материала для тканевой инженерии. В дальнейшем планируются эксперименты в магнитном поле для индукции пьезоэффекта в скаффолдах и изучения его влияния на дифференцировку МСК. Поскольку композитные скаффолды могут быть использованы для создания кондуктов для регенерации нервов, планируется также оценить эффективность полученных материалов в качестве подложки для нейрореподобных клеточных линий.

Ключевые слова: Поли-3-оксибутират, биополимер, частицы магнетита, мезенхимальные стволовые клетки, композитный материал, регенерация тканей.

STUDY OF POLY-3(HYDROXYBUTYRATE) COMPOSITES WITH MAGNETITE PARTICLES AS A PROSPECTIVE MATERIAL FOR TISSUE ENGINEERING

D.Yu. Travnikova¹, D.V. Chesnokova¹, A.A. Dudun², E.A. Akulina¹, I.I. Zharkova¹, Yu.R. Mukhortova³, A.S. Pryadko³, R.A. Surmenev³, M.A. Surmeneva³, A.P. Bonartsev¹

Lomonosov Moscow State University M. V. Lomonosov, Faculty of Biology, Moscow, Russia¹
 Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia²
 Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia³

Annotation

Poly-3(hydroxybutyrate) (PHB) is a biocompatible material of microbiological origin. The physicochemical properties of PHB, as well as the absence of toxic products during bioresorption, make it a promising material for tissue engineering [1]. Recent studies demonstrate that PHB also reveals piezoelectric properties [2]. To control the piezoresponse of the polymer, magnetite particles were selected. Their mixture with the polymer provides a piezoelectric response when placed in a magnetic field. Since electrical signals considerably impact cell growth and differentiation [3], we assume that PHB composites with magnetite particles will be an effective material for a variety of regenerative medicine applications. In this work, we obtained PHB composite films with magnetite particles of different sizes and compositions. The biocompatibility of the obtained materials was evaluated by culturing mesenchymal stem cells (MSCs) on their surface. Also, we studied the cytotoxicity of magnetite particles alone. Based on the obtained data, we selected the best samples of particles. We made composite polymer scaffolds with these particles using the electrospinning technique. The resulting scaffolds mimic the complex structure of the intercellular matrix and have shown themselves to be more effective substrates for cell attachment and growth. Subsequently, composite scaffolds were implanted subcutaneously in rats to assess the level of biocompatibility of the new material and inflammation of adjacent tissues. In the *in vivo* study, composite scaffolds had mild to moderate aseptic inflammation at the initial stages, but this response subsided later. Thus, PHB composites with magnetite particles can be

considered a potential tissue engineering material. In the future, experiments in a magnetic field are planned. We will stimulate a piezoelectric effect in scaffolds and reveal its effect on the differentiation of MSCs. Since composite scaffolds can be used to prepare nerve conduits, it is also planned to evaluate the effectiveness of the obtained materials as a substrate for neuro-like cell lines.

Key words: Poly-3(hydroxybutyrate), biopolymer, magnetite particles, mesenchymal stem cells, composite material, tissue regeneration.

Актуальность. Для правильной регенерации крупных дефектов кости и нервов требуется специальная подложка, направляющая рост новой ткани и служащая опорой для клеток. Мы создали композитный материал, который за счет биосовместимости и пьезоэлектрических свойств будет стимулировать рост и дифференцировку клеток. Использование такого материала в качестве медицинских изделий позволит ускорить процессы заживления в тканях.

Цель исследования – оценка возможности использования композита ПОБ/ Fe_3O_4 в качестве потенциального материала для тканевой инженерии.

Материал и методы

Приготовление композитных пленок. В работе использовались непористые пленки из ПОБ с добавлением магнетитов различного состава. Частицы магнетита (ЧМ) были предоставлены коллегами из Томского политехнического университета (ТПУ). Ключевым компонентом магнетитов являлся Fe_3O_4 , поверхность которого модифицирована лимонной кислотой, в состав некоторых образцов также входил магнетит, модифицированный восстановленным оксидом графена (rGO). Характеристики использованных в работе наночастиц представлены в таблице.

Таблица

Основные характеристики частиц магнетита

Обозначение ЧМ	Состав	Атмосфера синтеза	Лимонная кислота	Соотношение $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$	Размер, нм
M0	Fe_3O_4	Воздух	–	–	74±9
M1	Fe_3O_4	Аргон	+	–	49±9
M3	Fe_3O_4	Воздух	–	–	200–400
M7	Fe_3O_4	Азот	–	–	46±9
M8	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$	Аргон	+	6:1	46±9
M11	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$	Азот	–	6:1	61±9

Пленки из ПОБ ($\rho = 6\%$ (m/w)), были изготовлены методом осаждения раствора полимера в трихлорметане на поверхности стеклянной чашки Петри. Предварительно в раствор был добавлен один из 6 образцов магнетита в одной из 3 концентраций (0,02; 0,05; 0,1 мг/мл). После испарения хлороформа полученные матрицы нарезали по размерам лунки 96-луночного планшета, стерилизовали в 96 % спирте в течение суток и трижды промывали стерильным PBS в течение двух часов перед посадкой клеток.

Исследование цитотоксичности магнетитов на МСК. Для определения цитотоксичности магнетитов были сделаны растворы каждого образца магнетитов в ростовой среде в различной концентрации (0,01; 0,05 и 0,02 мг/мл). МСК из расчета 2000 клеток на лунку были посажены в 96-луночный планшет, через сутки среды в лунках была заменена на растворы магнетитов. Была проведена оценка жизнеспособности клеток стандартным методом МТТ на 1-е и 3-е сут инкубации в присутствии магнетитов. Спектрофотометрический анализ производили при длине волны 595 нм. Длина волны 620 нм использовалась как референс.

Исследование роста МСК на композитных пленках. Оценку роста МСК на композитных пленках проводили с помощью стандартного ХТТ-теста. Клетки сеяли на поверхность пленок и культивировали в течение 7 дней на поверхности композитных пленок и скаффолдов в плоском 96-луночном планшете ($n=4$). Оценку роста клеток проводили на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут. Спектрофотометрический анализ производили при длине волны 450 нм. Длина волны 620 нм использовалась как референс.

Подкожная имплантация скаффолдов. Композитные скаффолды ПОБ/M1, ПОБ/M3 и ПОБ/M7 ($\rho(\text{Fe}_3\text{O}_4) = 8\%$ от массы полимера), используемые для подкожной имплантации, были изготовлены методом электроспиннинга коллегами из ТПУ и предоставлены нам для дальнейшей работы. Стерилизованные скаффолды на основе ПОБ и магнетитов за сутки перед

операцией помещали в ростовую среду DMEM для увлажнения образцов и минимизации возможных механических повреждений при непосредственной подкожной имплантации. Все работы выполнены в соответствии с этическими нормами, предусмотренными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных. Для имплантации в брюшную область образцов было проведено рассечение кожи строго по белой линии живота. Далее была проведена сепарация кожи от брюшной стенки при помощи медицинского шпателя с целью дальнейшего внедрения образцов площадью 8x8 мм². После имплантирования образцов кожный надрез закрывали поперечными стяжками частотой в 1 см. По окончании временных сроков животных выводили из эксперимента для изъятия образцов скаффолдов и их анализа. Также был произведен забор тканей образованных на месте имплантированных образцов для гистологической оценки.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета GraphPad Prizm 8.0.1. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ (Two-way ANOVA). Сравнение между группами проводилось с помощью теста Даннетта, различия считали значимыми при $p < 0,05$. На рис. 1, 2 данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ($M \pm SD$), в подписях к рисункам указано число измерений (n). Объем выборки в экспериментах *in vivo* на каждый исследуемый образец равнялся четырем.

Результаты

В ходе исследований было выяснено, что магнетиты в целом не оказывают цитотоксический эффект на МСК. Однако при наибольшей из используемых концентраций (0,1 мг/мл) образцы М7 (Fe₃O₄, 46 нм) и М11 (Fe₃O₄/rGO, 61 нм) показали цитотоксичность более 50 и 30 % на третьи сутки соответственно. Тем не менее при более низких концентрациях такой цитотоксичности у данных образцов не наблюдается. В остальных случаях количество жизнеспособных клеток даже при высоких концентрациях не падает ниже 80 % ни на первые сутки инкубации, ни на третьи (см. рис. 1).

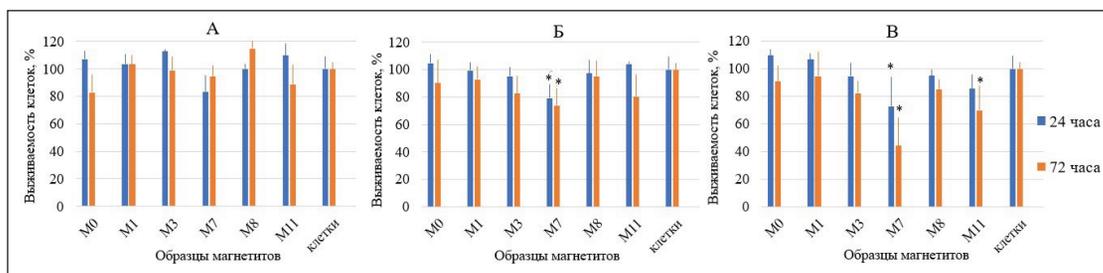


Рис. 1. Относительная выживаемость клеток при росте в присутствии магнетитов различной концентрации: А – 0,01 мг/мл, Б – 0,03 мг/мл, В – 0,1 мг/мл (* $p < 0,05$ обозначены значения, отличающиеся от контроля “клетки”), n=4

В эксперименте по росту МСК на композитных пленках лучший результат показан для пленки ПОБ/М8 (Fe₃O₄/rGO, 47 нм), которая предположительно имеет большую биосовместимость за счет дополнительного покрытия частиц лимонной кислотой и наличия в составе восстановленного оксида графена (см. рис. 2).

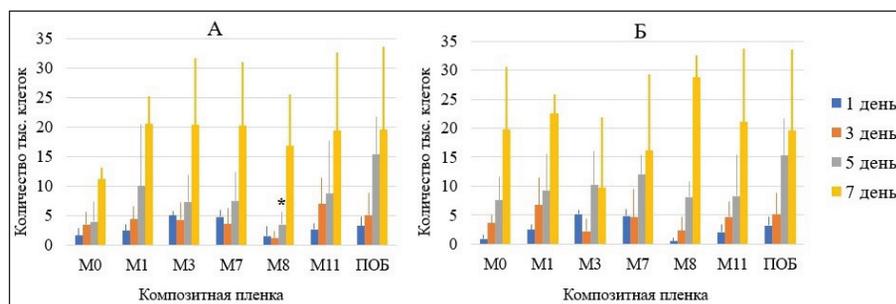


Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток при росте на пленках с различными концентрациями магнетитов: А – 0,02 мг/мл, Б – 0,05 мг/мл (* $p < 0,05$ обозначены значения, отличающиеся от контроля “ПОБ”), n=4

В результате серий операций было показано, что образцы скаффолдов тканью крыс не отвергаются. На 7-е сут, все образцы характеризовались общей картиной умеренного асептического воспаления с образованием плотной соединительнотканной капсулы и слабым

отеком мягких тканей. На 14-е сут результаты различны у всех образцов: для контрольного образца ПОБ отек пропадает с сохранением капсулы; для скаффолда М1 отек вокруг импланта исчезает и идет активный процесс васкуляризации на месте плотной капсулы. Скаффолд М3, как и на 7-е сут, продолжает показывать хронический асептический воспалительный процесс вокруг капсулы с выраженным отеком, обильной экссудацией. На месте имплантации М7 стенки соединительнотканной капсулы уменьшаются, также можно заметить рост фиброзной ткани в области подкожной имплантации. Вскрытие последней группы животных на 30-е сут показало одинаковую картину для всех имплантированных образцов. Асептический воспалительный процесс и отеки не наблюдались.

Заключение

Изучение свойств магнитных наночастиц и их взаимодействия с МСК в чистом виде или заключенными в полимерный матрикс позволяет отобрать лучшие образцы для дальнейших исследований. В ходе работы было показано, что композиты ПОБ и магнитных наночастиц являются биосовместимым материалом. Таким образом, композиты ПОБ с магнитными наночастицами могут рассматриваться в качестве потенциального материала для тканевой инженерии. В дальнейшем планируются эксперименты с постоянным и переменным магнитным полем для создания пьезоэффекта в скаффолдах и изучения его влияния на рост нейтроподобных клеток и дифференцировку МСК.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 20-64-47008). В работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М.В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang J., Shishatskaya E.I., Chen G.-Q., Volova T.G., da Silva L.F. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications // Materials Science and Engineering. 2018. Vol. 86, P. 144–150.
2. Chernozem R.V., Surmeneva M.A., Surmenev R.A. Hybrid biodegradable scaffolds of piezoelectric polyhydroxybutyrate and conductive polyaniline: Piezocharge constants and electric potential study // Materials Letters. 2018. Vol. 220, P. 257–260.
3. Кулиев А.М. Концепция внутренних напряжений опорных структур и репаративный остеогенез:(обзор литературы) // Ортопедия и травматология Азербайджана. 2010. Т. 2. С. 76–79.

СОДЕРЖАНИЕ

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА И ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

Бабовская А.А., Трифонова Е.А., Сереброва В.Н., Сваровская М.Г., Зарубин А.А., Рычкова Л.В., Степанов В.А. Идентификация популяционно-специфичных маркеров преэклампсии с помощью полнотранскриптомного профилирования децидуальных клеток плаценты	6
Бочуров А.А., Павлова Н.И., Алексеев В.А., Дьяконова А.Т., Додохов В.В., Куртанов Х.А. Ассоциация полиморфизма 1438G/A гена <i>HTR2A</i> с никотиновой зависимостью	9
Гавриленко М.М., Бабовская А.А., Зарубин, Е.А. Трифонова А.А., Степанов В.А. Профиль событий альтернативного сплайсинга в децидуальных клетках плаценты при физиологической беременности	12
Давыдова Ю.Д., Еникеева Р.Ф., Казанцева А.В. Роль полиморфных локусов генов <i>TERT</i> , <i>TERC</i> и <i>STN1</i> в развитии депрессивного поведения	15
Деменова В.В., Толмачева Е.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Юрьев С.Ю., Махмутходжаев А.Ш., Зуев А.С., Филатова С.А., Дмитриев А.Е., Даркова Я.Ю., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Оценка уровня экспрессии генов <i>NUP153</i> и <i>YWHAB</i> с канонических и альтернативных промоторов LINE-1 в плаценте первого триместра беременности	18
Дроздов Г.В., Кашеварова А.А., Никитина Т.В., Толмачева Е.Н., Саженова Е.А., Фонова Е.А., Лебедев И.Н. Структура CNV при привычном и спорадическом невынашивании беременности	21
Еникеева Р.Ф., Казанцева А.В., Давыдова Ю.Д., Мустафин Р.Н., Тахирова З.Р., Лобаскова М.М., Абушахмина А.Г., Федореева К.С., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. Роль генов <i>IL1A</i> и <i>IL1B</i> в формировании индивидуальных различий в объеме рабочей памяти	24
Жалсанова И.Ж., Бабушкина Н.П., Колоколова О.В., Брагина Е.Ю. Особенности ассоциации генов <i>TNF</i> и <i>CXCL10</i> в зависимости от клинического полиморфизма туберкулеза легких	27
Жигалина Д.И., Канбекова О.Р., Шитов В.А., Зарубин А.А., Сивцев А.А., Денисов Е.В., Геращенко Т.С., Меньяло М.Е., Скрябин Н.А. Транскриптомный анализ единичных клеток бластоцист человека	30
Зарубин А.А., Дягель А.Р., Назаренко М.С. Влияние микроРНК на межклеточные взаимодействия эндотелиальных клеток в атеросклеротических бляшках	33
Ижойкина Е.В., Гавриленко М.М., Трифонова Е.А., Жиликова О.В., Куценко И.Г., Степанов В.А. Ассоциации полиморфных маркеров плацентарных генов с преэклампсией и вариабельностью показателей коагуляционного гемостаза и гемодинамики	36
Исубакова Д.С., Цымбал О.С., Усова Т.В., Цыпленкова М.Ю. Связь метилирования ДНК с частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови работников предприятия атомной отрасли, подвергавшихся внешнему радиационному воздействию	39
Киреева Т.Н., Жигалина Д.И., Шитов В.А., Сивцев А.А., Скрябин Н.А. Дифференциальная экспрессия генов в эмбрионидных тельцах, полученных из ИПСК от здорового индивида и пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова	43
Королёва Ю.А., Зарубин А.А., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования гена <i>MIR127</i> при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования	46
Малинчик М.А., Смольникова М.В. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей г. Красноярска	50
Орлов Д.С., Назаренко Л.П. Роль ПЦР-ПДРФ анализа в селективном скрининге болезни Вильсона-Коновалова	53
Павлова Н.И., Бочуров А.А., Алексеев В.А., Дьяконова А.Т., Додохов В.В., Куртанов Х.А. Полиморфизм <i>rs17713054</i> в популяции якутов, ассоциированного с COVID-19	55
Постригань А.Е., Жалсанова И.Ж., Свинцова Л.И., Сивцев А.А., Зарубин, Скрябин Н.А. Клинико-генетическая характеристика семейных случаев синдрома удлиненного интервала QT в Сибирском регионе	59
Савченко Р.Р., Мурашкина А.А., Фишман В.С., Сухих Е.С., Вертинский А.В., Сухих Л.Г., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Радиационно-индуцированный профиль экспрессии генов на фоне дифференциальной экспрессии <i>ADAMTS1</i> в клеточной линии HeLa	63

Сивцев А.А., Скрябин Н.А. Связанная с клеточной поверхностью внеклеточная ДНК как потенциальный материал для неинвазивного пренатального тестирования	66
Синицкий М.Ю., Синицкая А.В., Шишкова, Понасенко А.В. Генотоксический стресс вызывает формирование эндотелиальными клетками провоспалительного фенотипа: исследование <i>in vitro</i>	69
Смирнова К.В., Бердюгина Д.А. Эффекты модуляторов SIRT1 на поведение мышей C57BL/6 и Disc1-Q31L-/- при хроническом непредсказуемом мягком стрессе	72
Степанчук Я.К., Гридина М.М., Валеев Э.С., Сайфитдинова А.Ф., Шилова Н.В., Лебедев И.Н., Фишман В.С. Применение технологии Hi-C для поиска сбалансированных транслокаций в единичных клетках человека	75
Субботина К.В. Исследование эффективности применения молекулярно-генетических методов для диагностики саркомы Юинга	78
Усенко Т.С., Безрукова А.И., Башарова К.С., Николаев М.А., Изюмченко А.Д., Богданова Д.А., Гаврилова Е.Г., Шлык И.В., Полушин Ю.С., Сломинский П.А., Пчелина С.Н. Роль обмена холестерина в тяжести течения COVID-19	81
Федотов Д.А., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Васильева О.Ю., Беляева Е.О., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Плейотропный эффект CNV при нарушениях психомоторного развития и невынашивании беременности	84
Фонова Е.А., Толмачева Е.Н., Кашеварова А.А., Лопаткина М.Е., Сивакова А.А., Лебедев И.Н. Статус инактивации X-хромосомы в семьях с детьми с умственной отсталостью и аутосомными CNV	87
Чижова Н.Д. Исследование влияния блокатора STEP (TC-2051) на проявления шизофреноподобного поведения у мышей линии Disc1-L100P	90
Ялаев Б.И. Анализ динамики уровня минеральной плотности костной ткани и витамина Д в зависимости от полиморфных вариантов генов чувствительности к антирезорбтивной терапии	94

КАРДИОЛОГИЯ

Богданов Л.А., Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Новый подход к изучению цельных тканей сердечно-сосудистой системы в высоком разрешении методом сканирующей электронной микроскопии	99
Деркачев И.А. Роль каннабиноидных и V2-брадикининовых рецепторов в регуляции повышенной толерантности сердца к ишемии/реперфузии при адаптации к хронической непрерывной гипоксии	104
Дудченко О.В. Использование этилметилгидроксипиридина сукцината и милдроната в терапии хронической сердечной недостаточности ишемического генеза	106
Зубрицкий К.С. Желудочковые нарушения ритма при сахарном диабете 2-го типа	109
Колоцей Л.В. Электрокардиографические предикторы желудочковой тахикардии типа «Пируэт» у пациентов с лекарственно-индуцированным удлинением интервала QT	111
Коровина И.О., Горбатенко Е.А., Гультяева Е.П., Гаранина В.Д., Осокина Н.А., Мигачева А.В., Ярославская Е.И. Клинические характеристики пациентов, перенесших доказанную пневмонию Covid-19, через 3 месяца после выписки из стационара	115
Мигачева А.В., Криночкин Д.В., Широков Н.Е., Горбатенко Е.А., Гультяева Е.П., Коровина И.О., Гаранина В.Д., Осокина Н.А., Ярославская Е.И. Клинические и эхокардиографические показатели пациентов, перенесших доказанную пневмонию Covid-19, после выписки из стационара (первые результаты годовичного наблюдения)	118
Миминошвили В.Р. Гендерные различия морфофункционального состояния сердца у больных сахарным диабетом 2-го типа	120
Паламарчук Ю.С. Влияние комбинированной гипогликемической терапии на кардиоренальные показатели при синдроме сахарного диабета 2-го типа и гипотиреозе	124
Присяжнюк М.В. Тироидная дисфункция у больных первичной подагрой с кардиальными проявлениями гипотиреоза	127
Рюмишина Н.И., Гусакова А.М., Фальковская А.Ю. Ассоциации объема паренхимы почек по данным магнитно-резонансной томографии с биохимическими показателями их дисфункции при резистентной артериальной гипертензии	130
Салихов Б.Р., Аляви А.Л. Оценка диастолической функции левого желудочка у военнослужащих с артериальной гипертензией и с ожирением I степени	133
Халаимова О.А., Кудлаева К.С., Камышникова Л.А., Бондарева Д.В. Гендерные особенности жалоб при гипотензии у молодых	135

ОНКОЛОГИЯ

Бахронов И.А., Какурина Г.В., Сиденко Е.А. Связь актин-связывающих белков с рецидивированием плоскоклеточного рака головы и шеи 139

Бельская Л.В. Метаболические особенности слюны при разных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы 142

Бушмина Е.А., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Черепенников Ю.М., Стучебров С.Г. Формирование распределения поглощенной дозы медицинского электронного пучка с помощью модульного коллиматора 145

Гаджиева Э.Х., Гелиашвили Т.М., Валиев А.К., Романов И.С., Харатишвили Т.К., Сальков А.Г., Пронин А.И., Кононец П.В. Комбинированное лечение одиночного метастаза в грудине папиллярной микрокарциномы щитовидной железы: клинический случай 148

Галиев И.З., Зинченко С.В. Способ интраоперационной идентификации гиперплазии и опухолей паращитовидных желез у пациентов с первичным, вторичным и третичным гиперпаратиреозом 152

Гаптулбарова К.А., Здерева Е.А., Цыденова И.А., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К. Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии: связь с гематогенным метастазированием 156

Долгашева Д.С., Здерева Е.А., Цыденова И.А., Гаптулбарова К.А., Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Влияние химических ингибиторов генов стволовости на способность дифференцированных клеток линий рака молочной железы к индукции дедифференцировки до стволовых клеток с образованием маммосфер 158

Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Чердынцева Н.В. Прогностическая оценка экспрессионного профиля рецепторных протеинкиназ и циклина D1 у больных эстроген-позитивным раком молочной железы 162

Ермакова А.С., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Стучебров С.Г. Дозиметрические исследования полимерных изделий, изготовленных с помощью технологий трехмерной печати 164

Здерева Е.А., Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Шпилева О.В., Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Литвяков Н.В. Вирус папилломы человека при раке шейки матки *in situ* 168

Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии: связь с гематогенным метастазированием 170

Касатова А.И., Таскаев С.Ю. Эффективность бор-нейтронозахватной терапии в отношении колоректальной аденокарциномы человека: экспериментальное исследование на мышинной модели 173

Каюкова Е.В., Ашрафян Л.Е., Белокриницкая Т.Е., Мудров В.А. Диагностический потенциал высших жирных кислот в выявлении онкологической патологии шейки матки 177

Кельн А.А. Возможность хирургического лечения пациентов с раком предстательной железы высокого риска прогрессирования 179

Кнеев А.Ю., Школьник М.И., Богомоллов О.А., Жаринов Г.М. Значение плотности простат-специфического антигена в прогнозировании риска биохимического рецидива у больных локализованным раком предстательной железы, перенёсших радикальную простатэктомию 181

Ковалева И.В., Спирина Л.В., Чижевская С.Ю. Особенности экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути и белка LC3B при папиллярном раке щитовидной железы 184

Колегова Е.С., Кононова Л.А., Федорова И.К., Жалсанова И.Ж., Сивцев А.А., Скрябин Н.А., Денисов Е.В. Особенности микробиома рака полости рта у молодых пациентов 187

Краснюк В.В., Иванова П.И., Бутовская Д.А., Ставицкая К.О., Гончаров Р.А. Актуальные вопросы при проведении этапной радиохирургии и стереотаксической лучевой терапии в режиме гиподифракционирования метастазов в головном мозге 189

Кротова К.А., Жингель А.С., Назарко О.С., Сидоров С.В., Шевченко С.П. Эффективность цитологического исследования в диагностике злокачественных новообразований кожи 193

Куйвалайнен В.А., Зубкова Ю.А., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Стучебров С.Г. Концепция создания дозиметрического фантома для доклинических испытаний .. 194

Лоос Д.М., Дурова А.А., Письменный Д.С., Крахмаль Н.В. Возможность прогнозирования течения немелкоклеточного рака легкого с учетом феномена STAS и состояния бронхиального эпителия вне опухоли 198

Маркович В.А., Тузиков С.А., Родионов Е.О., Попова Н.О., Цыганов М.М., Миллер С.В., Подолько Д.В., Цыденова И.А., Ибрагимова М.К. Рак желудка IV стадии (с карциноматозом брюшины). Результаты персонализированного комбинированного лечения 200

Мох А.А., Родионов Е.О., Миллер С.В., Тузиков С.А., Подолько Д.В., Полищу Т.В. Важность морфологической верификации очаговых образований в легких	203
Палкина Н.В., Рукша Т.Г. МикроРНК с измененной экспрессией при меланоме – регуляторы опухолевой прогрессии злокачественных меланоцитов	207
Петухов К.А., Зинченко С.В. Интраоперационная нейропротекция у пациентов с тракционными повреждениями возвратных гортанных нервов при операциях на органах шеи	210
Простакишина Е.А., Ямщиков П.С., Фролова А.А., Ракина М.А., Патышева М.Р., Ларионова И.В. Особенности экспрессии CD163 на моноцитах крови и макрофагах опухоли при раке молочной железы	212
Сафин Д.И., Зинченко С.В. Характеристика пациентов с медуллярным раком щитовидной железы в Республике Татарстан	215
Семенов А.В., Лепилина О.Г., Гулидов И.А., Борышева Н.Б., Гордон К.Б., Гевондян Д.А., Бурьян П.К. Сравнительный анализ результатов планирования IMRT/VMAT для пациентов с орофарингеальным раком. Собственный опыт МРНЦ им. А.Ф. Цыба	218
Сиденко Е.А., Кондакова И.В., Черемисина О.В. Роль внутриклеточного пула протеасом в развитии рака гортани	222
Ситников П.К., Анисеня И.И., Богоутдинова А.В., Хакимов Х.И., Зельчан Р.В., Табакаев С.А., Пахмурин Д.О., Пахмурина В.В. Радикальная интраоперационная гипертермия в лечении опухолей костей	225
Слукинова О.С., Алентов И.И., Поляк М.А. Системная воспалительная реакция у больных раком молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии	227
Соловьев В.Ю., Жеравин А.А. Первый опыт использования инновационного костно-замещающего материала в лечении опухолей костей	231
Сорокина А.А., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Стучебров С.Г. Оценка эффективности поглощения терапевтического гамма-излучения болусом, изготовленным на 3D-принтере	234
Табакаев С.А., Фролова И.Г., Ситников П.К., Богоутдинова А.В., Васильев Н.В., Анисеня И.И., Хакимов Х.И., Митриченко Д.А. КТ-денситометрия в оценке ответа гигантоклеточной опухоли кости на лечение деносумабом	237
Трофимова С.В., Лисаченко Л.К. Влияние излучения плазмы искрового разряда на уровень эндогенной интоксикации интактных животных и животных с альвеолярным раком печени	240
Тураханов У.З., Тарасова А.С., Добродеев А.Ю., Костромицкий Д.Н. Сравнительный анализ непосредственной эффективности и переносимости предоперационной химиотерапии при раке верхнеампулярного отдела прямой кишки	243
Фролова А.А., Нехорошее В.О. Избирательное действие низкотемпературных плазменных струй на опухолевые и нормальные клетки	245
Хакимов Х.И., Анисеня И.И., Богоутдинова А.В., Ситников П.К., Топольницкий Е.Б., Табакаев С.А. Онкологические и функциональные результаты при реконструкции каркаса грудной стенки	248
Цхай В.О., Коломиец Л.А., Стахеева М.Н., Сисакян В.Г., Чернорубашкина Н.М., Журман В.Н., Гречкина А.А. Иммуно-таргетная терапия прогрессирующего рака эндометрия	250
Цыденова И.А., Маркович В.А., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Тузиков С.А., Литвяков Н.В. Экспрессионная гетерогенность генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности в опухоли желудка, канцероматозе и метастазах в лимфатические узлы	253
Чернова О.С., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Стучебров С.Г. Моделирование взаимодействия протонного пучка с тканезквивалентными материалами	256
Чуркина М.И., Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И. Метилирование р53-зависимых генов микроРНК MIR-129-2, MIR-203, MIR-34A и MIR-34B/C при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме	259
Шакенова А.С., Жумбаева А.Н. Аллогенные трансплантации от неродственных доноров в Республике Казахстан	262
Шарыпова А.Е., Булавская А.А., Григорьева А.А., Милойчикова И.А., Черепенников Ю.М., Стучебров С.Г. Концепция метода измерения поперечного распределения медицинских пучков ионизирующего излучения	265
Шмидт С.С., Кельн А.А. Вероятность до- и послеоперационного расхождения степени дифференцировки рака предстательной железы	268
Шумейкина А.О., Самойлова Е.А., Вазилев К.В., Красильников С.Э., Пасман Н.М. Анализ результатов первичного лечения больных с рецидивами рака шейки матки	270

ПСИХИАТРИЯ И НАРКОЛОГИЯ

Абдрахманова А.Е., Ефремов И.С. Зависимость от социальных сетей и личностная тревожность 274

Бадалов А.А., Байышев Э.Б. Особенности анализа спектральной мощности ЭЭГ ритмов у лиц с комбинированной формой психопатологического диатеза (расстройство интеграции идентичности) 276

Вялова Н.М., Михалицкая Е.В. Исследование связи полиморфных вариантов генов нейротрофической системы с наличием типичных или атипичных депрессивных симптомов 280

Галкин С.А., Савочкина Д.Н. Уровень тревоги и показатели ЭЭГ при алкогольной зависимости: возможность прогнозирования длительности терапевтической ремиссии 282

Герасимова В.И. Адаптационные возможности больных шизофренией в зависимости от уровня безнадежности 285

Гончарова А.А., Герасимова В.И., Тигунцев В.В., Зарубин А.А. Алгоритм поддержки принятия врачебных решений выбора антипсихотической терапии, имеющей низкую вероятность развития акатизии 288

Епимахова Е.В., Казанцева Д.В., Васильева А.Р. Влияние IgG больных шизофренией на показатели апоптоза на модели клеточной культуры SHSY5Y 291

Ермаков Е.А., Кузницына А.А., Камаева Д.А. Гидролиз рекомбинантных фрагментов субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора под действием антител больных шизофренией и рассеянным склерозом 294

Камаева Д.А., Казанцева Д.В., Васильева А.Р. ОБМ-гидролизующая активность сывороточных антител при аффективных расстройствах 297

Касьянов Е.Д. Отягощенный семейный анамнез как фактор риска развития аффективных расстройств 299

Кулабухова Д.Г., Емельянов А.К., Усенко Т.С., Николаев М.А., Сенкевич К.А., Копытова А.Э., Лавринова А.О., Андоскин П.А., Тюрин А.А., Милюхина И.В., Пчелина С.Н. Повышенный уровень альфа-синуклеина CD45+ мононуклеаров крови у пациентов с болезнью Паркинсона 302

Лосенков И.С., Плотников Е.В., Епимахова Е.В. Цитопротекторный и антиоксидантный эффекты органических солей лития в отношении мононуклеаров периферической крови больных биполярным аффективным расстройством 305

Меднова И.А., Герасимова В.И., Гончарова А.А. Оценка уровня белка S-100B у больных шизофренией с суицидальным риском 309

Меламуд М.М., Ермаков Е.А., Бойко А.С., Камаева Д.А. Концентрация цитокинов и их взаимосвязь с клиническими проявлениями у больных шизофренией 311

Мындускин И.В., Голыгина С.Е., Сахаров А.В. Изменение показателей нейровоспаления в крови у пациентов с первым эпизодом шизофрении при терапии антипсихотиками 315

Падерина Д.З., Пожидаев И.В., Бойко А.С. Роль полиморфных вариантов гена дофаминового D2-рецептора в развитии метаболического синдрома у больных шизофренией 318

Пятойкина А.С. Редокс-дисбаланс у пациентов с шизофренией, его ассоциация с клинико-психопатологическими особенностями 321

Рыбина А.С., Бурделова Е.В., Иващенко Л.В. Оценка распространенности дезадаптации и агрессии в студенческой среде 325

Серегин А.А., Камаева Д.А. Количественная оценка миелинизации головного мозга больных шизофренией с помощью метода картирования молекулярной протонной фракции 328

Тигунцев В.В., Гончарова А.А., Герасимова В.И., Пожидаев И.В., Падерина Д.З., Полтавская Е.Г. Исследование ассоциации *GRIN2B* rs1805502 с ведущей клинической симптоматикой шизофрении 331

Шапошникова Ю.В., Косогова А.И. Расстройства пищевого поведения и несуйцидальные самоповреждения у подростков 334

Шумилова С.Н. Морфометрическая характеристика сосудов микроциркуляторного русла и нейробластов головного мозга человека, развивавшегося в условиях внутриутробной алкоголизации 335

ФАРМАКОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Бабилов В.Ю., Усов, Удут В.В. Количественное определение тканевого кровотока миокарда методом ОФЭКТ, по данным оценки накопления химических микросфер радиофармпрепарата ^{99m}Tc-Технетрил 340

Ванюшенкова А.А., Белов А.А. Изучение механизма действия ранозаживляющих перевязочных материалов с пролонгированным лечебным действием на основе диальдегидцеллюлозы	344
Вербицкая А.К., Антосюк О.Н., Шарова Е.А. Экстракт семян <i>Shlybum taribnum</i> L. как протектор при воздействии противоопухолевых препаратов эпопозид и метотрексат на примере модельного объекта <i>Drosophila melanogaster</i>	347
Дорошенко О.С., Гостюхина А.А., Прокопова А.В. Применение мексидола для коррекции изического переутомления в осенний период года	350
Мешкова Ю.В., Борисов, Саломатина О.В., Сорокина И.В., Жукова Н.А., Толстикова Т.Г. Влияние новых оксадиазольных производных дезоксихолевоы кислоты на структуру предстательной железы крыс в модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы	352
Озерская А.В., Белугин К.В. Разработка и оценка фармакологической активности радиофармпрепаратов на основе аптамеров	355
Смолянкин Д.А., Рафикова Л.А., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю., Байгильдин С.С., Зиатдинова М.М., Фазлыева А.С., Репина Э.Ф. Оценка нефротоксичности гидроксида алюминия, основного компонента минерально-солевых адьювантов, в подостром эксперименте на лабораторных животных	357
Соколова Л.А., Киселева Е.А., Андреева В.Ю. Влияние экстракта донника лекарственного (<i>Melilotus officinalis</i>) на развитие реакции острого стресса у мышей	361
Филонова М.В., Федорова Е.П., Котловская Л.Ю., Чурип А.А. Влияние экстракта, содержащего фурукумарины, на гемостатический потенциал аутобредных мышей на фоне применения паклитаксела	363

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., Сеидкулиева А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Роль фактора, индуцируемого гипоксией, (HIF-1) в регуляции Р-гликопротеина при ингибировании синтеза глутатиона <i>in vitro</i>	367
Гостюхина А.А., Прокопова А.В., Дорошенко О.С. Уровень стресса у лабораторных крыс при длительном воздействии повышенных уровней общей вибрации и шума и при коррекции клетками костного мозга	369
Дзряян В.А., Питинова М.А. Перерезка седалищного нерва: изменения экспрессии и внутриклеточной локализации фактора транскрипции E2F1 в периферической нервной системе крыс после аксотомии	373
Максимова А.А., Ращупкин И.М., Тыринова Т.В. Баланс протеаз внеклеточного матрикса и их ингибиторов в культурах различных функциональных фенотипов макрофагов человека	377
Нуркина А.К., Оспанова М., Абдрахманова С.А. Применение лизата аутологичных тромбоцитов в программе лечения бесплодия на фоне «тонкого» эндометрия	380
Ращупкин И.М., Максимова А.А., Тыринова Т.В. Влияние растворимых факторов макрофагов человека на жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях, модулирующих ишемию/гипоксию <i>in vitro</i>	382
Травникова Д.Ю., Чеснокова Д.В., Дудун А.А., Акулина Е.А., Жаркова И.И., Мухортова Ю.Р., Прядко А.С., Сурменев Р.А., Сурменева М.А., Бонарцев А.П. Исследование биосовместимости композита поли-3-оксибутирата с частицами магнетита как потенциального материала для тканевой инженерии	385

Партнеры Конгресса:

Спонсоры



Некоммерческая организация
«Ассоциация
онкологических организаций
Сибири и Дальнего Востока»



ИнтерЛабСервис

634009 г. Томск, пер. Кооперативный, 5
тел. канцелярия: 8 (3822) 51-33-06
e-mail: center@tnimc.ru
www.tnimc.ru



ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК