

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

49 (6) • 2021

Оценка диагностической точности системы автоматического анализа цифровых рентгенограмм легких при выявлении округлых образований

Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости

Конечно-элементный анализ при моделировании структур сердца и аорты

Эффективность программируемых нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в геномных локусах safe harbor клеток линии HEK293

Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлуориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека

Критерии диагностики лимфопролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа

Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов

Визуальная и акустическая обратная связь по опорной реакции для нижних и верхних конечностей на примере пациентки после инсульта

ТЕМА НОМЕРА:

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Издается с 1998 г.
Периодичность – 8 выпусков в год
Учредитель – ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 49 • № 6 • 2021

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Глезер Мария Генриховна, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского университета (Москва, Россия)

Заместитель главного редактора

Какорина Екатерина Петровна, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по науке и международным связям (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Почетный член редколлегии: **Палеев Николай Романович**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Алексеев Сергей Алексеевич, д-р мед. наук, профессор (Хабаровск, Россия)

Базарный Владимир Викторович, д-р мед. наук, профессор (Екатеринбург, Россия)

Баркан Ариель, д-р мед. наук, профессор (Энн-Арбор, США)

Белоусова Елена Александровна, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Богачев-Прокофьев Александр Владимирович, д-р мед. наук (Новосибирск, Россия)

Брагин Анатолий Григорьевич, д-р биол. наук (Лос-Анджелес, США)

Бухфельдер Михаэль, д-р мед. наук, профессор (Эрланген, Германия)

Васюк Юрий Александрович, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Великанова Людмила Иосифовна, д-р биол. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Вольффенбюттель Брюс, д-р мед. наук, профессор (Гронинген, Нидерланды)

Годков Михаил Андреевич, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Голухова Елена Зеликовна, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Григорьев Евгений Валерьевич, д-р мед. наук, профессор, профессор РАН (Кемерово, Россия)

Гуляева Людмила Федоровна, д-р биол. наук, профессор (Новосибирск, Россия)

Густина Андреа, д-р мед. наук, президент Европейского общества эндокринологов (Милан, Италия)

Давыдов Михаил Михайлович, д-р мед. наук, чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Де Херт Стефан, д-р мед. наук, председатель научного комплекса Европейского общества анестезиологии (Гент, Бельгия)

Добрынина Лариса Анатольевна, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Драпкина Оксана Михайловна, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Зыбина Наталья Николаевна, д-р биол. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Научный редактор выпуска

Василенко Ирина Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, заведующая лабораторией биомедицинских методов исследований ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Ответственный редактор

Парпара Олеся Анатольевна (Москва, Россия)

Киров Михаил Юрьевич, д-р мед. наук, профессор (Архангельск, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Литвинов Рустем Игоревич, д-р мед. наук, профессор (Филадельфия, США)

Лобзин Юрий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)

Майр Йоханнес, д-р мед. наук, профессор (Базель, Швейцария)

Мельниченко Галина Афанасьевна, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Молочков Антон Владимирович, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Мурешану Дафин Ф., д-р мед. наук, профессор (Клуж-Напока, Румыния)

Наймарк Олег Борисович, д-р физ.-мат. наук, профессор (Пермь, Россия)

Нероев Владимир Владимирович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Овезов Алексей Мурадович, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Пономаренко Геннадий Николаевич, д-р мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Потекаев Николай Николаевич, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Райниш Уолтер, д-р мед. наук (Вена, Австрия)

Романко Юрий Сергеевич, д-р мед. наук (Москва, Россия)

Синицын Валентин Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Ситкин Станислав Игоревич, канд. мед. наук, д-р медицины Латвийской Республики (Санкт-Петербург, Россия)

Стилиди Иван Сократович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Шахова Наталия Михайловна, д-р мед. наук (Нижний Новгород, Россия)

Шишацкая Екатерина Игоревна, д-р биол. наук, канд. мед. наук, профессор РАН (Красноярск, Россия)

Ян Чи, д-р мед. наук, профессор (Шанхай, Китай)

Содержание

Оригинальные статьи

Гаврилов П.В., Смольникова У.А.

Оценка диагностической точности системы автоматического анализа цифровых рентгенограмм легких при выявлении округлых образований 359

Щербина С.А., Шутько А.В., Низамиева А.А., Никитина А.В., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И.

Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости 365

Смирнов А.А., Овсепьян А.Л., Квиндт П.А., Палеев Ф.Н., Борисова Е.В., Яковлев Е.В.

Конечно-элементный анализ при моделировании структур сердца и аорты 375

Павлова С.В., Елисафенко Е.А., Шаяхметова Л.Ш., Медведев С.П.

Эффективность программируемых нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в геномных локусах safe harbor клеток линии НЕК293 385

Лукбанова Е.А., Заикина Е.В., Саятин Ю.А., Гусаков Е.А., Филиппова С.Ю., Златник Е.Ю., Волкова А.В., Курбанова Л.З., Ходакова Д.В., Каймакчи Д.О., Лазутин Ю.Н., Шевченко А.Н., Пандова О.В.

Оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на подкожных ксенографтах культуры опухолевых клеток А-549 396

Федянина О.С., Чуксина Ю.Ю., Хмелевская А.Н., Хвастунова А.Н., Матвеев Ю.Н., Катаева Е.В., Филатов А.В., Кузнецова С.А.

Критерии диагностики лимфопролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа 405

Сустретов А.С., Богош В.В., Гусева О.С., Ильясов П.В., Лимарева Л.В.

Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлуориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека 412

Иевлев Е.Н., Казакова И.А., Сухенко Е.П.

Структурно-функциональные нарушения функций клеточных мембран при терминальной стадии хронической болезни почек 419

Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П., Гудкова О.Е., Сергунова В.А.

Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов 427

Клинические наблюдения

Исакова Е.В., Егорова Ю.В.

Визуальная и акустическая обратная связь по опорной реакции для нижних и верхних конечностей на примере пациентки после инсульта 435

Подписной индекс 81988

Объединенный каталог «Пресса России»

Журнал индексируется в системе

Российского индекса научного цитирования

(РИНЦ): www.elibrary.ru

© 2021 ГБУЗ МО МОНИКИ

им. М.Ф. Владимирского

www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)

ISSN 2587-9294 (online)

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе

по надзору в сфере связи, информационных

технологий и массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» входит

в перечень рецензируемых научных изданий,

в которых должны быть опубликованы основные

научные результаты диссертаций на соискание

ученой степени кандидата наук, на соискание

ученой степени доктора наук (Перечень ВАК).

Шифры научных специальностей:

14.01.02 – Эндокринология (медицинские науки)

14.01.04 – Внутренние болезни (медицинские науки)

14.01.05 – Кардиология (медицинские науки)

14.01.11 – Нервные болезни (медицинские науки)

14.01.13 – Лучевая диагностика, лучевая терапия (медицинские науки)

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных публикаций.

Полная или частичная перепечатка или размножение каким-либо способом статей и иллюстраций допускается только с письменного разрешения редакции.

Адрес редакции:

129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8

Тел.: +7 (495) 688 32 41

E-mail: o_papara@monikiweb.ru

www.almclinmed.ru

ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional
Research and Clinical Institute (MONIKI),
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 49 • Number 6 • 2021

EDITOR-IN-CHIEF

Maria G. Glezer, MD, PhD, Professor, Chair of Cardiology, Functional and Ultrasonic Diagnostics, Institute of Clinical Medicine named after N.V. Sklifosovskiy, Sechenov University (Moscow, Russia)

Deputy Chief Editor

Ekaterina P. Kakorina, MD, PhD, Professor, Deputy Director on Science and International Communications, MONIKI (Moscow, Russia)

Science Editor

Irina A. Vasilenko, MD, PhD, Professor, Head of Laboratory of Biomedical Study Methods, MONIKI (Moscow, Russia)

Managing Editor

Olesya A. Parpara (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Honourable Member: **Nikolay R. Paleev**, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Sergei A. Alekseenko, MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Ariel L. Barkan, MD, Professor of Medicine, Professor of Neurosurgery (Ann Arbor, USA)

Vladimir V. Bazarnyi, MD, PhD, Professor (Yekaterinburg, Russia)

Elena A. Belousova, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Alexandr V. Bogachev-Prokophiev, MD, PhD (Novosibirsk, Russia)

Anatol J. Bragin, PhD (Los Angeles, USA)

Michael Buchfelder, MD, PhD, Professor (Erlangen, Germany)

Mikhail M. Davydov, MD, PhD, Corr. member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Stefan De Hert, MD, PHD, Chair of ESA Scientific Committee, Professor of Department of Anaesthesiology and Perioperative Medicine (Gent, Belgium)

Larisa A. Dobrynina, MD, PhD (Moscow, Russia)

Oksana M. Drapkina, MD, PhD, Professor, Corr. member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Andrea Giustina, MD, President of European Society of Endocrinology, Professor of Endocrinology (Milan, Italy)

Mikhail A. Godkov, MD, PhD (Moscow, Russia)

Elena Z. Golukhova, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Evgeny V. Grigoryev, MD, PhD, Professor, Professor of Russ. Acad. Sci. (Kemerovo, Russia)

Lyudmila F. Gulyaeva, Doctor of Biol. Sci., Professor (Novosibirsk, Russia)

Mikhail Yu. Kirov, MD, PhD, Professor (Arkhangelsk, Russia)

Nikolay E. Kushlinskii, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Rustem I. Litvinov, MD, PhD, Professor (Philadelphia, USA)

Yurii V. Lobzin, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Saint Petersburg, Russia)

Johannes Mayr, MD, Professor of Pediatric Surgery (Basel, Switzerland)

Galina A. Mel'nichenko, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Anton V. Molochkov, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Dafin F. Muresanu, MD, PhD, MBA, FANA, Professor (Cluj-Napoca, Romania)

Oleg B. Naimark, ScD in Phys.-Math., Professor (Perm, Russia)

Vladimir V. Neroev, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Alexey M. Ovezov, MD, PhD (Moscow, Russia)

Gennadiy N. Ponomarenko, MD, PhD, Professor (Saint Petersburg, Russia)

Nikolay N. Potekaev, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Walter Reinisch, MD (Vienna, Austria)

Yury S. Romanko, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Natalia M. Shakhova, MD, PhD (Nizhny Novgorod, Russia)

Ekaterina I. Shishatskaya, ScD in Biology, PhD, Professor of Russ. Acad. Sci. (Krasnoyarsk, Russia)

Valentin E. Sinitsyn, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Stanislav I. Sitkin, Dr. med., PhD (Saint Petersburg, Russia)

Ivan S. Stilidi, MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci. (Moscow, Russia)

Yury A. Vasyuk, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Ludmila I. Velikanova, Doctor of Biol. Sci., Professor (Saint Petersburg, Russia)

Bruce H.R. Wolffenbuttel, MD, PhD, Professor of Endocrinology and Metabolism (Groningen, Netherlands)

Chi Yang, DDS, PhD, Professor (Shanghai, PRC)

Natalia N. Zybina, Doctor of Biol. Sci., Professor (Saint Petersburg, Russia)

Content

Articles

P.V. Gavrilov, U.A. Smolnikova

Evaluation of diagnostic accuracy of the automatic system for the analysis of digital lung X-ray for detection of spherical masses 359

S.A. Shcherbina, A.V. Shutko, A.A. Nizamieva, A.V. Nikitina, M.M. Slotvitsky, V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze

Investigation of the formation of cardiac tissue on substrates of varying degrees of anisotropy and rigidity 365

A.A. Smirnov, A.L. Ovsepyan, P.A. Kvindt, F.N. Paleev, E.V. Borisova, E.V. Yakovlev

Finite element analysis in the modeling of the heart and aorta structures 375

S.V. Pavlova, E.A. Elisaphenko, L.Sh. Shayakhmetova, S.P. Medvedev

Efficiency of SpCas9 and AsCpf1 (Cas12a) programmable nucleases at genomic safe harbor loci in HEK293 cells 385

E.A. Lukbanova, E.V. Zaikina, Yu.A. Sayapin, E.A. Gusakov, S.Yu. Filippova, E.Yu. Zlatnik, A.V. Volkova, L.Z. Kurbanova, D.V. Khodakova, D.O. Kaymakchi, Ju.N. Lazutin, A.N. Shevchenko, O.V. Pandova

Assessment of an antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone in A-549 tumor cell subcutaneous xenografts 396

O.S. Fedyanina, Yu.Yu. Chuksina, A.N. Khmelevskaya, A.N. Khvastunova, Yu.N. Matveev, E.V. Kataeva, A.V. Filatov, S.A. Kuznetsova

Diagnostic criteria of lymphoproliferative diseases from the peripheral blood samples using a cell biochip 405

A.S. Sustretov, V.V. Bogush, O.S. Guseva, P.V. Iliasov, L.V. Limareva

Comparison of modulation interference microscopy, DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytofluorimetry in the assessment of phytohemagglutinin-induced activity of human blood lymphocytes 412

E.N. Ievlev, I.A. Kazakova, E.P. Sukhenko

Structural and functional abnormalities of cell membranes in the end-stage chronic kidney disease 419

E.A. Sherstyukova, V.A. Inozemtsev, A.P. Kozlov, O.E. Gudkova, V.A. Sergunova

Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents 427

Clinical Cases

E.V. Isakova, Yu.V. Egorova

Visual and acoustic feedback on the support reaction for upper and lower extremities: a case study of a female patient after a stroke 435

Subscription index 81988
in the united Pressa Rossii catalogue

The journal is indexed by Russian Index of Scientific
Citation (RISC): www.elibrary.ru

© 2021 MONIKI
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Registration certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is included in the List of leading referred journals, recommended by VAK (Higher Attestation Committee) for publication of scientific results of dissertations for the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible for claims made in the advertisements published in the journal.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data base, on video discs, etc., without first obtaining written permission from the publisher (respective of the copyright owner if other than MONIKI).

Editorial Office

Almanac of Clinical Medicine, MONIKI,
61/2-8 Shchepkina ul., Moscow, 129110,
Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_parpara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru



Оригинальная статья

Оценка диагностической точности системы автоматического анализа цифровых рентгенограмм легких при выявлении округлых образований

Гаврилов П.В.¹ • Смольникова У.А.¹

Актуальность. Большинство данных об эффективности систем анализа цифровых рентгенологических изображений предоставлено самими разработчиками и нуждается в качественной проверке на базах данных, подготовленных независимо от разработчика.

Цель – проанализировать информативность автоматического распознавания округлых образований в легких при цифровой рентгенографии с использованием одного из общедоступных диагностических алгоритмов на публично недоступных эталонных наборах данных.

Материал и методы. Исследование основано на распознавании и анализе цифровых рентгенологических изображений из двух публично недоступных эталонных наборов данных, имеющих государственную регистрацию (Российская Федерация), посредством одного из общедоступных диагностических алгоритмов FutureMed Analyzer. Работа выполнена на примере двух моделей рентгенологического скрининга: модель 1 состояла из 100 рентгенограмм легких с соотношением «норма:патология» 94%:6%, модель 2 состояла из 5150 рентгенограмм легких с соотношением «норма:патология» 97%:3%.

Результаты. Анализ результатов интерпретации рентгенограмм диагностической системой

показал: из рентгенограмм модели 1 было верно интерпретировано 98% случаев, модели 2 – 95%. При этом 83% случаев из модели 1 и 69% из модели 2 были интерпретированы как рентгенограммы с наличием патологических изменений в легких. Количество правильных ответов при разделении рентгенограмм легких на две категории – «норма» и «патология» – в отношении моделей 1 и 2 составило 95 и 98% соответственно. Чувствительность в выявлении патологических образований колебалась от 69 до 83%. Специфичность составила 99% для рентгенограмм из модели 1 и 96% для рентгенограмм из модели 2. Был получен довольно низкий показатель гиподиагностики: для модели 1 – 17%, для модели 2 – 31%. Параметр «площадь под кривой» для модели 1 был равен 0,91, для модели 2 – 0,85.

Заключение. Диагностическая эффективность автоматического анализа изображений на основе сверточных нейронных сетей приближается к аналогичным показателям врачей-рентгенологов. Эта система автоматического выявления патологических изменений не смогла решить наиболее сложные проблемы выявления округлых образований с низкими плотностными характеристиками (согласно данным компьютерной томографии – по типу «матового стекла»)

и так называемую проблему суммации теней при локализации патологических изменений в таких затруднительных для интерпретации местах, как верхушки легких, ключицы, ребра и др. Для выбора подходящей системы медицинским учреждениям необходимо выполнять предварительное тестирование на собственных моделях, эквивалентных исследованиям, которые проводятся в данном учреждении (параметры выполнения рентгенографии, характер и частота выявляемой патологии).

Ключевые слова: рентгенография легких, округлые образования, скрининг, искусственный интеллект, сверточные нейронные сети

Для цитирования: Гаврилов П.В., Смольникова У.А. Оценка диагностической точности системы автоматического анализа цифровых рентгенограмм легких при выявлении округлых образований. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):359–364. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-035.

Поступила 11.05.2021; доработана 25.06.2021; принята к публикации 28.06.2021; опубликована онлайн 15.07.2021

Цифровые рентгенологические исследования легких занимают значимую (более 30%) долю от всех лучевых исследований в Российской Федерации [1, 2]. По данным многих авторов, существенную проблему в выявлении патологических изменений на рентгенограммах органов грудной клетки представляют сложность трактовки суммационных изображений и высокие требования к квалификации врачей-рентгенологов [3–5]. Эти факторы объясняют большой интерес разработчиков программного обеспечения к созданию диагностических алгоритмов, позволяющих проводить автоматический анализ рентгенологических

изображений легких. Применение таких алгоритмов предполагает более эффективное обнаружение патологических изменений [6–8].

В настоящее время большинство данных об эффективности систем анализа цифровых рентгенологических изображений предоставлено самими разработчиками и нуждается в качественной проверке на базах данных, подготовленных независимо от разработчика. При этом следует учитывать, что разработанные базы должны быть эквивалентны тем исследованиям, в которых будет применяться конкретная система распознавания и анализа рентгенограмм в реальной практике.



Целью исследования было проанализировать информативность автоматического распознавания округлых образований в легких при цифровой рентгенографии с использованием одного из общедоступных диагностических алгоритмов на публично недоступных эталонных наборах данных.

Материал и методы

Настоящее исследование основано на результатах распознавания и анализа цифровых рентгенограмм легких из тестовых баз посредством автоматической системы анализа медицинских изображений, ядром которой служит ансамбль из 10 нейронных сетей, созданных на основе архитектуры DenseNet-121 (свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU-2019665266, торговое название – FutureMed Analyzer). Она позиционируется как программное обеспечение в виде системы поддержки принятия врачебных решений, предоставляющее врачу-рентгенологу возможность получить «второе мнение» [9].

Для тестирования были сформированы две модели рентгенологического скрининга на основе зарегистрированных баз данных:

- «Базы цифровых рентгенограмм легких в передней проекции без патологических изменений» (свидетельство о регистрации RU-2019622406) – 5000 рентгенограмм;
- «Результаты лучевых исследований пациентов с периферическими образованиями легких» (свидетельство о регистрации RU-2019621712) – 150 рентгенограмм.

Для формирования «Базы цифровых рентгенограмм легких в передней проекции без патологических изменений» исполняли рентгенограммы легких, выполненные пациентам без жалоб с целью скрининга туберкулеза. Критерием отбора было согласованное мнение 5 врачей-рентгенологов об отсутствии патологических изменений на рентгенограмме. Критерием исключения из базы служило подозрение хотя бы одного рентгенолога на наличие патологических образований в легких.

База «Результаты лучевых исследований пациентов с периферическими образованиями легких» составлена на основе структурированных деперсонализированных данных лучевых исследований (рентгенограмм в передней проекции и компьютерных томограмм) 150 пациентов с различными верифицированными периферическими образованиями в легких. Структура патологических изменений, представленных в базе, была следующей: туберкулез легких – 33% (n = 50),

Гаврилов Павел Владимирович – канд. мед. наук, вед. науч. сотр., руководитель направления «Лучевая диагностика»; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3251-4084>
✉ 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр-т, 2–4, Российская Федерация.
Тел.: +7 (812) 775 75 55.
E-mail: spbniifrentgen@mail.ru

Смольникова Ульяна Алексеевна – аспирант отделения лучевой диагностики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9568-3577>.
E-mail: ulammonika@mail.ru

рак легких – 49% (n=74), доброкачественные образования легких – 14% (n=20), другое – 3% (n=6).

Модель 1 состояла из 100 рентгенограмм легких с соотношением «норма:патология» 94%:6% (94 человека без значимой рентгенологической патологии и 6 человек с подтвержденным наличием синдрома округлого образования в легочной ткани).

Для более детальной оценки возможности системы машинного обучения и анализа цифровых рентгенологических изображений в качестве программного продукта, направленного на обнаружение округлых образований в легких на цифровых рентгенограммах, и для определения совокупности параметров их диагностической точности была сформирована модель 2 с использованием всего объема информации из ранее указанных баз данных (5150 цифровых рентгенограмм). Соотношение «норма:патология» в модели 2 составило 97%:3%.

Для сопоставления эффективности автоматического распознавания образований в легких при цифровой рентгенографии относительно референс-теста (баз данных) применялся классический набор показателей, характеризующих диагностическую результативность (чувствительность, специфичность, отношение правдоподобия положительного результата, отношение правдоподобия отрицательного результата, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, точность) [10, 11].

Результаты

Согласно полученным результатам интерпретации цифровых рентгенограмм посредством использования системы машинного обучения и анализа цифровых рентгенологических изображений были определены основные критерии информативности диагностического теста, сформированы и проанализированы четырехпольные таблицы сопряженности (табл. 1, 2).

По результатам анализа, диагностической системой из модели 1 было верно интерпретировано 98% рентгенограмм, из модели 2 – 95%.

При анализе результатов интерпретации рентгенограмм с наличием округлого образования в легком из моделей 1 и 2 были интерпретированы как рентгенограммы с наличием патологических изменений в легких 83 и 69% случаев соответственно, при этом лишь на 33 и 55% снимков была верно указана локализация патологии на получаемой тепловой карте.

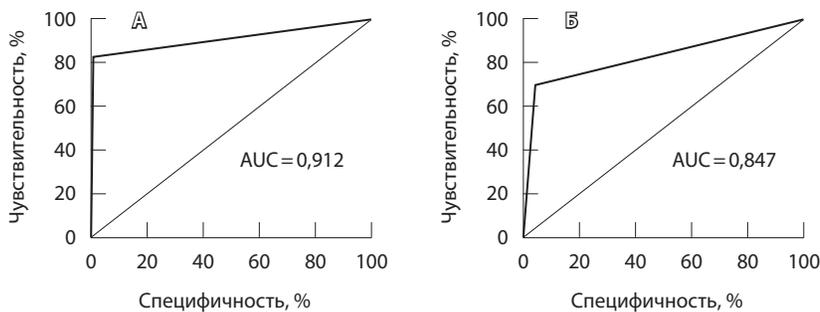
¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физиопульмонологии» Минздрава России; 191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр-т, 2–4, Российская Федерация



Таблица 1. Результаты интерпретации цифровых рентгенограмм системой автоматического анализа

Показатель	Классификатор			
	определено как патология		определено как норма	
	TP	FP	FN	TN
Модель 1 (n = 100), n (%)	5 (83)	1 (1)	1 (17)	93 (99)
Модель 2 (n = 5150), n (%)	104 (69)	219 (4)	46 (31)	4781 (96)

FN – false negative (классификатор неверно утверждает, что объект не принадлежит к рассматриваемому классу), FP – false positive (классификатор неверно отнес объект к рассматриваемому классу), TN – true negative (классификатор верно утверждает, что объект не принадлежит к рассматриваемому классу), TP – true positive (классификатор верно отнес объект к рассматриваемому классу)



Характеристические кривые: **А** – для модели 1, **Б** – для модели 2; AUC – area under the curve (площадь под кривой)

Количество правильных ответов при разделении рентгенограмм легких из моделей 1 и 2 на норму и патологию составило 95 и 98 соответственно. Чувствительность в выявлении патологических образований колебалась от 69 до 83%. Специфичность составила 99% для рентгенограмм из модели 1 и 96% для рентгенограмм из модели 2, что коррелирует с показателем прогностической ценности отрицательного результата (99%).

Дополнительно нами были построены графики, позволяющие оценить качество бинарной классификации, – характеристические кривые (ROC-кривые). Параметр «площадь под кривой» для модели 1 составил 0,91, для модели 2 – 0,85

(рисунок), что служит признаком хорошего качества моделей [10, 12, 13].

Отношение правдоподобия положительно-го результата по итогам анализа рентгенограмм из модели 1 составило 78,3, из модели 2 – 15,8. Прогностическая ценность положительного результата была больше при интерпретации рентгенограмм из выборки 1 – 83%. В целом получен довольно низкий показатель гиподиагностики: для модели 1 – 17%, для модели 2 – 31%. Все это можно рассматривать как положительный результат в отношении использования подобных программных продуктов на выборке с заранее известным преобладающим числом рентгенограмм без патологических изменений.

Мы также проанализировали влияние рентгенологических характеристик округлых образований в легких на качество их выявления системой машинного обучения и анализа цифровых рентгенологических изображений из модели 2. В 31% случаев снимки были интерпретированы как рентгенограммы без патологических изменений, при этом на 19% рентгенограмм была неверно указана локализация патологических изменений. Среди случаев гиподиагностики 46% рентгенограмм были с верифицированным раком легкого.

Дополнительно изучена взаимосвязь между типом округлого образования, его размерами и частотой пропуска патологических изменений при использовании автоматической системы анализа медицинских изображений. Программа не выявила ни одного образования по типу «матового стекла». Среди рентгенограмм с наличием образования солидного типа количество ошибочных интерпретаций составило 29% (n = 38), среди рентгенограмм с образованиями субсолидного типа – 38% (n = 6).

Количество случаев гипердиагностики при анализе рентгенограмм с образованиями размерами до 10 мм составило 80% (n = 4), размерами от 10 до 30 мм – 33% (n = 32), размерами более 30 мм – 21% (n = 10).

Оказалось, что наибольшие сложности с выявлением патологии возникали в случае локализации изменений в С1, С2 правого легкого

Таблица 2. Результативность выявления патологических изменений в легких

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %	Отношение правдоподобия положительного результата	Отношение правдоподобия отрицательного результата	Прогностическая ценность положительного результата, %	Прогностическая ценность отрицательного результата, %	Точность, %
Модель 1 (n = 100)	83	99	78,33	0,17	83	99	98
Модель 2 (n = 5150)	69	96	15,83	0,32	32	99	95



(31 и 28% соответственно) и в С1+2 левого легкого (53%). Это может быть ассоциировано с локализацией патологических изменений за тенью ребер и в верхушках легких в результате суммации тени округлого образования и тени 1-го ребра или ключиц на рентгенограмме.

Обсуждение

Полученные показатели критериев диагностической эффективности интерпретации цифровых рентгенограмм легких с синдромом округлого образования в легочной ткани свидетельствуют о перспективности данного метода интерпретации цифровых рентгенологических изображений, а также о возможности допуска программного продукта к клинической валидации [10].

При сравнении результатов нашего исследования с данными других работ отмечено, что показатели чувствительности, специфичности, отношения правдоподобия положительного результата, отношения правдоподобия отрицательного результата, прогностической ценности положительного результата, прогностической ценности отрицательного результата находятся в одном диапазоне, но колеблются в пределах 5–10%, что может быть обусловлено как качеством обучения программных продуктов, так и разностью выборок, примененных для тестирования. Это требует дальнейшего исследования на большем количестве выборок [6, 8, 14].

Если сравнивать ресурсы данного продукта с возможностями врача-рентгенолога в выявлении аналогичной патологии, можно говорить о сопоставимых результатах. В нашей предыдущей работе мы провели тестирование врачей-рентгенологов на возможность выявления округлых образований в легких при цифровой рентгенографии. Были получены следующие показатели диагностической эффективности: чувствительность – 75,35%, специфичность – 72,28%, отношение правдоподобия положительного результата – 2,71, отношение правдоподобия отрицательного результата – 0,34, прогностическая ценность положительного результата – 54,02%, прогностическая ценность отрицательного результата – 87,15%, точность – 73,2% [5]. Схожие данные опубликованы Y. Sim и соавт.: результаты тестирования системы машинного обучения и анализа цифровых рентгенологических изображений были аналогичны таковым, полученным при тестировании врачей-рентгенологов, при этом на этапе повторного анализа рентгенограмм врачом-рентгенологом уже с использованием результатов анализа рентгенограмм программным

продуктом средняя чувствительность возможностей рентгенологов повысилась с 65,1 до 70,3%, в свою очередь чувствительность программы автоматического анализа в среднем составила 67,3% (от 56,1 до 82,7%) [15].

Вместе с тем подчеркнем, что при использовании модели 2 с большим объемом рентгенограмм в исследовании и уменьшением соотношения между нормой и патологией мы видим снижение чувствительности программного продукта, прогностической ценности положительного результата, отношения правдоподобия положительного результата и площади ROC-кривой. При этом специфичность, прогностическая ценность отрицательного результата и точность снижаются крайне незначительно (в пределах 2–3%). Все это может быть обусловлено как большей вариативностью различных патологических процессов, предложенных системе, так и размерами выборки наблюдений и соотношением между нормой и патологией.

Отметим: данная система автоматического обнаружения патологических изменений не смогла решить наиболее сложные проблемы выявления при рентгенографии округлых образований, встречающихся в клинической практике (образования с низкими плотностными характеристиками, по данным компьютерной томографии относящиеся к типу «матового стекла»), и при локализации патологических изменений за тенью ребер и в верхушках легких – так называемую проблему суммации теней.

Заключение

Диагностическая эффективность исследуемой системы автоматического анализа изображений на основе сверточных нейронных сетей приближается к аналогичным показателям врачей-рентгенологов.

В случае принятия решения о целесообразности рассмотрения системы в качестве вспомогательного второго мнения для врачей-рентгенологов медицинским учреждениям для выбора подходящей системы необходимо проводить предварительное тестирование на собственных моделях, эквивалентных исследованиям, которые проводятся в данном учреждении (параметры выполнения рентгенографии, характер и частота выявляемой патологии).

Медицинскому сообществу предстоит широкая клиническая апробация разработанных систем искусственного интеллекта на независимых наборах данных, и эти результаты могут изменить показатели диагностической точности данных алгоритмов. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено в рамках диссертационной работы У.А. Смольниковой, финансирование осуществлялось ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России за счет средств, выделяемых на проведение научно-исследовательских работ.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

П.В. Гаврилов – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи; У.А. Смольникова – анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста, статистическая обработка данных. Оба автора прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература

1. Тюрин ИЕ. Лучевая диагностика в Российской Федерации в 2016 г. Вестник рентгенологии и радиологии. 2017;98(4):219–226. doi: 10.20862/0042-4676-2017-98-4-219-226.
2. Трофимова ТН, Козлова ОВ. Лучевая диагностика 2018 в цифрах и фактах. Лучевая диагностика и терапия. 2019;(3):100–102. doi: 10.22328/2079-5343-2019-10-3-100-102.
3. Yerushalmy J, Harkness JT, Cope JH, Kennedy BR. The role of dual reading in mass radiography. American Review of Tuberculosis. 1950;61:443–464.
4. Nakamura K, Ohmi A, Kurihara T, Suzuki S, Tadera M. [Studies on the diagnostic value of 70 mm radiophotograms by mirror camera and the reading ability of physicians]. Kekkaku. 1970;45(4):121–128. Japanese.
5. Гаврилов ПВ, Ушков АД, Смольникова УА. Выявление округлых образований в легких при цифровой рентгенографии: роль опыта работы врача-рентгенолога. Медицинский альянс. 2019;(2):51–56.
6. Lakhani P, Sundaram B. Deep Learning at Chest Radiography: Automated Classification of Pulmonary Tuberculosis by Using Convolutional Neural Networks. Radiology. 2017;284(2):574–582. doi: 10.1148/radiol.2017162326.
7. Jaeger S, Karargyris A, Candemir S, Folio L, Siegelman J, Callaghan F, Zhiyun Xue, Palaniappan K, Singh RK, Antani S, Thoma G, Yi-Xiang Wang, Pu-Xuan Lu, McDonald CJ. Automatic tuberculosis screening using chest radiographs. IEEE Trans Med Imaging. 2014;33(2):233–245. doi: 10.1109/TMI.2013.2284099.
8. Морозов СП, Владзимирский АВ, Ледихова НВ, Соколина ИА, Кульберг НС, Гомболевский ВА. Оценка диагностической точности системы скрининга туберкулеза легких на основе искусственного интеллекта. Туберкулез и болезни легких. 2018;96(8):42–49. doi: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-42-49.
9. Падалко МА, Наумов АМ, Назариков СИ, Лушников АА. Применение технологий искусственного интеллекта для диагностики туберкулеза и онкологических заболеваний. Туберкулез и болезни легких. 2019;97(11):62. doi: 10.21292/2075-1230-2019-97-11-62-62.
10. Морозов СП, Владзимирский АВ, Кляшторный ВГ, Андрейченко АЕ, Кульберг НС, Гомболевский ВА, Сергунова КА. Клинические испытания программного обеспечения на основе интеллектуальных технологий (лучевая диагностика): методические рекомендации. Серия «Лучшие практики лучевой и инструментальной диагностики». Вып. 57. М.; 2019. 53 с.
11. Васильев АЮ, Малый АЮ, Серова НС. Анализ данных лучевых методов исследования на основе принципов доказательной медицины: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 32 с.
12. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern recognition letters. 2006;27(8):861–874. doi: 10.1016/j.patrec.2005.10.010.
13. Macskassy SA, Provost F, Rosset S. ROC confidence bands: An empirical evaluation. In: ICML '05: Proceedings of the 22nd international conference on Machine learning. 2005. p. 537–544. doi: 10.1145/1102351.1102419.
14. Nam JG, Park S, Hwang EJ, Lee JH, Jin KN, Lim KY, Vu TH, Sohn JH, Hwang S, Goo JM, Park CM. Development and Validation of Deep Learning-based Automatic Detection Algorithm for Malignant Pulmonary Nodules on Chest Radiographs. Radiology. 2019;290(1):218–228. doi: 10.1148/radiol.2018180237.
15. Sim Y, Chung MJ, Kotter E, Yune S, Kim M, Do S, Han K, Kim H, Yang S, Lee DJ, Choi BW. Deep Convolutional Neural Network-based Software Improves Radiologist Detection of Malignant Lung Nodules on Chest Radiographs. Radiology. 2020;294(1):199–209. doi: 10.1148/radiol.2019182465.
6. Lakhani P, Sundaram B. Deep Learning at Chest Radiography: Automated Classification of Pulmonary Tuberculosis by Using Convolutional Neural Networks. Radiology. 2017;284(2):574–582. doi: 10.1148/radiol.2017162326.
7. Jaeger S, Karargyris A, Candemir S, Folio L, Siegelman J, Callaghan F, Zhiyun Xue, Palaniappan K, Singh RK, Antani S, Thoma G, Yi-Xiang Wang, Pu-Xuan Lu, McDonald CJ. Automatic tuberculosis screening using chest radiographs. IEEE Trans Med Imaging. 2014;33(2):233–245. doi: 10.1109/TMI.2013.2284099.
8. Morozov SP, Vladzimirskiy AV, Ledikhova NV, Sokolina IA, Kulberg NS, Gombolevskiy VA. [Evaluation of diagnostic accuracy of the system for pulmonary tuberculosis screening based on artificial neural networks]. Tuberculosis and Lung Diseases. 2018;96(8):42–49. Russian. doi: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-42-49.
9. Padalko MA, Naumov AM, Nazarikov SI, Lushnikov AA. [Using artificial intellect for diagnosis of tuberculosis and oncologic diseases]. Tuberculosis and Lung Diseases. 2019;97(11):62. Russian. doi: 10.21292/2075-1230-2019-97-11-62-62.
10. Morozov SP, Vladzimirskiy AV, Klyashstorny V, Andreychenko AE, Kul'berg NS, Gombolevskiy VA, Sergunova KA. [Clinical Trials of Intelligent Software (radiation diagnostics): guidelines]. Series "Best Practices in Radiation and Instrumental Diagnostics". Issue 57. Moscow; 2019. 53 p. Russian.
11. Vasil'ev AY, Malyy AY, Serova NS. [Analysis of data from radiation research methods based on the principles of evidence-based medicine]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 32 p. Russian.
12. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. Pattern recognition letters. 2006;27(8):861–874. doi: 10.1016/j.patrec.2005.10.010.



13. Macskassy SA, Provost F, Rosset S. ROC confidence bands: An empirical evaluation. In: ICML '05: Proceedings of the 22nd international conference on Machine learning. 2005. p. 537–544. doi: 10.1145/1102351.1102419.
14. Nam JG, Park S, Hwang EJ, Lee JH, Jin KN, Lim KY, Vu TH, Sohn JH, Hwang S, Goo JM,

Park CM. Development and Validation of Deep Learning-based Automatic Detection Algorithm for Malignant Pulmonary Nodules on Chest Radiographs. *Radiology*. 2019;290(1): 218–228. doi: 10.1148/radiol.2018180237.

15. Sim Y, Chung MJ, Kotter E, Yune S, Kim M, Do S, Han K, Kim H, Yang S, Lee DJ, Choi BW.

Deep Convolutional Neural Network-based Software Improves Radiologist Detection of Malignant Lung Nodules on Chest Radiographs. *Radiology*. 2020;294(1):199–209. doi: 10.1148/radiol.2019182465.

Evaluation of diagnostic accuracy of the automatic system for the analysis of digital lung X-ray for detection of spherical masses

P.V. Gavrilov¹ • U.A. Smolnikova¹

Rationale: Most data on the effectiveness of systems for the analysis of digital X-ray images have been provided by their developers and require a high-quality validation in databases prepared independently of the developer.

Aim: To analyze the information content of automatic identification of spherical lung masses with digital X-ray imaging using one of the widely available diagnostic algorithms on publicly inaccessible reference datasets.

Materials and methods: The study was based on the recognition and analysis of digital X-ray images from two publicly inaccessible reference datasets that have the state registration (Russian Federation) with one of the publicly available diagnostic algorithms (FutureMed Analyzer). The study was performed using two models of X-ray screening as examples: Model 1 consisted of 100 X-ray images of the lungs with a normal: abnormal ratio of 94%: 6%; Model 2 consisted of 5150 chest X-ray images with a normal: abnormal ratio of 97%: 3%.

Results: According to the results of the analysis of the X-ray images with the diagnostic system, 98% of the images were correctly interpreted with Model 1 and 95% of the images, with Model 2. 83% of the cases from Model 1 and 69% from Model 2 were interpreted as images with lung abnormalities. The percentage of correct answers for differentiation of the chest X-ray images into two categories (normal vs. abnormal) for Model 1 and Model 2 was 95% and 98%, respectively. The sensitivity for detection of abnormal masses ranged from 69% to 83%. The specificity was 99%

for the Model 1 chest X-ray images and 96% for the Model 2 chest X-ray images. The underdiagnosis rate was quite low ranging for Model 1 – 17%, and for Model 2 – 31%. The area under the curve for Model 1 was 0.91 and for Model 2 0.85.

Conclusion: The diagnostic efficiency of the automatic image analysis based on the convolutional neuronal networks approaches that of the radiologists. This system of automatic identification of abnormalities was unable to solve the most complex problems of detecting low density spherical masses (like "ground glass" area on computed tomography) and that of shadow summation for abnormalities located in such difficult to interpret zones as lung apices, clavicles, ribs, etc. To select a suitable system, medical institutions need to conduct preliminary testing in their own models equivalent to the studies performed in a given institution (parameters for radiography, nature and frequency of abnormalities).

Key words: lung X-ray, lung mass, screening, artificial intelligence, convolutional neuronal networks

For citation: Gavrilov PV, Smolnikova UA. Evaluation of diagnostic accuracy of the automatic system for the analysis of digital lung X-ray for detection of spherical masses. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):359–364. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-035.

Received 11 May 2021; revised 25 June 2021; accepted 28 June 2021; published online 15 July 2021

Pavel V. Gavrilov – MD, PhD, Leading Research Fellow, Head of Radiology Area;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3251-4084>
✉ 2–4 Ligovskiy prospekt, Saint Petersburg, 191036, Russian Federation. Tel.: +7 (812) 775 75 55.
E-mail: spbniifrentgen@mail.ru

Uliana A. Smolnikova – Postgraduate Student, Department of Radiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9568-3577>.
E-mail: ulamonika@mail.ru

Funding

The study was performed as a part of the thesis by U.A. Smolnikova, financed by the Saint Petersburg Research Institute for Phthisiopulmonology from the research budget.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

P.V. Gavrilov, the study concept and design, analysis and interpretation of the results, text editing, approval of the final version of the manuscript; U.A. Smolnikova, analysis and interpretation of the results, text writing and editing, statistical analysis. Both authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹Saint Petersburg Research Institute for Phthisiopulmonology; 2–4 Ligovskiy prospekt, Saint Petersburg, 191036, Russian Federation



Оригинальная статья

Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости

Щербина С.А.¹ • Шутько А.В.¹ • Низамиева А.А.¹ • Никитина А.В.¹ • Слотвицкий М.М.¹ • Цвеляя В.А.^{1,2} • Агладзе К.И.^{1,2}

Щербина Серафима Артуровна – студент магистратуры, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4223-0133>

Шутько Ангелина Владимировна – магистр, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1921-571X>

Низамиева Айгуль Альфредовна – аспирант, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7162-5214>

Никитина Анна Владимировна – магистр, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6462-7027>

Слотвицкий Михаил Михайлович – аспирант, инженер лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

Цвеляя Валерия Александровна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биофизики возбудимых систем¹; ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной и клеточной диагностики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация.
Тел.: +7 (916) 950 23 05.
E-mail: v.tsvelaya@monikiweb.ru

Агладзе Константин Игоревич – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем¹; заведующий лабораторией молекулярной и клеточной диагностики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

В экспериментах *in vitro* в последнее десятилетие было установлено, что механические свойства подложек сильно влияют на эффективность дифференцировки индуцированных плюрипотентных и эмбриональных стволовых клеток и их развития в зрелый фенотип. Меняя механо-эластические и структурные характеристики подложки, можно повышать процентный выход дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты. Цель данной работы состояла в изучении влияния изменения физических характеристик подложек на формирование фенотипических особенностей сердечных клеток. В задачи входило сравнение структурных свойств культивируемых слоев сердечной ткани, полученных при варьировании эластичности и структуры полимерных подложек. Результаты показали значительные различия в кальциевой активности и структурных особенностях кардиомиоцитов в зависимости от свойств подложки, а также существенное варьирование проведения возбуждения. В связи с тем что нарушения проведения в сердечной

ткани часто приводят к возникновению опасных сердечных аритмий, полученные данные предполагается использовать для определения группы пациентов с повышенным риском смерти от сердечной недостаточности.

Ключевые слова: кардиомиоцит, кардиальная дифференцировка, стволовые клетки, тканево-инженерные конструкции, оптическое картирование

Для цитирования: Щербина СА, Шутько АВ, Низамиева АА, Никитина АВ, Слотвицкий ММ, Цвеляя ВА, Агладзе КИ. Исследование формирования тканево-инженерного конструкта на основе кардиомиоцитов и матрикса различной степени анизотропии и жесткости. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):365–374. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-036.

Поступила 11.05.2021; доработана 25.06.2021; принята к публикации 28.06.2021; опубликована онлайн 01.10.2021

¹ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; 140180, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) позволяют с помощью направленной дифференцировки получать пациент-специфические кардиомиоциты, используемые затем для изучения физиологических/патологических процессов в сердечной ткани. Полученные данные могут применяться для раскрытия механизмов возникновения сердечных аритмий и разработки новых методов лечения *in vitro*. Однако в настоящее время не решен вопрос о соответствии фенотипа сердечных клеток, получаемых направленной дифференцировкой из ИПСК, фенотипу зрелых клеток, складывающемуся при развитии сердца в течение жизни пациента. Одним из недостатков использования кардиальных слоев, получаемых из дифференцирующихся кардиомиоцитов, считается незрелый эмбрионоподобный функциональный фенотип, получаемый в стандартных условиях дифференцировки [1–3]. Зачастую электрофизиологическая функция монослоев из кардиомиоцитов, полученных с помощью направленной дифференцировки из ИПСК, используемых в настоящее время, характеризуется медленной скоростью распространения электрического импульса и незрелыми профилями потенциала действия. Ранее авторами были изучены электрофизические характеристики дифференцированных в кардиомиоциты клеток, в частности, профили потенциала действия и возможность формирования функционального синцития между ними. Полученный в работе после 30-го дня от начала дифференцировки фенотип кардиомиоцитов в настоящей статье мы условно называем зрелым [4, 5].

Изучение влияния внешних факторов на формирование *in vitro* сердечной ткани показало, что физическое окружение играет важную роль в дифференцировке стволовых клеток и их нормальном развитии. Недавние исследования продемонстрировали определяющее значение микроокружения для высокоэффективной дифференцировки в кардиомиоциты [1, 6, 7].

Цель данной работы состояла в изучении влияния изменения физических характеристик подложки на форму кардиомиоцитов и проведение ими электрического возбуждения.

В задачи работы входило:

- сравнение кальциевой активности и свойств проведения волн возбуждения по культивируемым слоям кардиомиоцитов, полученных при варьировании эластичности и структуры подложек;

- сравнение структурных особенностей, в том числе формы клеток, структуры цитоскелета отдельных кардиомиоцитов, кластерных форм клеточных образований для монослоев при их дифференцировке и формировании на подложках с различной эластичностью и анизотропной структурой.

Результаты данной работы показывают значительное различие клеточных фенотипов, их структурных и функциональных особенностей, таких как увеличение сократительной активности вследствие понижения анизотропии подложки; повышение равномерности распространения фронта волн возбуждения вследствие повышения анизотропии подложки; выравнивание клеток и клеточных структур вдоль волокон, влияющее на скорость и характер проведения волны возбуждения; увеличение скоростей проведения волн возбуждения с повышением жесткости полимерной подложки. Основным результатом работы следует признать определение зависимости получаемой формы клеток от окружающей степени анизотропии при формировании монослоев, полученных с помощью направленной дифференцировки из ИПСК в различных условиях: наиболее ровный фронт волны при ее распространении по образцу получался на стекле, покрытом белковым матриксом, наибольшая скорость проведения волны возбуждения достигалась на жесткой полимерной подложке.

Материал и методы

В данной работе применяли комплексный подход к изучению формирования монослоев кардиомиоцитов в зависимости от микроокружения. Были использованы следующие основные методы:

- клеточная дифференцировка и культивирование линии ИПСК, полученной от кардиально здорового пациента;
- создание подложек из полимерных волокон с помощью метода электроспиннинга, а также подложек из полидиметилсилоксановых (ПДМС)-мембран;
- белки/матрикс: создание подложек с различными адгезивными поверхностями (раствор фибронектина, Matrigel);
- оптическое картирование с использованием кальцийзависимых красителей.

Получение подложек различной степени жесткости

Подложки для культивирования клеток изготавливали из полимера полидиметилсилоксана

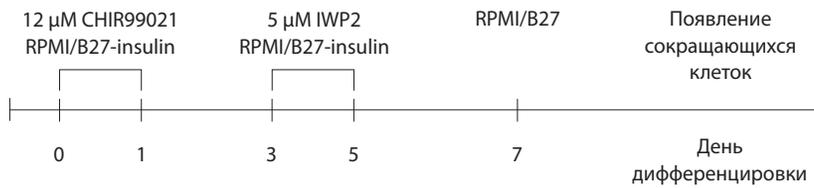


Рис. 1. Протокол для дифференцировки линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток iSMA6L в желудочковые кардиомиоциты [9, 10]

(ПДМС) путем смешивания двух жидких компонент: геля Sylgard 184 Base (Dow Corning) и эластомер Sylgard 184 (Dow Corning) в соотношении 10:1 по массе. Для создания подложек с другими механическими свойствами, в частности с меньшей степенью жесткости, смешивали приготовленный ранее и мягкий ПДМС в соотношениях 40/60 и 60/40 при аналогичном смешивании 10 частей данной основы с 1 частью эластомера Sylgard 184. Мягкая составляющая ПДМС готовилась путем смешивания равных масс двух частей – Sylgard 527 Part A и Sylgard 527 Part B (Dow Corning). После тщательного перемешивания в чашке Петри в течение 10 минут получившийся жидкий раствор равномерно распределяли в лунки 24-луночного планшета до полного их покрытия слоем около 3 мм. Затем планшет с нанесенными пленками ПДМС ставили в печь при 70 °C на 12–24 часа до полного отвердевания. Получившиеся подложки обрабатывали в стерильных условиях 70% этиловым спиртом и водой в течение часа, после чего подвергали ультрафиолетовому излучению также в течение часа. Для улучшения адгезивности подложки наносили раствор Matrigel (Corning, кат. № 356234, стоковая концентрация раствора 8 мг/мл) в течение 2 часов при комнатной температуре также в стерильных условиях.

Получение подложек различной степени анизотропии

Раствор поликапролактона (англ. polycaprolactone, PCL) готовили путем растворения порошка PCL (440744, Sigma-Aldrich, США) в гексафторизопропанол в концентрации 10–15%. Приготовленный раствор подвергали электропрядению (электроспиннингу) на установке Nanon-01 (Mecс Co., Ltd) с приложенным напряжением между наконечником шприца и заземленным коллектором в диапазоне от 5 до 10 кВ. Его загружали в шприц на 3 мл и вводили через иглу с тупым концом 20-го калибра со скоростью потока 0,1–1 мл/ч при использовании программируемого шприцевого насоса Fusion 100

(Chemux Inc., Япония). Нановолокна электропрядили непосредственно на поверхность покровного стекла диаметром 15 мм, нанесенного на заземленный коллектор. Угловая скорость составляла 1000 об/мин. После завершения процесса электроспиннинга неадгезивные нановолоконные субстраты PCL обрабатывали ультрафиолетом и покрывали матриксом Matrigel (Corning, кат. № 356234) или Geltrex (Gibco, кат. № A1413301) для повышения их адгезивности.

Дифференцировка и ведение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток
Культивирование ИПСК проходило на заранее подготовленных подложках из ПДМС, покрытых матриксом Matrigel в культивируемой среде E8 (Gibco, A1517001) в соответствии с протоколом [5]. Базовым протоколом для дифференцировки был протокол активации сигнального пути WNT/ β -катенин с помощью CHIR99021 при его последующем ингибировании [4, 8–10]. Клеточная линия isma6L, используемая в работе, получена в Институте цитологии и генетики СО РАН от пациентов Национального медицинского исследовательского центра им. академика Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск). Апробация данной линии была опубликована ранее [4, 8]. Для дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты был осуществлен подбор протокола для линии isma6L (рис. 1). За основу для модификаций протоколов направленной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты взяли опубликованный ранее протокол [9, 10]. Для проверки селективности кардиомиоцитов, полученных из ИПСК данной линии как чистой популяции клеток, выполнялась метаболическая селекция полученных дифференцированных клеток в течение 5–7 дней [10] в среде RPMI 1640 без глюкозы с лактатом.

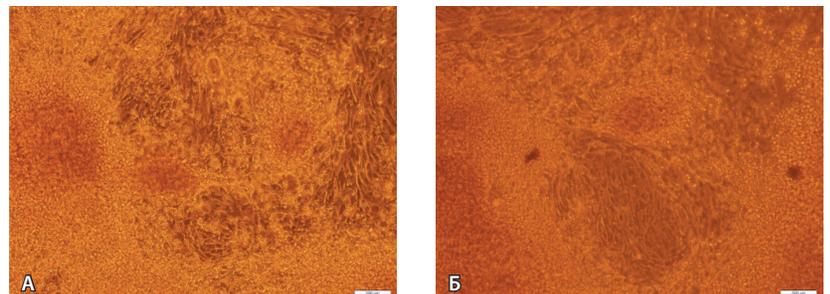


Рис. 2. Микроскопические изображения структуры колоний индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, дифференцирующихся в кардиомиоциты, на подложках различной жесткости: **А** – слой кардиомиоцитов на 25-й день дифференцировки на подложке полидиметилсилоксана 60/40; **Б** – слой кардиомиоцитов на 27-й день дифференцировки на 100% твердом полидиметилсилоксане (100/0); $\times 10$

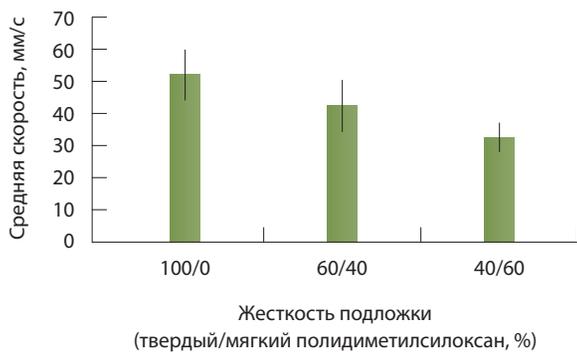


Рис. 3. Зависимость значений средней скорости проведения волны возбуждения (мм/с) при стимуляции в 1 Гц по слою кардиомиоцитов, полученных в процессе дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты на матрице полидиметилсилоксана разного состава, от жесткости подложки

Метаболическая селекция

Для снятия электрофизиологических характеристик с дифференцирующихся клеток и экспериментов по формированию монослоев, последние в процессе дифференцировки рассаживают с помощью раствора Версена на подложки, перечисленные выше. Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов начиная от 2 дней после пересадки в течение 7–10 дней была протестирована метаболическая селекция, при которой кардиомиоциты в процессе дифференцировки культивируются в лактозной среде RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата (Sigma-Aldrich, США), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *oryza sativa* (Sigma-Aldrich, США), и 5 мМ DL-лактата натрия (L4263, Sigma-Aldrich, США). Данный метод показал увеличение на 20% эффективности экспериментов для измерения электрофизиологических характеристик (потенциала действия, токов) для одиночных рассаживаемых кардиомиоцитов, а также улучшение формирования синцития после пересадки дифференцирующихся в кардиомиоциты клеток, так как зрелыми кардиомиоцитами можно считать к 40-му дню от начала дифференцировки [5] и перевода на сывороточную среду согласно протоколу [10].

Оптическое картирование

После направленной дифференцировки ИПСК в монослой кардиомиоцитов на различных подложках изучали проведение волны

возбуждения. День эксперимента отсчитывается от начала дифференцировки. Следующий протокол описывает процедуру оптического картирования волны возбуждения:

- образец инкубировали при температуре 37 °С от 30 минут до часа с кальций-зависимым флуоресцентным красителем Fluo-4 (Invitrogen, F14201) в концентрации 4 мкг/мл;
- по истечении времени данный раствор заменяли на солевой раствор Тироде (Sigma-Aldrich Co., США, T2145-10L с pH 7,25) той же температуры. Сам образец помещали на термопластинку для поддержания физиологической температуры;
- визуализация сигнала, сопутствующего возбуждению клеток, и запись видео производились при помощи системы Olympus MVX10 MacroView и камеры с высоким

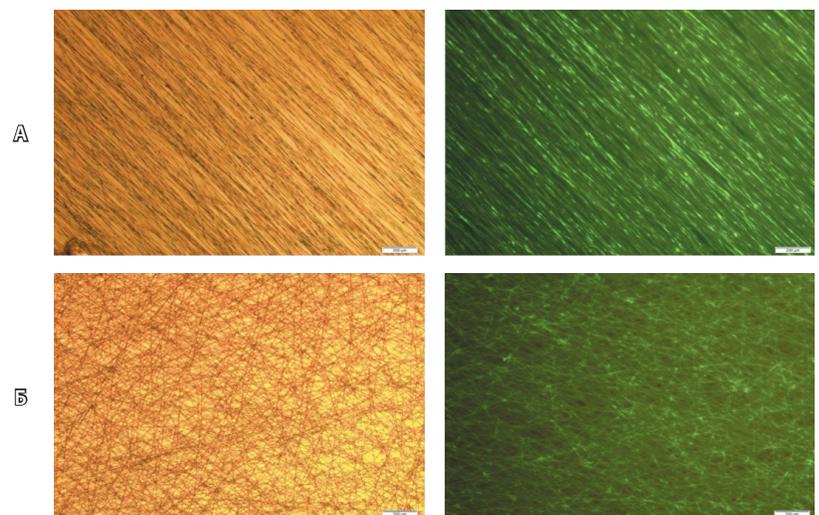


Рис. 4. Различные типы волокон, полученных с помощью электроспиннинга: **А** – направленно ориентированные волокна, полученные с помощью щелевого коллектора (анизотропная нановолоконная подложка); **Б** – хаотически расположенные волокна, полученные без щелевого коллектора (изотропная нановолоконная подложка). Волокна покрашены флуоресцентным красителем; $\times 10$



Рис. 5. Колонии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на 2-й день после рассадки (1:5), посаженные на направленно ориентированные (выровненные) волокна; $\times 10$



пространственным и временным разрешением Andor EMCCD Camera 897-U (512 × 512, 130 кадров в секунду);

- стимуляция кардиослоев проводилась точечным электродом с разными частотами возбуждения от 1 до 5 Гц;
- для последующей обработки видео использовали программу ImageJ и ее плагины (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Отметим: эксперимент не должен длиться более 30 минут, так как при превышении этой

временной нормы возможно повреждение клеток или нарушение их дальнейшего развития. После картирования и промывки образец снова заливали средой RPMI 1640 + B-27 Supplement (Gibco, 17504044) и помещали обратно в инкубатор до следующих экспериментов.

Иммуноцитохимический анализ

Для исследования морфологии культуры получаемых в процессе дифференцировки кардиомиоцитов образцы после картирования фиксировались с помощью 4% параформальдегида и окрашивались на специфичный сократительному аппарату кардиомиоцитов белок α -актинин, актиновые филаменты и ДНК клеток. Для этого использовали антитела – первичное на α -актинин (monoclonal anti- α -actinin (sarcomeric) antibody produced in mouse, Sigma (1:1000) и вторичное (anti-mouse Alexa Fluor 594 (ab') 2 fragment of Goat anti-mouse IgG (H+L), Sigma 1:2000), а также неспецифичные красители Alexa Fluor 488 Phalloidin Conjugate (Invitrogen, A12379) и DAPI (Thermo Scientific, 62248). Исследование проводили на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss, Германия) с помощью встроенных режимов на лицензионном программном обеспечении Zeiss. Сигналы от каждой флуоресцентной метки регистрировались в соответствующем диапазоне длин волн. Затем каналы были условно обозначены цветами и объединены.

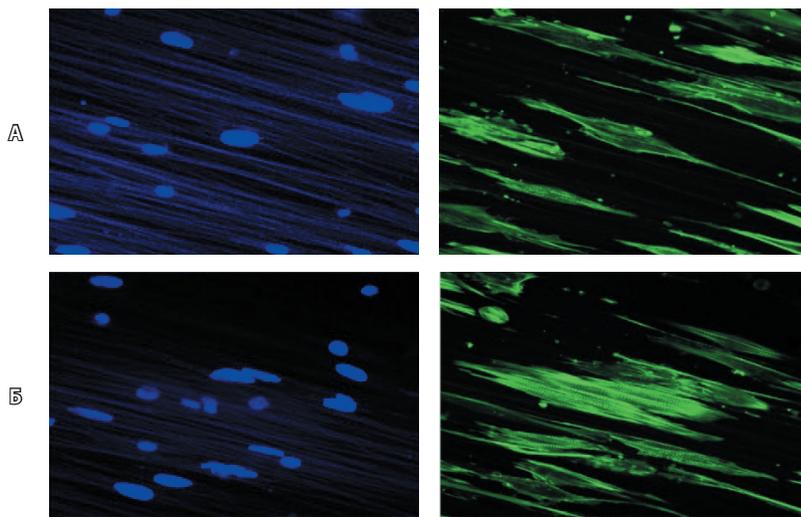


Рис. 6. Кардиомиоциты, посаженные на направленные волокна, вытянутые вдоль волокна: **А** – посадка 100 000 клеток на лунку ($d = 15$ мм); **Б** – посадка 50 000 клеток. На рисунке представлены полилактононовые волокна (синим цветом обозначены ядра клеток и волокна, зеленым – F-актин в клетках); $\times 10$

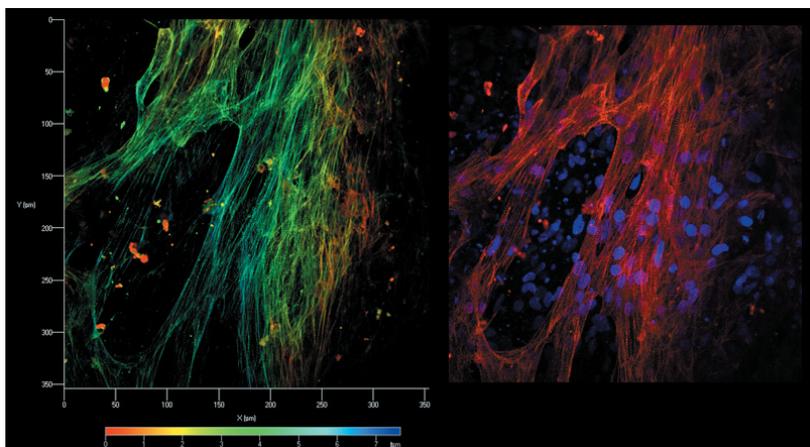


Рис. 7. Конфокальное изображение иммуноцитохимической окраски кардиальных тяжей, полученных в процессе дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты на направленных волокнах. Красным указан маркер кардиомиоцитов α -актинин, зеленым – F-актин, синим – ядра клеток. С помощью цвета также обозначено пространственное расположение тяжей: от красного (ближе) к синему (дальше); $\times 40$

Результаты

Результаты работы можно условно разделить на 2 части:

- исследование влияния жесткости подложки и матрикса Matrigel на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты;
- исследование влияния анизотропии на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты.

Исследование влияния жесткости подложки и матрикса на формирование кардиального синцития

В первую очередь было проведено исследование влияния жесткости подложки и матрикса на формирование кардиального синцития при направленной дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты. Показано значительное различие при формировании монослоев кардиомиоцитов на подложках с различными свойствами. Для

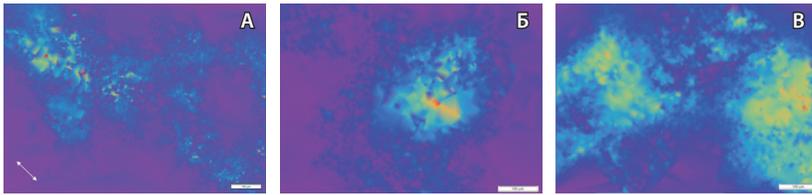


Рис. 8. Карты сжатия для кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток на анизотропном (А) и изотропном (Б) нановолоконных каркасах, а также стекле (В) (все подложки обработаны Matrigel). Цветовая функция отображает локальные скорости смещения во время сокращения (мкм/с). Стрелка показывает ориентацию анизотропных волокон

повышения адгезивности с поверхностью дифференцирующихся колоний ИПСК тестировали различные матриксы и белки – человеческий фибронектин, Matrigel и Geltrex. Результаты показали, что при дифференцировке или последующей рассадке на культуральном пластике, покрытом матриксом Matrigel, формирование кардиослоев происходило эффективнее в 90% образцов, общая электрофизиологическая зрелость кардиомиоцитов наблюдалась на 50–54-й день после начала дифференцировки [5]. При сравнении матриксов Matrigel и Geltrex первый показывал лучшие результаты с точки зрения получаемых кардиальных синцитиев и проведения волн возбуждения.

Исследование выполняли также в зависимости от разной степени жесткости подложки. Для этого был использован полимер ПДМС в разных пропорциях базового полимера. Условно ПДМС обозначали по процентному содержанию компонент базового полимера (твердый к мягкому). Например, ПДМС 60/40 означало 60% более твердой базы с 40% мягкой компоненты. На заранее подготовленных таким образом планшетах с разной жесткостью ПДМС, покрытого Matrigel, проводили культивирование ИПСК и последующую направленную дифференцировку ИПСК в кардиомиоциты. На рис. 2 показаны слои кардиомиоцитов, полученных на ПДМС различной жесткости на 25–27-й день от начала дифференцировки, что говорит о различии получаемых структур, образуемых клетками на таких подложках. Для каждого планшета существовал контроль на культуральном пластике. Первые сокращения наблюдались не в контроле на культуральном пластике, а на самом твердом ПДМС (100/0) на 8-й день, через 6-9 часов после добавления последнего компонента среды по протоколу.

Оптическое картирование для самого жесткого ПДМС (100/0) проводили на 23-й день, для ПДМС 60/40 – на 22-й день, для ПДМС

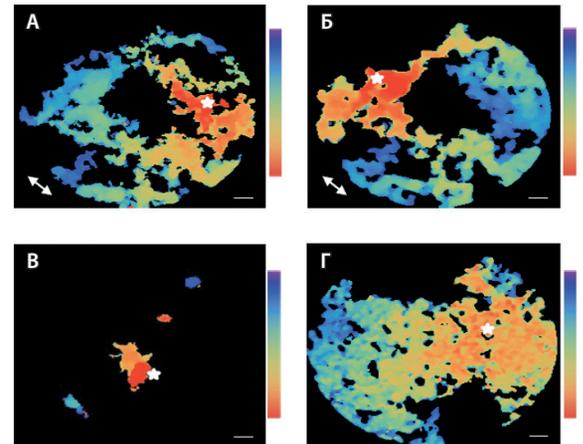


Рис. 9. Активационные карты оптического картирования, полученные при стимуляции 1 Гц монослоев кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на 50-й день от начала дифференцировки на различных подложках: А и Б – на анизотропных подложках, В – на изотропной подложке, Г – на стекле, покрытом матриксом Geltrex. Звездочкой обозначены места стимуляции образцов точечным электродом, стрелками указано направление волокон в случае их направленности. Образцы визуально сократимы, но функционально клетки разобщены в зависимости от степени анизотропии в сравнении 9А и 9В. Электротоническое возбуждение составляло менее 0,2 мм; $\times 1,6$

40/60 – также на 22-й день. Скорость проведения волны возбуждения составляла для ПДМС 100/0 около 52,33 мм/с, для ПДМС 60/40 около 42,6 мм/с, для ПДМС 40/60 примерно 32,67 мм/с. Погрешности и скорости указаны на рис. 3. Согласно статье [5], на 22–24-й день скорость составляет 40% от максимальной у созревшего слоя кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, что близко по значениям к скоростям на реальной сердечной ткани. Полученные данные по скоростям на данных подложках позволяют констатировать, что при дифференцировке ИПСК в кардиомиоциты на подложке из самого жесткого ПДМС (100/0) имеется преимущество в скорости проведения волны возбуждения по такому слою по сравнению с контролем на культуральном пластике.

Исследование влияния структуры подложек (анизотропии) на характеристики сердечных слоев

С целью поиска оптимальной подложки для дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты изучали модели анизотропных и изотропных образцов культивированных кардиальных слоев, полученных с помощью нановолоконных полимерных (PCL) подложек с различной степенью анизотропии (рис. 4). Данный поиск был



необходим для создания условий лучшего формирования функционального синцития кардиомиоцитов в процессе дифференцировки, а также для исследования влияния анизотропии на проведение возбуждения. Таким образом, определено 4 типа подложек, представляющие собой: 1) направленно ориентированные или выровненные волокна (рис. 4А); 2) хаотически расположенные волокна (рис. 4Б); 3) стекло; 4) культуральный пластик. Все четыре вида подложек покрывали матриксом Matrigel для улучшения роста клеток.

После посадки ИПСК на 2-й тип подложки колонии ИПСК располагались примерно таким же образом, как и на культуральном пластике, не образуя упорядоченных структур, при этом формируя конфлюэнтный слой. Однако при посадке ИПСК на направленные волокна (1-й тип подложки) колонии имели вытянутую форму и формировались вдоль волокон, как показано на рис. 5. На полученных волокнах конфлюэнтный монослой формировался в 2 раза медленнее, чем на подложках из культурального пластика и стекла.

Если проводить рассадку кардиомиоцитов на выровненные волокна, можно также увидеть вытягивание их цитоскелета вдоль волокон (рис. 6). Некоторые кардиомиоциты образуют кластеры, их кальциевая активность и сокращения распространяются по направлению волокон быстрее, чем поперек волокнистой структуры.

В процессе дифференцировки на направленных волокнах кардиомиоциты начинают формировать тяжи. Их расположение также направлено вдоль волокон, как показано на рис. 7.

Последними при дифференцировке стали проявлять сокращения клетки на изотропных образцах, то есть хаотичных волокнах. Там же наблюдались наиболее несинхронные сокращения и неоднородность распределения сокращающихся тяжей и кластеров кардиомиоцитов, полученных при направленной дифференцировке. Самые активные сокращения регистрировали на культуральном пластике, что можно наблюдать на картах сокращений (рис. 8).

Формирование функционального проводящего синцития протекало на всех подложках по-разному, что соотносится с работой [11]. На изотропной подложке (хаотичных волокнах) данный процесс почти не наблюдался. Клетки группировались в кластеры и сокращались в них, не соединяясь друг с другом. Было проведено оптическое картирование образцов на разных подложках после 50-го дня от

начала дифференцировки (рис. 9). Как показано на рис. 9В, при точечной стимуляции образца на изотропной подложке происходило возбуждение лишь соседних с электродом клеток, волна возбуждения не распространялась. На рис. 9А и 9Б показаны активационные карты образцов на анизотропной подложке, то есть на направленных волокнах. Как видно из рисунков, в данном случае возбуждение распространялось крайне неравномерно. Быстрее волна возбуждения распространялась вдоль направления волокон, наиболее равномерно – на образцах с подложкой из стекла и культурального пластика. При сравнении активационных карт обнаружили, что наиболее однородный монослой из дифференцированных в кардиомиоциты клеток формируется на культуральном пластике с Matrigel.

Метаболическая селекция

Для выделения чистой популяции кардиомиоцитов через несколько дней (от 2 дней) после пересадки в течение 7–10 дней была протестирована метаболическая селекция, при которой кардиомиоциты в процессе дифференцировки культивируются в лактозной среде RPMI 1640 без D-глюкозы (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 213 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата (Sigma-Aldrich, США), 500 мкг/мл рекомбинантного альбумина человека, экспрессированного в *oryza sativa* (Sigma-Aldrich, США), и 5 мМ DL-лактата натрия (L4263, Sigma-Aldrich, США). Данный метод показал увеличение результативности экспериментов на 20% для одиночных кардиомиоцитов, а также улучшение формирования синцития после пересадки дифференцирующихся клеток и перевода на сывороточную среду.

Обсуждение

Свойства окружения, безусловно, играют важную роль при формировании клеточных структур. В частности, подложки для культивируемых кардиослоев при их формировании *in vitro* выполняют функцию, аналогичную внеклеточному матриксу *in vivo*. В представленной работе было показано, что варьирование жесткости подложки изменяет скорость проведения волны возбуждения. При этом скорость увеличивается с повышением жесткости подложки. Дальнейшие исследования могут определить оптимальную жесткость для создания зрелого фенотипа кардиомиоцита *in vitro*, наиболее соответствующего



фенотипу клеток сердца пациента, что, в свою очередь, позволит осуществить разработку эффективной экспериментальной платформы для исследования пациентспецифичного действия фармацевтических препаратов и кардиотоксичности. Под зрелым фенотипом кардиомиоцитов в представленной статье подразумевается фенотип желудочкового кардиомиоцита, имеющего сформированный потенциал действия, характерный для взрослого кардиомиоцита, сформированные токи и уже прошедший период развития межклеточных связей для образования электрического синцития на 50–54-й день от начала дифференцировки [4, 5, 12].

Отметим: в работе был исследован класс менее жестких подложек, на которых ряд авторов наблюдали мощные синхронные сокращения слоя клеток. Нами такого эффекта обнаружено не было, что вступает в противоречие с работой [13].

Мы также отметили эффект организации дифференцирующихся клеток в тягеподобные волоконные структуры. Точный биологический механизм такого выравнивания неизвестен. На наш взгляд, это может быть связано с известным свойством усиления актинового цитоскелета в ответ на внешнюю силу, то есть при анизотропии актиновые нити ремоделируются под действием приложенного напряжения, полученного в результате натяжения подложки-волокна, стабилизируя весь клеточный комплекс [14]. Натяжение является максимальным, если актиновые филаменты выровнены друг с другом, что обуславливает предпочтение межклеточного выравнивания цитоскелетов. Такое выравнивание лучше всего описывается гамильтоновой механикой и, например, в клеточной модели Поттса выглядит следующим образом [15]:

$$H = H_{adhesive} + H_{elastic} + H_{protr} + H_{nuclei} + H_{junctions}$$

где $H_{adhesive}$ – гамильтониан взаимодействия клеток с подложкой (адгезия); $H_{elastic}$ – гамильтониан, описывающий эластичные свойства мембраны и постоянство объема клетки; H_{protr} – гамильтониан, описывающий динамику выпячивания сердечных клеток, которая создает характерные многоугольные формы этих клеток; H_{nuclei} – гамильтониан, описывающий более высокую с математической точки зрения жесткость ядер по сравнению с телом клетки; $H_{junctions}$ – гамильтониан, описывающий стабильность адгезионных соединений и выравнивание цитоскелетов соседних клеток.

В рамках последнего гамильтониана описывается сила, под действием которой происходит образование тягеподобных структур и их стабилизация. Несмотря на то что данный эффект не продемонстрировал лучших электрофизиологических характеристик по сравнению с обычными изотропными условиями дифференцировки, результат может быть полезен для регенеративной медицины с точки зрения места волоконной архитектуры в тканевой инженерии сердца.

Заключение

Кардиомиоциты, получаемые из ИПСК, позволяют реализовать идею постоянного пациентспецифичного источника кардиальных клеток. Доступность ИПСК даст возможность разработать улучшенные платформы для тестирования фармацевтических препаратов и моделирования патологий, а также внедрить методы клеточной терапии и трансплантации выращенных тканей. В данной работе была успешно проведена попытка повышения качества получаемых клеточных структур путем изучения проведения волн возбуждения по ним. Формирование кардиальных слоев из дифференцируемых ИПСК варьировалось различным микроокружением клеток. Результаты предполагают улучшение структурных и электрофизиологических свойств кардиомиоцитов в условиях разных свойств клеточной микросреды, которые были измерены с помощью визуализированной волны возбуждения широко используемого [5, 16] кальцийзависимого красителя.

Итоги данной работы показывают значительные различия при формировании функционального электромеханического синцития в процессе дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты. Среди особенностей можно выделить следующие:

- увеличение сократительной активности вследствие понижения анизотропии подложки;
- повышение равномерности распространения фронта волн вследствие повышения анизотропии подложки возбуждения;
- выравнивание клеток и клеточных структур вдоль волокон, влияющее на скорость и характер проведения волны возбуждения;
- увеличение скоростей проведения волн возбуждения с повышением жесткости полимерной подложки.

Основным результатом работы следует признать определение зависимости получаемых электрофизиологических свойств проведения



волн возбуждения от микроокружения клеток при формировании монослоев во время направленной дифференцировки из ИПСК. Полученные данные могут быть использованы для ранней

диагностики и моделирования патологий в процессе эмбриогенеза сердца и в регенеративной медицине, в частности клеточной терапии постинфарктных рубцов. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Финансирование осуществлялось ГБУЗ МО МОНКИ им. М.Ф. Владимирского и МФТИ за счет бюджетных средств.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

С.А. Щербина – подготовка подложек из полидиметилсилоксана для клеточных линий, ведение и дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, проведение экспериментов по оптическому картированию, написание текста; А.В. Шутько – разработка дизайна исследования, подготовка подложек с разной степенью анизотропии, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; А.А. Низамиева – проведение экспериментов по оптическому картированию, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста; А.В. Никитина – подготовка подложек с разной степенью анизотропии, проведение иммуноцитохимического анализа, анализ результатов,

редактирование рукописи; М.М. Слотвицкий – разработка дизайна проекта, ведение и дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, проведение экспериментов по оптическому картированию, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста; В.А. Цвеляя – концепция исследования, дизайн экспериментальной части исследования, проведение иммуноцитохимического анализа, анализ результатов, написание и редактирование текста; К.И. Агладзе – концепция исследования, концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Благодарности

Выражаем благодарность за помощь в работе всему коллективу лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ, а также ГБУЗ МО МОНКИ за финансовую поддержку.

Литература / References

- Besser RR, Ishahak M, Mayo V, Carbonero D, Claire I, Agarwal A. Engineered Microenvironments for Maturation of Stem Cell Derived Cardiac Myocytes. *Theranostics*. 2018;8(1): 124–140. doi: 10.7150/thno.19441.
- Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elfantay AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 2012;111(3):344–358. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(14):1991–2002. doi: 10.1089/scd.2012.0490.
- Slotvitsky M, Tselaya V, Frolova S, Dementyeva E, Agladze K. Arrhythmogenicity Test Based on a Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer. *Toxicol Sci*. 2019;168(1):70–77. doi: 10.1093/toxsci/kfy274.
- Slotvitsky MM, Tselaya VA, Podgurskaya AD, Agladze KI. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1):7774. doi: 10.1038/s41598-020-64581-5.
- Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S, Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9(4):e003638. doi: 10.1161/CIRCEP.113.003638.
- LaBarge W, Mattappally S, Kannappan R, Fast VG, Pretorius D, Berry JL, Zhang J. Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219442. doi: 10.1371/journal.pone.0219442.
- Слотвицкий ММ, Цвеляя ВА, Фролова ШР, Деметьева ЕВ, Агладзе КИ. Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(2):187–195. doi: 10.18699/VJ18.346. [Slotvitsky MM, Tselaya VA, Frolova SR, Dement'eva EV, Agladze KI. [The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome]. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(2):187–195. Russian. doi: 10.18699/VJ18.346.]
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013;8(1):162–175. doi: 10.1038/nprot.2012.150.
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855–860. doi: 10.1038/nmeth.2999.
- Цвеляя ВА. Тканевая инженерия сердца как средство для исследования фундаментальных процессов возникновения реентри [диссертация]. Долгопрудный; 2019. 164 с. [Tselaya VA. [Heart tissue engineering as a tool to study fundamental process of the re-entry generation: PhD dissertation]. Dolgoprudny; 2019. 164 p. Russian.]
- Tselaya VA, Gams A, Aziz J, Efimov IR. Induced pluripotent stem-cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs): novel diagnostic platform. In: Haider KH, Aziz SM. *Stem Cells – from Hype to Real Hope*. Berlin: De Gruyter; 2018.
- Zhang F, Qu K, Li X, Liu C, Ortiz LS, Wu K, Wang X, Huang N. Gelatin-based hydrogels combined with electrical stimulation to modulate neonatal rat cardiomyocyte beating and



promote maturation. *Bio-Design and Manufacturing*. 2021;4(1):100–110. doi: 10.1007/s42242-020-00100-9.

14. Schoen I, Pruitt BL, Vogel V. The Yin-Yang of Rigidity Sensing: How Forces and Mechanical Properties Regulate the Cellular Response to Materials. *Annual Review of Materials Re-*

search. 2013;43(1):589–618. doi: 10.1146/anurev-matsci-062910-100407.

15. Kudryashova N, Nizamieva A, Tselaya V, Panfilov AV, Agladze KI. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells. *PLoS Comput*

Biol. 2019;15(3):e1006597. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006597.

16. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J*. 2013;34(15):1147–1156. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418.

Investigation of the formation of cardiac tissue on substrates of varying degrees of anisotropy and rigidity

S.A. Shcherbina¹ • A.V. Shutko¹ • A.A. Nizamieva¹ • A.V. Nikitina¹ • M.M. Slotvitsky¹ • V.A. Tselaya^{1,2} • K.I. Agladze^{1,2}

In the last decade, *in vitro* experiments have shown that mechanical properties of the bases could markedly influence the efficacy of differentiation of the induced pluripotent and embryonic stem cells and their development into the mature phenotype. By changing of mechanical, elastic and structural characteristics of the base, it is possible to increase the percentage of stem cells that differentiate to cardiomyocytes.

The study was aimed at evaluation of the effects induced by changing physical characteristics of the base on the formation of phenotypic characteristics of cardiac cells. This included the comparison of structural properties of the cultured layer of heart tissue obtained by changing of elasticity and structure of polymeric bases. The results showed significant differences in calcium activity and structural characteristics of cardiomyocytes depending on the base properties, as well as

significant variation in the excitation conduction. As long as conduction abnormalities in the heart tissues can often lead to occurrence of life-threatening cardiac arrhythmias, the results can be used to determine patient groups at increased risk of death from heart failure.

Key words: cardiomyocyte, cardiac differentiation, stem cells, tissue engineered constructions, optic mapping

For citation: Shcherbina SA, Shutko AV, Nizamieva AA, Nikitina AV, Slotvitsky MM, Tselaya VA, Agladze KI. Investigation of the formation of cardiac tissue on substrates of varying degrees of anisotropy and rigidity. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):365–374. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-036.

Received 11 May 2021; revised 25 June 2021; accepted 28 June 2021; published online 1 October 2021

Serafima A. Shcherbina – Master's Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4223-0133>

Angelina V. Shutko – Master, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1921-571X>

Aygul A. Nizamieva – Postgraduate Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7162-5214>

Anna V. Nikitina – Master, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6462-7027>

Mikhail M. Slotvitsky – Postgraduate Student, Engineer, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>

Valeria A. Tselaya – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular and Cell Diagnostics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 950 23 05. E-mail: v.tselaya@monikiweb.ru

Konstantin I. Agladze – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; Head of Laboratory of Molecular and Cell Diagnostics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

S.A. Shcherbina, preparation of the polydimethylsiloxane base for cell lines, management and differentiation of the induced pluripotent stem cells, optic mapping experiments, text writing; A.V. Shutko, design of the study, preparation of the substrates with various degrees of anisotropy, analysis and interpretation of the study results, text writing; A.A. Nizamieva, optic mapping experiments, analysis and interpretation of the study results, text writing and editing; A.V. Nikitina, preparation of the substrates with various degrees of anisotropy, immunocytochemical analysis, analysis of the results, text editing; M.M. Slotvitsky, design of the project, management and differentiation of the induced pluripotent stem cells, optic mapping experiments, analysis and interpretation of the study results, text writing; V.A. Tselaya, concept of the study, design of experimental part of the study, immunocytochemical analysis, analysis of the results, text writing and editing; K.I. Agladze, the study concept, the paper concept and design, text editing, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge all staff of the Laboratory of Biophysics of Excitable Systems (MIPT) for its assistance for the study and MONIKI for its financial support.

¹ Moscow Institute of Physics and Technology; 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, 140180, Russian Federation

² Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation



Оригинальная статья

Конечно-элементный анализ при моделировании структур сердца и аорты

Смирнов А.А.¹ • Овсепьян А.Л.² • Квиндт П.А.² • Палеев Ф.Н.^{3,4} • Борисова Е.В.³ • Яковлев Е.В.¹

Смирнов Александр Александрович – канд. мед. наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой фундаментальных медицинских дисциплин¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2661-3759>
✉ 197082, г. Санкт-Петербург, Лыжный пер., 8–1–366, Российская Федерация. Тел.: +7 (981) 761 07 47. E-mail: savmeda@yandex.ru

Овсепьян Артур Леонович – магистрант кафедры биотехнических систем²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4050-214X>

Квиндт Павел Александрович – магистрант кафедры биотехнических систем²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8867-6440>

Палеев Филипп Николаевич – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующий кафедрой терапии факультета усовершенствования врачей³; первый заместитель генерального директора, заместитель генерального директора по научной работе⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9481-9639>

Борисова Екатерина Викторовна – д-р мед. наук, ст. науч. сотр. отделения кардиологии³

Яковлев Евгений Васильевич – канд. мед. наук, доцент кафедры фундаментальных медицинских дисциплин¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8435-7562>

Актуальность. Трехмерное моделирование различных анатомических структур стало в последнее время самостоятельным направлением топографо-анатомических и биомеханических исследований *in vivo*. Существующие методы визуализации *in vivo* и количественного анализа *in silico* позволяют выполнять точное моделирование этих процессов с целью изучения патогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы, прогнозирования рисков, планирования хирургических вмешательств и виртуальной отработки их отдельных этапов.

Цель – разработка методов создания, анализа и валидации персонализированных моделей различных структур сердца и дуги аорты с учетом их морфологических особенностей.

Материал и методы. В ходе работы были использованы 14 компьютерно-томографических исследований рандомизированных больных, не имеющих аномалий и/или патологии сердца, аортального клапана и луковички аорты. Анализ и дальнейшие преобразования томограмм осуществляли с помощью программного обеспечения (ПО) Vidar DICOM Viewer, SolidWorks 2016, VMTKLab. Для FSI-моделирования дуги аорты по данным функциональной мульти-спиральной компьютерной томографической (МСКТ)-коронарографии (женщина, 55 лет) была создана персонализированная модель восходящего отдела аорты и дуги аорты в момент начала систолы. В ПО HyperMesh (Altair Engineering Inc., США) построена сетка конечных элементов проточной области, адвентиции и медики аорты. Для моделирования механических свойств структур аорты применена анизотропная гиперупругая модель материала Хольцапфеля – Гассера – Огдена. Моделирование материалов, постановку граничных условий и анализ взаимодействия жидкости и структуры (англ. fluid-structure interaction, FSI) проводили в ПО Abaqus CAE 6.14 (Simulia, Johnston, США). При создании конечно-элементного шаблона левого желудочка сердца использовали стратегию адаптивного мешинга изображения, предложенную Янгом. Реализация алгоритма выполнена в среде программной разработки IDE PyCharm на языке Python 3.7. Базисом для реализации алгоритма стали библиотеки с открытым исходным кодом (англ. open-source libraries) OpenCV, NumPy, Matplotlib и SciPy.

Результаты. Первым этапом разработки модели аортального клапана стало построение его виртуального 3D-шаблона, после чего была построена целостная геометрическая модель. Следующим этапом работы над шаблоном было преобразование геометрической модели аортального клапана в параметрическую, что было реализовано путем применения встроенного в SolidWorks инструмента «Уравнения». В ходе работы с моделью каких-либо проблем с геометрией при деформации не выявлено. Для моделирования сегмента аорты были использованы данные функциональной МСКТ-коронарографии. На основе этих данных с применением ПО Inobitex DICOM Viewer генерировалась мультипланарная реконструкция зоны интереса, включающая анатомические структуры сердца и дуги аорты. Из полученного набора контуров была создана трехмерная модель, которая затем конвертировалась в полигональную STL-модель (англ. stereolithography). Разработан алгоритм адаптивного мешинга для создания полигонального деформируемого шаблона, применимого для регистрации как сетчатыми методами (B-Spline), так и на основе особенностей изображения (гомологичные пиксели).

Заключение. Разработанная параметрическая 3D-модель анатомических структур аортального клапана способна адекватно изменять свою геометрию при внешних воздействиях и может быть использована в симуляторах эндоваскулярных кардиохирургических вмешательств.

Ключевые слова: левый желудочек сердца, аортальный клапан, аорта, гемодинамика, FSI-моделирование

Для цитирования: Смирнов АА, Овсепьян АЛ, Квиндт ПА, Палеев ФН, Борисова ЕВ, Яковлев ЕВ. Конечно-элементный анализ при моделировании структур сердца и аорты. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):375–384. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-043.

Поступила 23.09.2021; доработана 15.10.2021; принята к публикации 18.10.2021; опубликована онлайн 09.11.2021

¹ ГОУ ВО МО Московский государственный областной университет; 142400, Московская обл., г. Ногинск, ул. 3-го Интернационала, 117, Российская Федерация

² ФГАУ ВО «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»; 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5, Российская Федерация

³ ФБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России; 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а, Российская Федерация

Трехмерное моделирование различных анатомических структур стало в последнее время самостоятельным направлением топографо-анатомических и биомеханических исследований. Точное стереометрическое и физическое моделирование различных структур сердца и магистральных сосудов представляет значительный интерес для сердечно-сосудистой хирургии [1]. Взаимодействие потока крови с аортальным клапаном и стенками аорты – сложное динамическое событие, описываемое в механике как взаимодействие жидкости и деформируемого тела (англ. fluid-structure interaction, FSI). Существующие методы визуализации *in vivo* и количественного анализа *in silico* позволяют осуществлять моделирование этих процессов с целью изучения патогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы, прогнозирования рисков и планирования хирургических вмешательств [1]. Для численного физического моделирования взаимодействия системы «кровь – стенка сосуда» широко применяется метод FSI-анализа [2–4]. Он объединяет в себе методы вычислительной гидродинамики и структурного (динамического) анализа. Сегодня FSI широко применяют в прогнозировании рисков возникновения аневризм аорты и их разрывов. Ранее не проводилось попыток исследования изменений биомеханических свойств аорты при стенозе аортального клапана с применением персонализированного FSI-моделирования на основе данных мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ).

Цель – разработка методов создания, анализа и валидации персонализированных моделей различных структур сердца и дуги аорты с учетом их морфологических особенностей.

Материал и методы

В ходе работы были использованы предоставленные ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского данные 15 компьютерно-томографических исследований больных, не имеющих аномалий и/или патологии структур сердца и луковицы аорты. Их анализ и дальнейшие преобразования осуществляли с помощью программного обеспечения (ПО) Vidar DICOM Viewer, SolidWorks 2016, VMTKLab и других существующих видов ПО и библиотек.

Визуализация створок аортального клапана на основании данных компьютерной томографии (КТ) серьезно затруднена вследствие их незначительной толщины (<0,5 мм). По этой причине было выполнено построение виртуального 3D-шаблона аортального клапана с учетом параметров, приведенных в статье [5]. Виртуальный 3D-шаблон аортального клапана способен к дальнейшим преобразованиям на основе данных КТ каждого конкретного пациента, что позволяет создавать в каждом случае индивидуализированную параметрическую модель.

Подготовка компьютерной 3D-модели шаблона аортального клапана и макросов в SolidWorks API. Построение виртуального 3D-шаблона аортального клапана на первом этапе работы выполнялось на основании среднестатистических параметров, приведенных в статье [5]. В связи с тем что наиболее широкий участок аортального клапана находится на уровне синусов [5], форму внешней поверхности создаваемой модели наиболее точно можно описать как «луковицу». Средний диаметр устья аорты у взрослых составляет примерно $2,3 \pm 0,3$ см, а площадь клапанного отверстия – $4,6 \pm 1,1$ см² [6]. Построение шаблона было выполнено с применением ПО SolidWorks 2016.

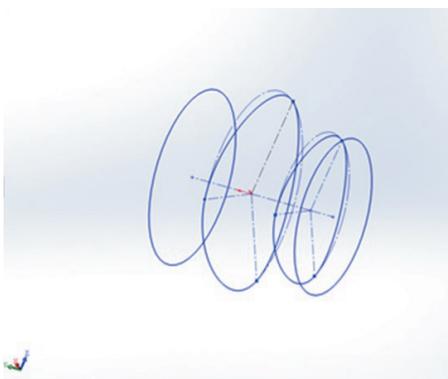


Рис. 1. Эскиз синусов Вальсальвы



Рис. 2. 3D-модель синусов Вальсальвы

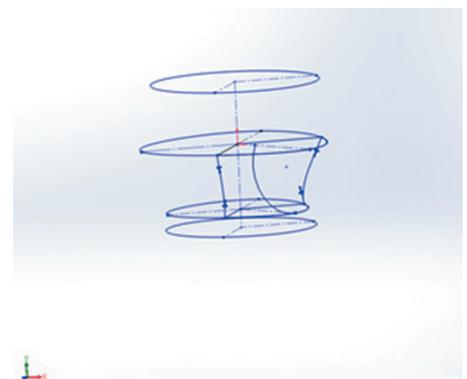


Рис. 3. Эскиз створок клапана

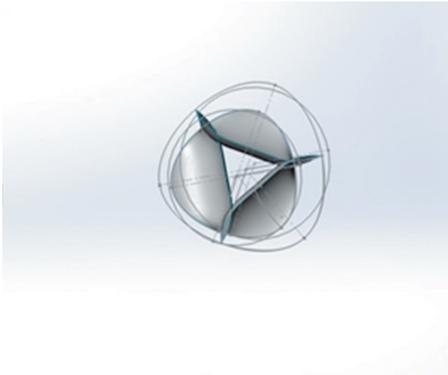


Рис. 4. Модель створок клапана



Рис. 5. 3D-модель аортального клапана

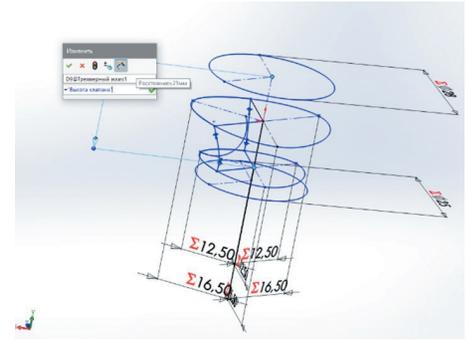


Рис. 6. Присвоение переменных элементам эскиза

Таким образом, по заданным параметрам был построен эскиз синусов Вальсальвы (рис. 1), а по этому эскизу, в свою очередь, построено виртуальное объемное тело (рис. 2).

Следующим этапом стало построение модели створок аортального клапана. Сначала был выполнен эскиз (рис. 3), а затем на его основе создано виртуальное объемное твердое тело. Впоследствии количество створок с помощью кругового массива было увеличено до трех относительно осевой линии клапана (рис. 4).

По завершении данного этапа объемные модели створок и синусов объединили для получения целостной геометрической 3D-модели аортального клапана (рис. 5).

После этого выполнили преобразование геометрической модели аортального клапана в параметрическую, что было реализовано путем применения встроенного в ПО SolidWorks инструмента «Уравнения». Сначала были заданы глобальные переменные, соответствующие входным значениям и параметрам, необходимым для последующей деформации: верхний диаметр, диаметр синусов, нижний диаметр и высота аортального клапана. Далее были присвоены переменные всем элементам эскиза, способным подвергаться деформации (рис. 6).

После завершения создания параметрического шаблона была выполнена тестовая деформация для проверки корректности его работы.

На заключительном этапе создания шаблона были заданы механические свойства структур, соответствующие средним значениям реального биологического объекта: модуль нормальной упругости для синусов Вальсальвы – 0,2 МПа, для створок аортального клапана – 20 МПа, коэффициент Пуассона для обеих структур – 0,4.

Таким образом, был построен виртуальный параметрический 3D-шаблон аортального клапана, способный изменять свою геометрию при внешних воздействиях. Доказана работоспособность параметрической модели, каких-либо проблем с геометрией при деформации не выявлено.

Моделирование аорты

При моделировании сегмента аорты в настоящем исследовании были использованы данные функциональной МСКТ-коронарографии, предоставленные ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. На их основе с применением ПО Inobites DICOM Viewer генерировалась мультипланарная реконструкция зоны интереса, включающая анатомические структуры сердца и дуги аорты. Из полученного набора контуров была создана трехмерная модель, которая затем конвертировалась в полигональную STL-модель (англ. stereolithography) (рис. 7).

Редактирование и реверс-инжиниринг STL-модели осуществляли с применением ПО SolidWorks. Средствами утилиты SW ScanTo3D были сгенерированы стенка и корень аорты. Итоговая CAD-модель зоны интереса включает в себя структуры аорты, фиброзное кольцо, створки, комиссуры и синусы Вальсальвы.

Предобработку CAD-модели для FSI-анализа проводили с применением ПО HyperMesh. Расчетную конечно-элементную сетку генерировали с учетом анатомических и морфологических особенностей стенки аорты.

Концепция адаптивного мешинга при построении модели левого желудочка сердца

При создании конечно-элементного шаблона левого желудочка сердца была использована

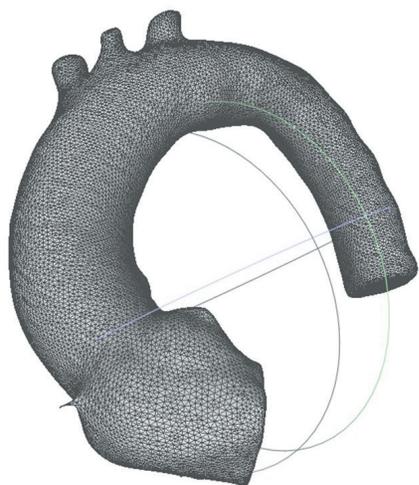


Рис. 7. STL-модель зоны интереса

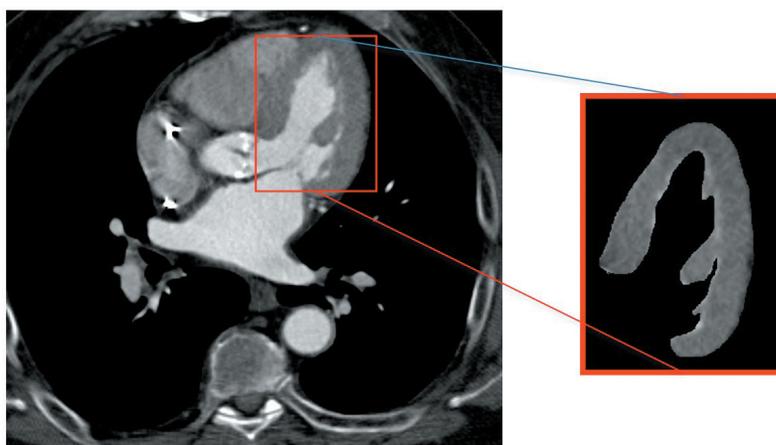


Рис. 8. Торакальное компьютерное томографическое изображение с ангиографией и выделенный левый желудочек



Рис. 9. Контур левого желудочка

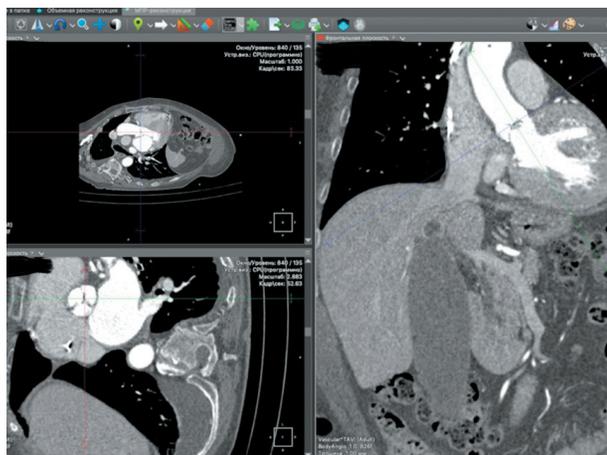


Рис. 10. Позиционирование зоны интереса



Рис. 11. Измерение диаметров аортального клапана

стратегия адаптивного мешинга изображения, предложенная Янгом. Реализация алгоритма выполнена в программной среде разработки IDE PyCharm с применением языка программирования Python 3.7. Базисом для реализации алгоритма стали библиотеки с открытым исходным кодом (англ. open-source libraries) OpenCV, NumPy, Matplotlib и SciPy.

На первом этапе построения эксперт выделял на томографическом изображении сегментируемый кластер (анатомическую структуру) (рис. 8). Для демонстрации алгоритма выполнена сегментация шаблона для левого желудочка из торакального КТ-изображения с ангиографией (анонимные исследования предоставлены ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России).

После завершения ручной сегментации выполняли определение границ выделенного фрагмента с помощью оператора Собеля – дискретного дифференциального оператора, вычисляющего приближенное значение градиента яркости изображения. Результатом применения этого оператора в каждой точке изображения стал вектор градиента яркости в этой точке.

Данный метод был реализован в программной среде разработки IDE PyCharm с применением языка программирования Python 3.7.

Алгоритмы обнаружения границ изображений при построении модели левого желудочка сердца. Принцип действия оператора Собеля основан на свертке изображения небольшими



Рис. 12. Измерение высоты аортального клапана



Рис. 13. Деформированная модель аортального клапана

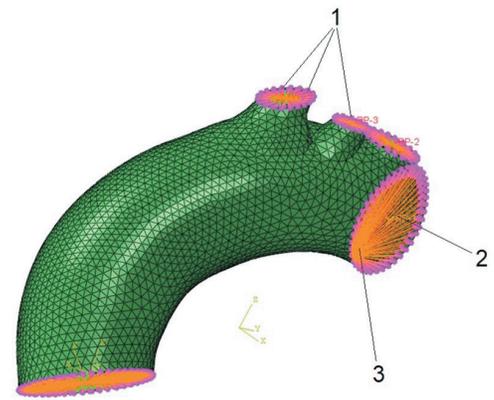


Рис. 14. Схема фиксированной геометрии модели дуги аорты: 1 – связанные элементы стенки аорты без ограничений степеней свободы, 2 – связи узлов с фиксированной геометрией и узлов без фиксации, 3 – узлы с фиксированной геометрией

сепарабельными целочисленными фильтрами в вертикальном и горизонтальном направлениях, поэтому его относительно легко вычислять. Вместе с тем используемая им аппроксимация градиента достаточно грубая. Оператор должен вычислять градиент яркости изображения в каждой точке, а также определять направление наибольшего увеличения яркости и величину ее изменения в этом направлении. Результат показывает, насколько «резко» или «плавно» меняется яркость изображения в каждой точке, а значит, вероятность нахождения точки на грани, а также ориентацию определяемой границы.

С математической точки зрения градиент функции двух переменных для каждой точки изображения представляет собой двумерный вектор, компонентами которого служат производные яркости изображения по горизонтали и вертикали. В каждой точке изображения градиентный вектор ориентирован в направлении наибольшего увеличения яркости, а его длина соответствует величине изменения яркости (рис. 9). Это означает, что результатом работы оператора Собеля в точке, лежащей в области постоянной яркости, будет нулевой вектор, а в точке, лежащей на границе областей различной яркости, – вектор, пересекающий границу в направлении увеличения яркости.

Адаптивный мешинг для создания конечно-элементного шаблона реализован в программной среде разработки IDE PyCharm с применением языка программирования Python 3.7. Дизеринг – метод сглаживания изображения, достигаемый его квантованием. Сглаживание осуществляется

с применением диффузии ошибки: алгоритм добавляет остаточную ошибку квантования из рассматриваемого пикселя на соседние. Алгоритм сканирует изображение в направлении слева направо, сверху вниз. Ошибка квантования передается соседним пикселям, не затрагивая пиксели, которые уже были квантованы.

Результаты

Реализация алгоритма построения модели аортального клапана

Данные КТ-исследования пациента с ангиографией загружали в ПО Inobitec DICOM Viewer, после чего с применением мультипланарной реконструкции выполняли правильное позиционирование зоны интереса для дальнейших измерений (рис. 10).

Далее с помощью инструмента «Линейное измерение» производили измерение линейных параметров области интереса: верхнего диаметра, диаметра синусов, нижнего диаметра (рис. 11) и высоты аортального клапана (рис. 12). Получены следующие результаты измерений линейных размеров аортального клапана:

- верхний диаметр – 29,88 мм;
- диаметр синусов – 34,75 мм;
- нижний диаметр – 26,58 мм;
- высота клапана – 22,99 мм.

После этого выполняли запуск макроса 1 в ПО SolidWorks и производили загрузку модели шаблона аортального клапана. Данные измерений фиксировали в таблице глобальных переменных. Таким образом, с помощью ПО осуществляли построение деформированной под заданные

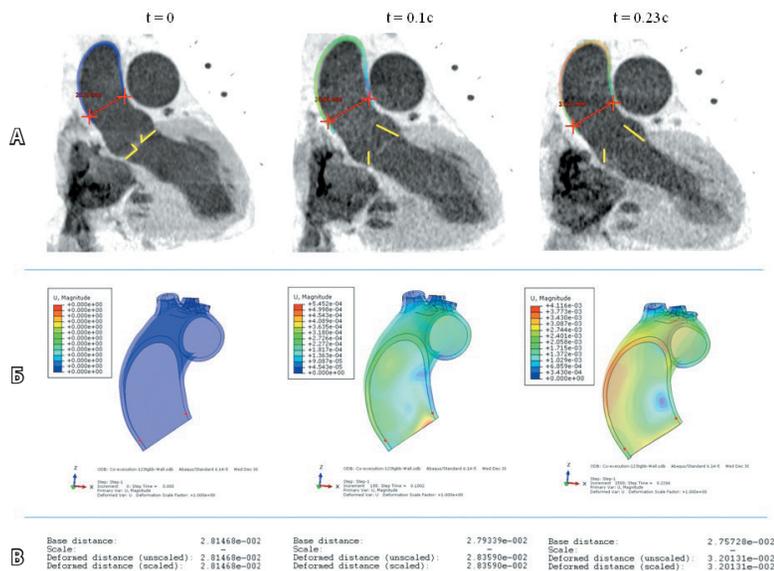


Рис. 15. А – данные мультиспиральной компьютерной томографии в разные моменты времени, Б – эпюры перемещений (в метрах) в соответствующий момент времени, В – числовые показатели деформации

значения измененных параметров 3D-модели аортального клапана (рис. 13).

Построение конечно-элементной модели дуги аорты для выполнения FSI-анализа

Полученную конечно-элементную модель импортировали в виде орфанной сетки в ПО Abaqus CAE. С помощью данного ПО были заданы механические свойства материалов и выполнена постановка граничных условий для биомеханического анализа модели. Для оптимизации вычислительной нагрузки были введены следующие граничные условия: модель зафиксирована (рис. 14) на входе (плоскость синотубулярного соединения аорты) и на выходе (в районе плечеголового ствола, левой общей сонной артерии и левой подключичной артерии) потока крови в 4 узлах, располагающихся в центрах вышеуказанных областей.

Каждый узел связан условием распределения континуума с элементами стенки аорты в плоскостях сечений на входе и выходе без ограничения степеней свободы связанных элементов. В области границы дуги и нисходящей части аорты модель зафиксирована в районе артериальной связи с условием распределения континуума с элементами стенки аорты в плоскости сечения без ограничения степеней свободы связанных элементов.

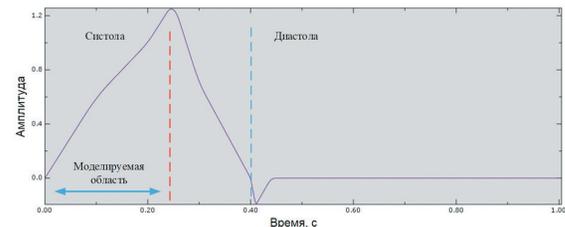


Рис. 16. График изменения скорости потока во время сердечного цикла. Моделируемая область – 0,23 секунды от начала до пика систолы

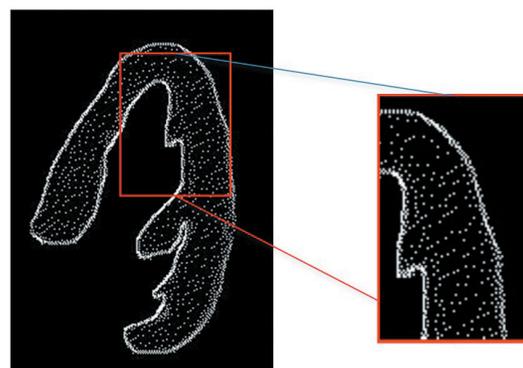


Рис. 17. Квантизация границ изображения левого желудочка сердца методом Флойда – Стейнберга

Для валидации построенной модели дуги аорты были получены и оценены эпюры перемещений, давления и напряжения по Мизесу для ее стенки. Описаны изменения характеристик потока крови в модели. Все начальные условия моделировали для систолы в момент времени $t=0$ в соответствии с данными МСКТ в тот же момент времени. FSI-анализ позволил предсказать поведение стенки аорты во время систолы длительностью 0,23 с. Результат предсказания (перемещения) сравнивали с МСКТ в моменты времени $t=0,1$ с и $t=0,23$ с, соответствующий пику систолы (рис. 15).

Поток крови задан как ламинарный, скорость потока в пике систолы $v=1,2$ м/с (рис. 16) [7], вход потока – вся площадь в плоскости синотубулярного соединения аорты, выход – районы плечеголового ствола, левой общей сонной артерии, левой подключичной артерии, а также граница дуги и нисходящей аорты (давление на выходе $P=0$).

Условие связи (FSI) между аортой и жидкостью определялось параметром Fluid-Structure Co-simulation boundary. Этот параметр описывает взаимодействие между модулем вычислительной гидродинамики (англ. computational fluid dynamics, CFD) и модулем неявного динамического анализа (англ. dynamic/implicit) Abaqus

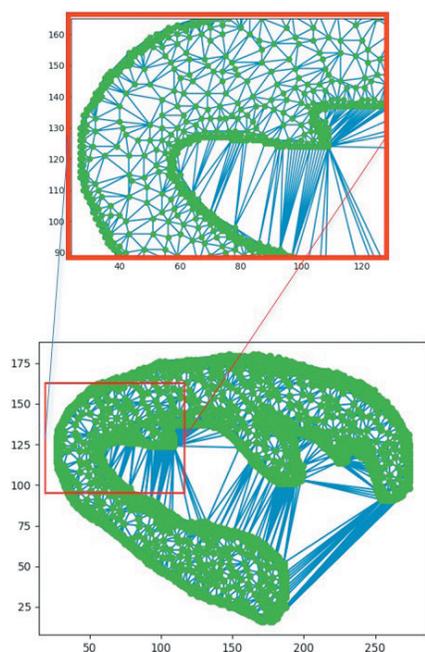


Рис. 18. FEM-шаблон левого желудочка

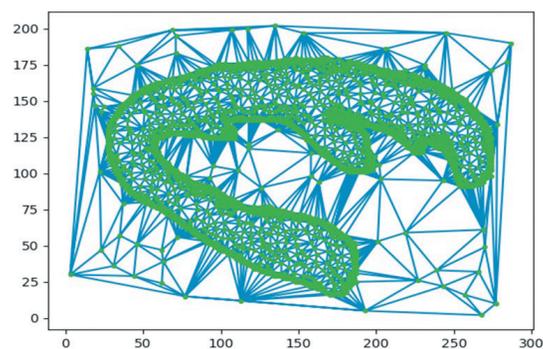


Рис. 19. Конечно-элементный шаблон со случайными дополнительными параметрами триангуляции

САЕ. Выбор модуля Dynamic/Implicit основан на гипотезе о малых деформациях в моделируемом сегменте, что исключает необходимость применения адаптивных сеток.

С целью постановки FSI-задачи было выполнено моделирование проточной области. Финальная сетка конечных элементов структур аорты состояла из 32 109 тетраэдрических элементов, для проточной области (крови) – 34 999 тетраэдрических элементов. Для моделирования анизотропных свойств структур аорты применяли анизотропную модель материала Хольцаффеля – Гассера – Огдена.

Квантизация границ изображения и триангуляция полученных данных при построении модели левого желудочка сердца

Для оптимального сглаживания подсчет ошибок квантования должен быть достаточно точным, чтобы исключить влияние ошибок округления на результат. Дизеринг сегмента КТ-изображения приведен на рис. 17. В предлагаемом нами алгоритме деформируемая модель представляет собой нежесткий конечно-элементный шаблон. Термин «нежесткий» в данном случае означает, что геометрические параметры связи между квантованными точками динамичны, однако сила, применяемая для одной точки, влияет на изображение глобально, гладко распространяясь на ближайшие.

Для создания связи в конечно-элементном шаблоне был использован алгоритм триангуляции

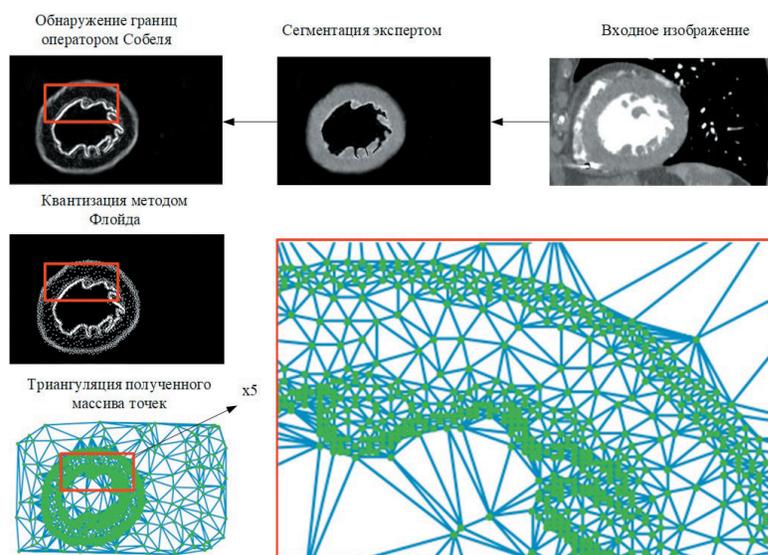


Рис. 20. Этапы работы алгоритма генерации конечно-элементного шаблона

Делоне, вершинами которой являются точки, полученные при помощи дизеринга, описанного выше. Реализация алгоритма триангуляции осуществлена в программной среде разработки IDE PyCharm на языке программирования Python 3.7 (рис. 18).

На рис. 18 (сверху) можно увидеть увеличенное количество симплексов (конечных элементов) на границе изображения. Для создания сетки по всей длине изображения вносили в массив квантованных точек случайные координаты, ограниченные размером изображения (рис. 19).

На рис. 20 продемонстрированы этапы работы алгоритма генерации шаблона на основе адаптивного мешинга. При этом эксперту необходимо вручную сегментировать интересующую область изображения (в данном случае – левый желудочек). На сегменте была выделена граница,



которая квантовалась и служила вершинами для конечно-элементной сетки.

Обсуждение

В ходе проделанной работы создана треугольная полигональная модель левого желудочка из сегментированных изображений. Продемонстрирован полный цикл создания конечно-элементной модели левого желудочка из набора томографических изображений с применением алгоритма автоматической сегментации изображений. Была разработана концепция графического модуля хирургических симуляционных станций, включающая комплекс инструментов для анализа и обработки медицинских изображений, позволяющих в полуавтоматическом режиме генерировать трехмерные модели анатомических зон. В базе концепции лежат алгоритмические решения для автоматической сегментации медицинских изображений и их дальнейшей обработки в целях интеграции в симуляционную среду. Обоснована математическая модель сегментации левого желудочка. Разработан алгоритм адаптивного мешинга для создания полигонального деформируемого шаблона, применимого для регистрации как сетчатыми методами (B-Spline), так и методами на основе особенностей изображения (гомологичные пиксели).

Математическое моделирование анатомических объектов представляет собой аналитическое описание идеализированных процессов и систем, адекватно отражающих реальные процессы и системы. Физическое моделирование основано на воспроизведении физических способами биологических структур, функций или процессов. Модель позволяет заменить изучение реального объекта исследованием характеристик его виртуальной копии, подобной реальному объекту. Анатомические трехмерные, параметрические, биомеханические и математические модели имеют важное самостоятельное значение как средство детального и всестороннего изучения анатомического объекта и, кроме того, представляют практически безграничные возможности в области моделирования различных типов патологий и создания трехмерного визуального контента для планирования технологии оперативного вмешательства и последующей отработки хирургических манипуляций, а также при создании и применении технологий дополненной реальности [8–11].

В данной статье мы описали основные принципы создания трехмерных физических моделей различных структур сердца и аорты. Важным преимуществом таких моделей перед обычными

трехмерными моделями видится возможность виртуального взаимодействия с ними. При этом закономерности изменения рассматриваемых моделей в ответ на внешнее воздействие соответствуют изменениям реальных анатомических объектов в рамках моделируемых явлений и перемещений. Точность и адекватность подобного моделирования базируется на применяемых математических принципах – конечно-элементный анализ, стратегия адаптивного мешинга и др., а также на применении современных ПО, обеспечивающих скорость и точность расчетов и визуализацию.

Сегодня создание искусственных сред и качественное анатомическое математическое моделирование для хирургических нужд позволяет пользователю взаимодействовать с любым виртуальным объектом таким образом, как если бы он выполнял аналогичные действия в реальном мире. Хирургические симуляторы приобретают все большую популярность, поскольку компьютеры продолжают демонстрировать экспоненциальный рост своих возможностей [12–14]. Учитывая вышесказанное, последствия этого роста можно спроецировать на хирургическое обучение, где реалистичные сценарии позволят оператору отрабатывать такие хирургические манипуляции, как разрезы, наложение швов, клипирование и многое другое. Кроме того, уже сейчас есть возможность отрабатывать с применением мультимедийного контента отдельные этапы операций или даже полностью выполнять оперативное вмешательство [11]. Повышение когнитивных навыков обучаемых и знакомство с роботизированными инструментами, очевидно, повысят безопасность пациентов, если предположить, что виртуальное моделирование процесса близко к реальному [14].

Заключение

Разработанная параметрическая 3D-модель анатомических структур аортального клапана способна адекватно изменять свою геометрию при внешних воздействиях, что позволяет ее использовать в виртуальных симуляторах эндоваскулярных кардиохирургических вмешательств. Преимуществом данного подхода видится значительное снижение стоимости подготовки специалистов в этой области.

С помощью конечно-элементных моделей дуги аорты и левого желудочка сердца можно осуществлять прогнозирование геометрических деформаций аорты на основе FSI-моделирования. Данные модели позволяют выполнять моделирование



различных патологических процессов в сердце и аорте, а также прогнозировать возможные исходы хирургических вмешательств. Результаты

моделирования с использованием предложенных методов не противоречат полученным ранее данным *in silico*. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.А. Смирнов – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание первичного кода, создание конечно-элементных моделей, статистическая обработка, написание текста;

А.Л. Овсепьян – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание первичного кода, создание конечно-элементных моделей, написание текста; П.А. Квиндт – сбор и обработка материала, написание первичного кода, создание конечно-элементных моделей; Ф.Н. Палеев – анализ клинических данных, написание и редактирование текста; Е.В. Борисова – сбор и обработка материала, анализ клинических данных, редактирование текста; Е.В. Яковлев – сбор и обработка материала. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

- Гейдаров НА, Гайнуллова КС, Дрыгина ОС. Компьютерные методы моделирования течения крови в задачах кардиологии и кардиохирургии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018;7(2):129–136. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-129-136. [Geydarov NA, Gainullova KS, Drygina OS. [Computational blood flow simulations in cardiology and cardiac surgery]. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2018;7(2):129–136. Russian. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-129-136.]
- Bahraseman HG, Languri EM, Yahyapourjalaly N, Espino DM. Fluid-structure interaction modeling of aortic valve stenosis at different heart rates. Acta Bioeng Biomech. 2016;18(3):11–20.
- Mao W, Caballero A, McKay R, Primiano C, Sun W. Fully-coupled fluid-structure interaction simulation of the aortic and mitral valves in a realistic 3D left ventricle model. PLoS One. 2017;12(9):e0184729. doi: 10.1371/journal.pone.0184729.
- Gilmanov A, Barker A, Stolarski H, Sotiropoulos F. Image-guided fluid-structure interaction simulation of transvalvular hemodynamics: Quantifying the effects of varying aortic valve leaflet thickness. Fluids. 2019;4(3):119. doi: 10.3390/fluids4030119.
- Kunzelman KS, Grande KJ, David TE, Cochran RP, Verrier ED. Aortic root and valve relationships. Impact on surgical repair. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994;107(1):162–170.
- Шихвердиев НН, Марченко СП. Основы реконструктивной хирургии клапанов сердца. СПб.: Дитон; 2007. 340 с. [Shikhverdiev NN, Marchenko SP. [Basics of the heart valve reconstructive surgery]. Saint Petersburg: Diton; 2007. 340 p. Russian.]
- Spühler JH, Jansson J, Jansson N, Hoffman J. 3D Fluid-Structure Interaction Simulation of Aortic Valves Using a Unified Continuum ALE FEM Model. Front Physiol. 2018;9:363. doi: 10.3389/fphys.2018.00363.
- Колсанов АВ, Манукян АА, Зельтер ПМ, Чаплыгин СС, Капишников АВ. Виртуальное моделирование операции на печени на основе данных компьютерной томографии. Анналы хирургической гепатологии. 2016;21(4):16–22. doi: 10.16931/1995-5464.2016416-22. [Kolsanov AV, Manukyan AA, Zelter PM, Chaplygin SS, Kapishnikov AV. [Preoperative Virtual Modeling of Liver Based on Computerized Tomography Data]. Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB Surgery. 2016;21(4):16–22. Russian. doi: 10.16931/1995-5464.2016416-22.]
- Колсанов АВ, Мякотных МН, Миронов АА, Канаев ЕИ. 3D-анатомия конfluence воротной вены по данным компьютерной томографии. Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2020;4(1):9–18. doi: 10.17116/operhirurg202040119. [Kolsanov AV, Myakotnykh MN, Mironov AA, Kanaev EI. [3D anatomy of portal vein confluence according to computer tomography]. Russian Journal of Operative Surgery and Clinical Anatomy. 2020;4(1):9–18. Russian. doi: 10.17116/operhirurg202040119.]
- Колсанов АВ, Зельтер ПМ, Хобта РВ, Чаплыгин СС, Манукян АА. Первые результаты применения интраоперационной навигации на основе данных КТ и МРТ у пациента с опухолью межжелудочковой перегородки. Российский электронный журнал лучевой диагностики. 2020;10(4):271–276. doi: 10.21569/2222-7415-2020-10-4-271-276. [Kolsanov AV, Zelter PM, Hobta RV, Chaplygin SS, Manukyan AA. [First results of intraoperative navigation based on CT and MRI data in a patient with a septum pellucidum tumor]. Russian Electronic Journal of Radiology. 2020;10(4):271–276. Russian. doi: 10.21569/2222-7415-2020-10-4-271-276.]
- Ovsepian AL, Kvindt PA, Pustozero EA. Development of the Software Complex for Planning and Simulation of Robot-Assisted Radical Prostatectomy. 2018 Third International Conference on Human Factors in Complex Technical Systems and Environments (ERGO) [Internet]. IEEE. 2018. doi: 10.1109/ERGO.2018.8443860.
- Колсанов АВ, Воронин АС. Программа для отработки алгоритма выполнения хирургических операций «Виртуальный хирург». Свид. о регистрации программы для ЭВМ RU 2019619242 от 15.07.2019. [Kolsanov AV, Voronin AS. Program for elaboration of the algorithm for surgical procedures "A virtual surgeon". Registration cert. for the software RU 2019619242, 15 July 2019.]
- Колсанов АВ, Линева ОИ, Иванова ВД. Разработка и внедрение российских симуляционных и виртуальных технологий в современный образовательный процесс. Акушерство и гинекология. 2016;7(7):83–87. doi: 10.18565/aig.2016.7.83-87. [Kolsanov AV, Lineva OI, Ivanova VD. [Development and introduction of Russian simulation and virtual technologies into the current educational process]. Obstetrics and Gynecology. 2016;7(7):83–87. Russian. doi: 10.18565/aig.2016.7.83-87.]
- Ovsepian A, Smirnov A, Dydykin S, Vasil'ev Yu, Trunin E, Shatunova O, Aleksandrov A, Ostyakova A, Utkin A. Personalized FSI-modeling of the aortic bulb and arch to predict its mechanical behavior and assess the loads during the cardiac cycle. Archiv Euromedica. 2021;11(2):13–16. doi: 10.35630/2199-885X/2021/11/2/3.



Finite element analysis in the modeling of the heart and aorta structures

A.A. Smirnov¹ • A.L. Ovsepyan² • P.A. Kvindt² • F.N. Paleev^{3,4} • E.V. Borisova³ • E.V. Yakovlev¹

Rationale: 3D modeling of various anatomical structures has recently become a separate area of topographical, anatomical, and biomechanical studies. Current *in vivo* visualization methods and quantitative analysis *in silico* allow to perform the precise modeling of these processes aimed at investigation into the pathophysiology of cardiovascular disorders, risk prediction, planning of surgical interventions and virtual refinement of their separate stages.

Aim: To develop tools for elaboration, analysis and validation of personalized models of various structures of the heart and aortal arch taking into account their morphological characteristics.

Materials and methods: We used the results of 14 computed tomography studies from randomized patients without any disease or anomaly of the heart, aortic valve and aortal bulb. The analysis and subsequent transformation of the images were done with Vidar DICOM Viewer, SolidWorks 2016, VMTKLab software. For the FSI modeling of the aortic arch based on the results of functional multiplanar computed (MAC) coronarography (a female patient of 55 years) we developed a personalized model of the ascending aorta and aortic arch at the beginning of the systole. Using HyperMesh software (Altair Engineering Inc., USA) we have built a network of finite element of the luminal area, adventitia, and aortic media. To model mechanical properties of the aortic structures we used an anisotropic hyperelastic material model by Holzapfel – Gasser – Ogden. Material modeling, choice of the limiting antecedents, and analysis of fluid-structure interaction were performed with Abaqus CAE 6.14 software (Simulia, Johnston, USA). Adaptive image meshing by Young was used to elaborate the finite element template of the left ventricle. The algorithm was realized within the IDE PyCharm software media in Python 3.7. The algorithm was realized based on the open-source libraries OpenCV, NumPy, Matplotlib, and SciPy.

Results: The first stage of the development of the aortic valve model included the design of its virtual 3D template. Thereafter, a cohesive geometric model was elaborated. Subsequent stage of the work included the transformation of the aortic valve geometric model into the parametric one. This was done through the use of the “Equations” tool within the SolidWorks. No problems with geometry of the model during its deformation were identified. Aortic segment modeling was based on the data obtained by functional MAC coronarography. Based on this and on Inobitec Dicom Viewer software, we generated a multiplane reconstruction of the zone of interest including anatomical structure of the heart and aortic valve. With the resulting set of contours, we created a 3D model, which then was converted into a polygonal stereolithographic model.

We developed an algorithm for adaptive meshing to elaborate a polygonal template capable of deformation that can be used for registration both with the net methods (B-Spline) and based on the image characteristics (homologous pixels).

Conclusion: The resulting parametric 3D model of the aortic valve anatomical structures is capable of adequate transformation of its geometry under external factors. It can be used in simulators of endovascular cardiosurgical procedures.

Key words: left ventricle of the heart, aortic valve, aorta, hemodynamics, FSI modeling

For citation: Smirnov AA, Ovsepyan AL, Kvindt PA, Paleev FN, Borisova EV, Yakovlev EV. Finite element analysis in the modeling of the heart and aorta structures. Almanac of Clinical Medicine. 2021;49(6):375–384. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-043.

Received 23 September 2021; revised 15 October 2021; accepted 18 October 2021; published online 9 November 2021

Alexander A. Smirnov – MD, PhD, Associate Professor, Acting Manager of Chair of Fundamental Medical Sciences¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2661-3759>

✉ 8–1–366 Lyzhnyy per., Saint Petersburg, 197082, Russian Federation. Tel.: +7 (981) 761 07 47. E-mail: savmeda@yandex.ru

Artur L. Ovsepyan – Graduate Student, Chair of Bioengineering Systems²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4050-214X>

Pavel A. Kvindt – Graduate Student, Chair of Bioengineering Systems²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8867-6440>

Filipp N. Paleev – MD, PhD, Professor, Correspondent Member of Russian Academy of Sciences, Head of Chair of Therapy, Postgraduate Training Faculty³; First Deputy General Director for Science⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9481-9639>

Ekaterina V. Borisova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Cardiology³

Evgeny V. Yakovlev – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Fundamental Medical Sciences¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8435-7562>

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

A.A. Smirnov, the study concept and design, data collection and management, writing of the primary code, elaboration of the finite element models, statistical analysis, text writing; A.L. Ovsepyan, the study concept and design, data collection and management, writing of the primary code, elaboration of the finite element models, text writing; P.A. Kvindt, data collection and management, writing of the primary code, elaboration of the finite element models; F.N. Paleev, text writing and editing; E.V. Borisova, data collection and management, clinical data analysis, text editing; E.V. Yakovlev, data collection and management. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

¹ Moscow Region State University; 117 3-go Internatsionala ul., Noginsk, Moscow Region, 142400, Russian Federation

² Saint Petersburg Electrotechnical University; 5 Professora Popova ul., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation

³ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

⁴ National Medical Research Cardiology Center; 15a 3-ya Cherepkovskaya ul., Moscow, 121552, Russian Federation



Оригинальная статья

Эффективность программируемых нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в геномных локусах safe harbor клеток линии HEK293

Павлова С.В.¹ • Елисафенко Е.А.¹ • Шаяхметова Л.Ш.^{1,2} • Медведев С.П.¹

Павлова Софья Викторовна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории эпигенетики развития¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

✉ 630090, г. Новосибирск, ул. Мальцева, 1–16, Российская Федерация. Тел.: +7 (913) 903 13 62. E-mail: sonpavlova@gmail.com

Елисафенко Евгений Анатольевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории эпигенетики развития¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3204-8178>. E-mail: antares@bionet.nsc.ru

Шаяхметова Лилия Шагитовна – лаборант научно-образовательного отдела¹; бакалавр²

Медведев Сергей Петрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории эпигенетики развития¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

Актуальность. Создание инструментов редактирования генома эукариот на основе программируемых нуклеаз бактерий из систем CRISPR-Cas открывает обширные перспективы для разработки методов генной терапии, точных моделей заболеваний человека, а также изучения проявлений патологического фенотипа, наблюдения за клеточными процессами. От точности внесения двуцепочечных разрывов в целевые участки ДНК зависят безопасность и корректность экспериментов как на клеточном, так и организменном уровнях. Поиск новых вариантов более точных нуклеаз CRISPR-Cas и изучения их способности гидролизовать ДНК в составе нуклеосом *in vivo* представляется актуальной задачей развития технологий геномного редактирования.

Цель – провести анализ активности программируемой нуклеазы AsCpf1 (Cas12a), обладающей низким уровнем нецелевой активности, в локусах генома человека, безопасных для внесения трансгенных конструкций (safe harbor), и сравнить с эффективностью широко применяемой нуклеазы SpCas9 в клетках линии HEK293.

Материал и методы. Выполнен биоинформационный анализ ассоциации целевых районов с нуклеосомами и другими белками в safe harbor локусах AAVS1 и GSH-Ch1 и транскрипционно неактивном гене MYBPC3 кардиального миозинсвязывающего белка 3 в клетках линии HEK293FT на основе данных, полученных методом ATAC-seq базы NCBI SRA для хроматина клеток линии HEK293FT. Проведено создание и внесение плазмидных конструкций, кодирующих нуклеазы SpCas9 и AsCpf1 и направляющих РНК в клетки HEK293FT. Осуществлен анализ событий в целевых районах генома клеток линии HEK293FT методом изучения секвеннограмм с помощью алгоритма TIDE.

Результаты. Изучение данных экспериментов ATAC-seq для клеток HEK293FT показало, что локус AAVS1 можно отнести к открытому хроматину с низкой плотностью нуклеосом, а локус GSH-Ch1 – к закрытому хроматину. В клетках HEK293FT ген кардиального белка MyBPC3 имеет промежуточные характеристики хроматина. Проведенное исследование эффективности внесения разрывов в изучаемые локусы хроматина клеток HEK293FT нуклеазами выявило, что SpCas9 справляется с хроматином любой плотности нуклеосом, тогда как AsCpf1 эффективно вносит разрывы в ДНК только в локусах с открытым хроматином – AAVS1 и MYBPC3. В локусе GSH-Ch1 с высокой плотностью нуклеосом события редактирования происходят на очень низком уровне.

Заключение. Показана низкая эффективность нуклеазы AsCpf1 в геномном safe harbor локусе GSH-Ch1, который характеризуется высокой плотностью нуклеосом. При планировании эксперимента по геномному редактированию с помощью нуклеазы AsCpf1 следует учитывать эпигенетический ландшафт хроматина и плотность нуклеосом, а также использовать вещества, влияющие на структуру хроматина.

Ключевые слова: редактирование геномов, CRISPR-Cas нуклеазы SpCas9 и AsCpf1, направляющая РНК, нуклеосомы, открытый хроматин

Для цитирования: Павлова СВ, Елисафенко ЕА, Шаяхметова ЛШ, Медведев СП. Эффективность программируемых нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в геномных локусах safe harbor клеток линии HEK293. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):385–395. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-037.

Поступила 29.06.2021; принята к публикации 28.07.2021; опубликована онлайн 15.09.2021

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10, Российская Федерация

²ФГАУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1, Российская Федерация

С появлением эффективных методов редактирования нуклеотидных последовательностей такое направление биомедицины, как исследование функций генов и однонуклеотидных полиморфизмов при нормальной жизнедеятельности клетки и при патологиях, получило активное развитие [1, 2]. В 2007 г. у бактерий и архей была открыта система адаптивной защиты от вирусов и чужеродных молекул ДНК [3]. Геномы прокариот содержат элементы, состоящие из коротких прямых повторов ДНК, между которыми закодированы фрагменты бактериофагов или плазмид. Данные элементы были определены как короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR). Повторы CRISPR входят в функциональную единицу бактериального генома и содержат

гены Cas (CRISPR associated), кодирующие белки, необходимые для разрезания ДНК [4, 5]. При попадании «знакомого» вируса в бактерию происходит синтез РНК (англ. crRNA, CRISPR RNA) по матрице ДНК из «коллекции» вирусных фрагментов, закодированных в районе CRISPR, и crRNA адресно (по принципу комплементарности между crRNA и участком ДНК в геноме вируса) направляет нуклеазы Cas для уничтожения вирусной ДНК. Наличие элементов CRISPR в геномах различных бактерий говорит об эволюционно-консервативном принципе РНК-опосредованной деградации инвазивных ДНК, однако механизмы функционирования иммунитета могут иметь различия. Например, если для деградации инвазивных ДНК необходимо несколько белков Cas, система CRISPR-Cas относится к 1-му классу (подразделяется на I, III и IV типы), а если эту функцию выполняет один белок – ко 2-му (II, V и VI типы) [6]. Имеются также различия в механизмах формирования направляющих crRNA для нуклеаз Cas у разных бактерий. В системе CRISPR-Cas9 бактерий *Streptococcus pyogenes* (класс 2, тип II) специфическая направляющая crRNA взаимодействует с tracrPНК (trans-activating crRNA), а в инвазивном геноме, в месте узнавания (протоспейсер, комплементарный crRNA), должен присутствовать смежный мотив ДНК PAM (Protospacer Adjacent Motif) с консенсусом 5'-NGG-3' [7, 8] (рис. 1А). Именно система CRISPR-Cas9 бактерий *S. pyogenes* послужила основой для создания в 2012 г. инструментов редактирования геномов эукариот – были добавлены сигналы ядерной локализации в белок SpCas9 (*S. pyogenes* Cas9), проведена оптимизация кодонов гена *SpCas9* для экспрессии в эукариотических клетках, а tracrRNA и crRNA для удобства были объединены в одну молекулу РНК – single guide RNA (sgRNA) [1, 2].

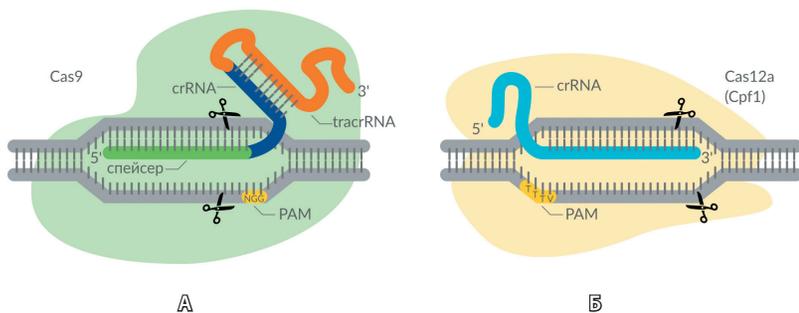


Рис. 1. Схема строения комплекса SpCas9:sgRNA (А) и AsCpf1:crRNA (Б) в целевом районе ДНК, содержащем протоспейсер и PAM (мотив, смежный с протоспейсером)

Таблица 1. Позиции протоспейсеров целевых районов и векторов для экспрессии нуклеаз sgRNA и CRISPR-Cas

Локус; нуклеаза	Позиция протоспейсера, сборка генома GRCh38/hg38	Вектор
AAVS1; Cas9	5'GTCACCAATCCTGTCCCTAGTGG-TGG-3' PAM chr19:55115745-55115764;	PX458 Addgene #48138
AAVS1; Cpf1	PAM5'TTTC-GTCACCAATCCTGTCCCTAG3' chr19:55115744-55115764;	pAsCpf1(TTVV)-2NLS *Addgene 69982/#89352
GSH-Ch1; Cas9	5'TATTATAATAGAAGTGCCTG-AGG-3' PAM chr1:189847623-189847642;	PX458 Addgene #48138
GSH-Ch1; Cpf1	PAM5'TTTA-TACAGTTGCCTTACAAGACA3' chr1:189847581-189847601; -	pAsCpf1(TTVV)-2NLS *Addgene 69982/#89352
MYBPC3; Cas9	5'ACACCACCTGATCATCAACG-AGG-3' PAM chr11:47342656-47342675	PX458 Addgene #48138
MYBPC3; Cpf1	PAM 5'TTCA-AGAAGGACGGCAGAGACACC chr11:47342671-47342691;	pAsCpf1(TYCV)(BB) Addgene #89352

*Addgene 69982 – прототип плазмиды pAsCpf1(TTVV)-2NLS, куда был добавлен мотив 2NLS из плазмиды Addgene #89352

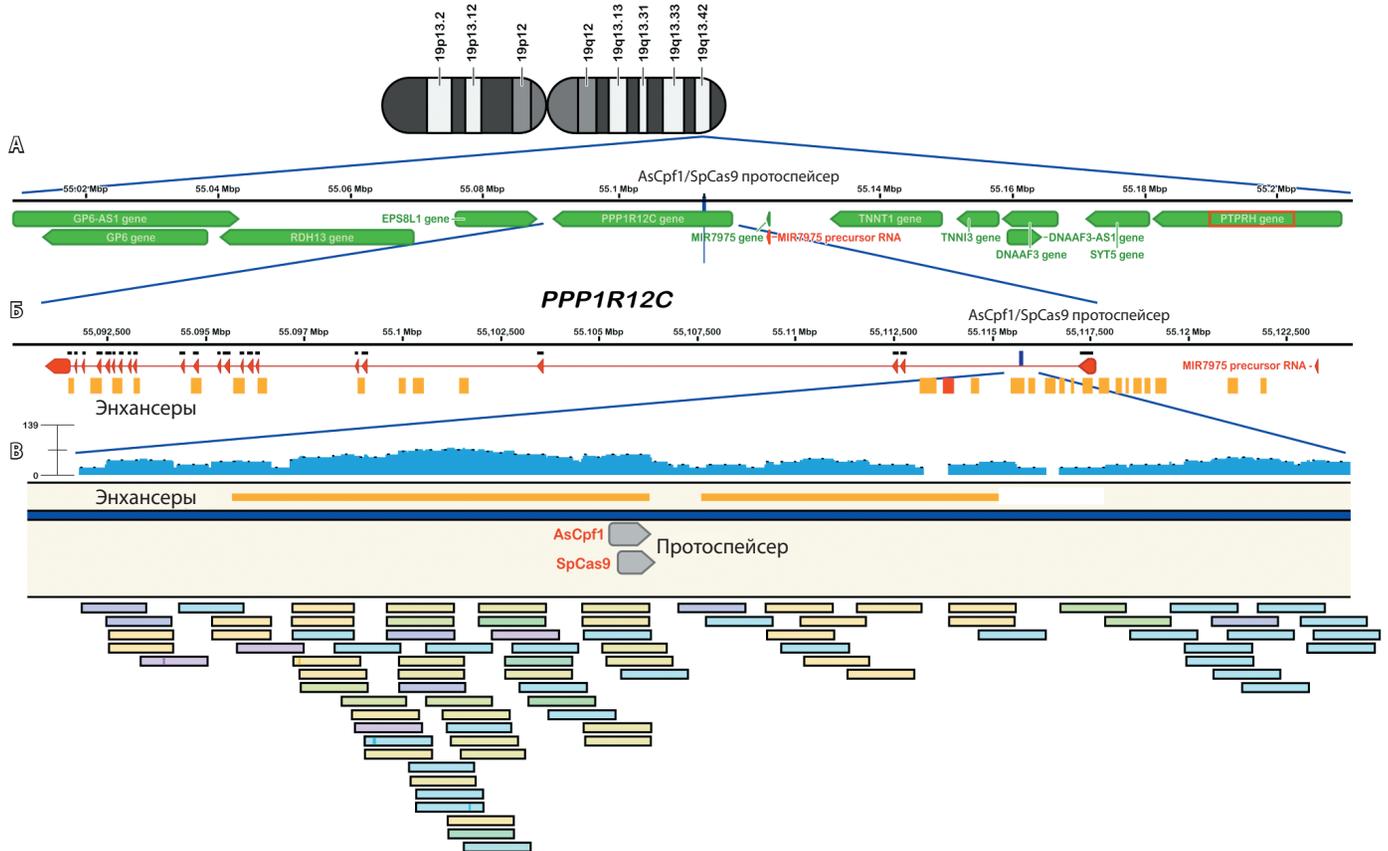


Рис. 2. Схема локуса AAVS1 человека, локализованного на 19-й хромосоме (позиция 19q13.42, идеограмма 19-й хромосомы). Ниже расположена схема района (200 т.п.о.), содержащего сайт интеграции аденоассоциированных вирусов (позиция протоспейсера для нуклеаз AsCpf1 и SpCas9). Гены изображены зелеными стрелками, отражающими направление транскрипции (**А**). Экзон-интронная структура гена *PPP1R12C* представлена на **Б**. Позиция протоспейсера в интроне 1 отмечена синим столбиком, экзоны – красные треугольники. Энхансеры обозначены желтыми прямоугольниками, потенциальный промотор – красный прямоугольник. Пример картирования прочтений фрагментов ДНК эксперимента ATAC-seq для клеток HEK293FT (SRR9602331, см. раздел «Материал и методы») показан на **В**. Голубым цветом обозначена плотность прочтений (диапазон представлен числом прочтений, картированных на референсную последовательность локуса AAVS1, – от 1 до 139). Серые стрелки – позиции протоспейсера AsCpf1 и SpCas9, прямоугольники – последовательности ДНК данного района, свободные от белков и выявляемые методом ATAC-seq

более точная и имеет более низкий уровень нецелевой активности по сравнению с Cas9 [10–12]. Нуклеаза AsCpf1 использует одну короткую направляющую РНК (около 40 нуклеотидов длиной), а также Т-богатый PAM с консенсусом 5'-TTTV-3' (V = A, G или C). Поскольку в геномах большинства организмов данное сочетание нуклеотидов встречается с низкой частотой, были созданы мутантные формы AsCpf1, узнающие консенсусы PAM 5'-TUCV-3' и 5'-TATV-3'. Для трех форм AsCpf1 частота встречаемости возможных мишеней в кодирующей части генома человека составляет 1 сайт на 11 пар нуклеотидов [13]. При гидролизе нуклеазой AsCpf1 образуются выступающие «липкие» концы ДНК, а сам разрез располагается в отдалении от PAM (рис. 1Б). В совокупности это делает систему CRISPR-Cpf1 крайне привлекательным инструментом редактирования геномов,

в частности для создания изогенных клеточных моделей наследственных заболеваний.

Для разработки методов генной терапии, создания клеточных моделей заболеваний человека и изучения проявлений патологического фенотипа на молекулярном уровне часто возникает необходимость проведения модификации генома вставками функциональных трансгенов или генетических элементов. Генную терапию на основе ретро- и аденовирусных векторов ранее применяли для лечения некоторых болезней, связанных с метаболическими или гематологическими нарушениями [14–16]. Однако при использовании ретро- и лентивирусных векторов происходит неконтролируемая интеграция вирусов в случайные места генома, что может приводить к инсерционному мутагенезу. Открытие систем редактирования CRISPR-Cas позволяет использовать определенные

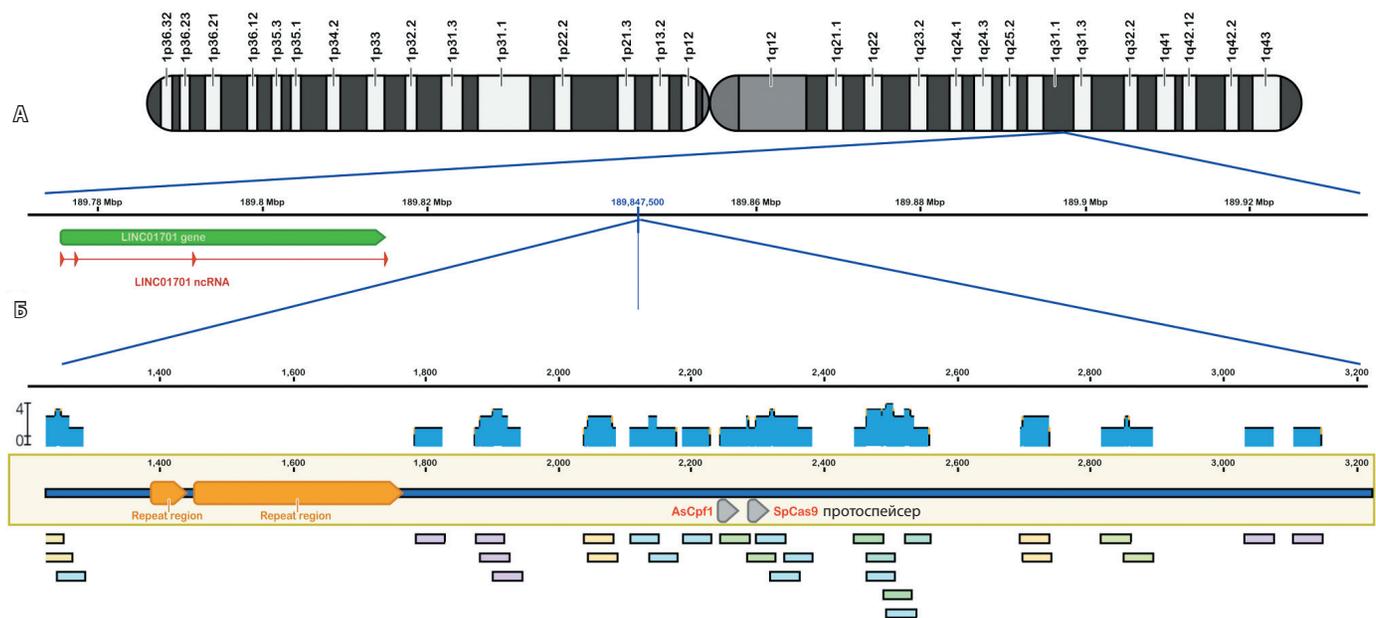


Рис. 3. Схема локуса GSH-Ch1 человека, локализованного на 1-й хромосоме (позиция 1q31.1, идеограмма 1-й хромосомы). Ниже расположена схема района (200 т.п.о.), позиция протоспейсеров для нуклеаз AsCpf1 и SpCas9 отмечена синим столбиком. Зеленой стрелкой обозначен ген длинной некодирующей РНК *LINC01701* (А). Пример картирования прочтений фрагментов ДНК эксперимента ATAC-seq для клеток HEK293FT (SRR9602331, см. раздел «Материал и методы») дан на Б. Голубым цветом обозначена плотность прочтений (число прочтений, картированных на референсную последовательность локуса GSH-Ch1, – от 1 до 4). Серые стрелки – позиции протоспейсеров AsCpf1 и SpCas9, прямоугольники – последовательности ДНК данного района, свободные от белков и выявляемые методом ATAC-seq. Повторы ДНК представлены желтыми прямоугольниками

Таблица 2. Праймеры для амплификации целевых районов ДНК с целью анализа нуклеазной активности SpCas9 и AsCpf1

Название праймера	Структура праймера	Температура отжига праймера; размер ПЦР продукта	Целевой район амплификации ДНК
AAVS1_WT-F AAVS1_WT-R	5'CTCTGGCTCCATCGTAAGCAA3' 5'CCCAAAGTACCCCGTCTCCC3'	58С 555 п.о.	Локус AAVS1
1Chr-SHL-T-F 1Chr-SHL-T-R	5'GGTAGTGACAGAGCTAACATG3' 5'GTCTAACTATGACAGTGCTGCC3'	58С 490 п.о.	Локус SH-Chr1
MYBPC3-LD-F MYBPC3-R	5'CAAATGGTGAGTCCAGAAGC3' 5'GAGATGAGAAGGATGAGGTTTAGG3'	58С 405 п.о.	Ген <i>MYBPC3</i>

ПЦР – полимеразная цепная реакция

места генома, где взаимное влияние внесенных генетических конструкций и хозяйского генома минимально, – так называемые genome safe harbor (GSH) локусы. Наиболее популярное место для интеграции трансгенов в геном человека – локус AAVS1 (adeno-associated virus integration site 1) на 19-й хромосоме (19q13.42), в первом интроне гена *PPP1R12C* (protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C), который кодирует белок, регулирующий активность фосфатазы 1δ [17] (рис. 2А).

Локус AAVS1 был выявлен экспериментально при анализе сайтов интеграции аденоассоциированных вирусов в ДНК клеток человека *in vitro*. Примечательно, что нарушение одного или двух

аллелей этого гена не приводит к отклонениям ни на уровне культуры клеток, ни на уровне целого организма, хотя *PPP1R12C* экспрессируется во всех тканях [17]. Тем не менее следует учитывать, что данный район 19-й хромосомы не может быть безопасным локусом safe harbor, так как обогащен кодирующими генами, в том числе там находится ген *PTPRH* (protein tyrosine phosphatase receptor type H), мутации в котором ассоциированы с раком печени (см. рис. 2А), и внесение чужеродных генетических элементов в данный локус потенциально может приводить к непредсказуемым событиям. Были сформулированы критерии для «идеальных» GSH-локусов: расстояние >50 т.п.о.



Таблица 3. Покрытие прочтений ДНК в целевых районах генома клеток HEK293, выявляемых в экспериментах ATAC-seq, в процентном соотношении от данных референсного гена *ACTB*

ATAC-seq	SRR6418076 HEK293	SRR8938025 HEK293	SRR9602331 HEK293	SRR10982335 Кардиомиоциты из ИПСК человека	SRR12503731 Кардиомиоциты из ИПСК человека	Исследуемый район (позиции в геноме, сборка hg38)
Покрытие <i>ACTB</i> , %	100	100	100	100	100	chr7 5,527,748-5,529,657 (1910 п.о.)
Покрытие GSH-Ch1, %	8,2	3,9	3,55	56,5	59,6	chr1 189847081-189848101 (1000 п.о.)
Покрытие <i>MYBPC3</i> , %	27,1	6,6	11,9	11,9	50,0	chr11 47342156-47343175 (1000 п.о.)
Покрытие <i>AAVS1</i> , %	68,9	23,3	31,0	33,8	33,3	chr19 55115245-55116264 (1000 п.о.)

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

от 5'-конца любого гена, более 300 т.п.о. от генов, ассоциированных с раком и любой микроРНК, удаленность от ультраконсервативных регионов генома. Таким идеальным кандидатом, отвечающим всем критериям, считается локус GSH-Ch1 (genomic safe harbor chromosome 1) (позиции 189847581–189847601, район 1q31.1 1-й хромосомы человека) [17, 18] (рис. 3А).

Системы CRISPR-Cas представляют собой «изобретение» бактерий для борьбы с вирусной ДНК, которая не образует регулярные комплексы с белками, тогда как в клетках эукариот ДНК присутствует в составе нуклеосом и других структурных белков хроматина. В экспериментах *in vitro* показано, что нуклеосомы действительно препятствуют гидролизу ДНК нуклеазами SpCas9 [19] и AsCpf1 (Cas12a) [20]. При этом *in vivo* SpCas9 справляется с хроматином любой плотности и доступности [21]. Для нуклеазы AsCpf1 этот аспект недостаточно изучен. В данном исследовании мы провели биоинформационный анализ уровня открытости хроматина в safe harbor локусах *AAVS1* и GSH-Ch1 и транскрипционно неактивном гене *MYBPC3* кардиального миозинсвязывающего белка 3 в клетках линии HEK293FT, а также оценили нуклеазную активность белков SpCas9 и AsCpf1 *in vivo*.

Материал и методы

Получение генетических конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR-Cas. Дизайн протоспейсеров для синтеза направляющих РНК нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 выполняли с помощью ресурсов Benchling (<https://www.benchling.com>). Олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Биоссет» (Россия) и клонированы в соответствующие плазмиды, кодирующие

sgRNA и нуклеазы SpCas9 (pX458) и AsCpf1 (pAsCpf1(TYCV)(BB), pAsCpf1-2NLS) в соответствии с протоколом [22] (табл. 1). Плазида pAsCpf1(TTTV)-2NLS была сконструирована в лаборатории на основе AsCpf1 (TTTV) путем добавления второго сайта ядерной локализации NLS.

Анализ эффективности редактирования CRISPR-Cas на клетках HEK293FT

Доставку плазмидных конструкций в клетки линии HEK293FT (cat. R70007 Thermo Fisher Scientific) проводили с помощью электропорации на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) согласно рекомендациям производителя. Клетки линии HEK293FT культивировали при 5% CO₂, 37 °C, в ростовой среде DMEM/F12 (Gibco), 10% фетальной бычьей сыворотке (Life Technologies), 2 мМ GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 100 ед/мл раствора пенициллина/стрептомицина (Life Technologies), 0,1 мМ раствора аминокислот NEAA (Invitrogen). Перед экспериментом клетки диссоциировали реагентом TrypLE, центрифугировали в фосфатном буфере PBS в течение 5 минут (300 g) и ресуспендировали в буфере R (Neon Transfection System 10ul kit, Thermo Fisher Scientific) из расчета конечной концентрации 5 × 10⁷/мл. Реакцию электропорации 0,5 мкг плазмиды, кодирующей компоненты CRISPR-Cas, проводили в 10 мкл суспензии клеток в буфере R. После электропорации клетки перенесли в подготовленные культуральные планшеты с теплой средой без антибиотика. Через 48 часов после трансфекции из клеток выделяли геномную ДНК и амплифицировали целевой участок, содержащий сайт CRISPR-индуцируемого разрыва, со специфических праймеров (табл. 2). Полученный продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР)

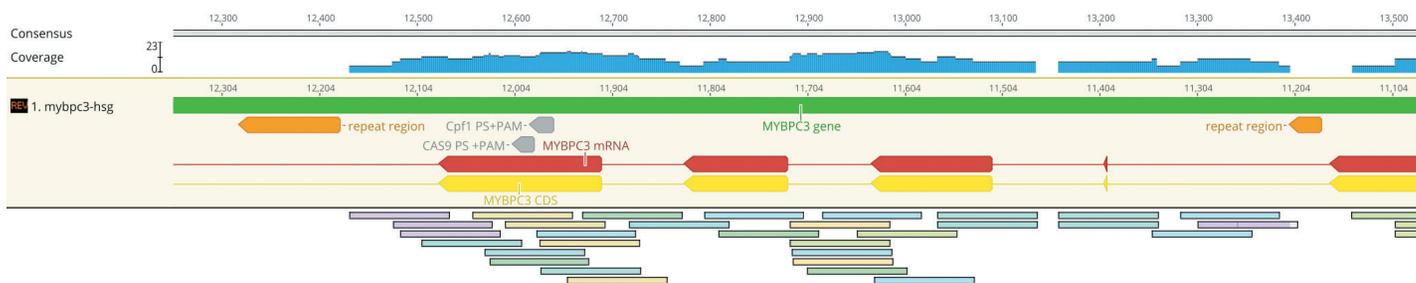


Рис. 4. Пример картирования прочтений фрагментов ДНК эксперимента ATAC-seq для клеток HEK293FT (SRR9602331, см. раздел «Материал и методы») на ген *MYBPC3*. Голубым цветом обозначена плотность прочтений (диапазон представлен числом прочтений, картированных на референсную последовательность гена *MYBPC3*, – от 1 до 23). Серые стрелки – позиции протоспейсеров AsCpf1 и SpCas9, прямоугольники – последовательности ДНК данного района, свободные от белков и выявляемые методом ATAC-seq. Красные стрелки – экзоны гена, желтые – экзоны, кодирующие белок

очищали методом элюции из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген). Реакции секвенирования по методу Сэнгера проводили с применением набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Продукты реакции секвенирования анализировали в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

Общую эффективность CRISPR-Cas9 оценивали по доле модифицированных последовательностей ДНК, образовавшихся в результате негомологичного сшивания концов, выявляемых при анализе секвенограмм с помощью программного алгоритма TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) (<https://tide.nki.nl>).

Анализ открытости хроматина в целевых районах генома клеток HEK293FT

Последовательности локусов были экстрагированы из GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>): AP023479.1:55589039-55593668 Homo sapiens DNA, chromosome 19, AL591504.5:14265-18238 Human DNA sequence from clone RP11-445J9 on chromosome 1. Анализ открытости хроматина в клетках HEK293FT проводили на основе данных из базы NCBI SRA (Sequence Read Archive; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), полученных методом ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) [23]. Использовали данные экспериментов ATAC-seq для клеток HEK293FT SRR6418076, SRR8938025, SRR9602331 и для кардиомиоцитов человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) SRR10982335, SRR12503731. Данные экспериментов ATAC-seq картировали относительно референсных последовательностей ДНК с использованием программы HISAT2 [24]. Результирующие файлы в формате SAM визуализировали и проводили первичный анализ

с использованием программного обеспечения Geneious 11.0.2 (<http://www.geneious.com>) [25]. Участки, содержащие повторы ДНК, исключали из анализа с помощью программы RepeatMasker [26].

Результаты

Для исследования программируемых нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в safe harbor локусах генома клеток линии HEK293 были выбраны протоспейсеры для локуса AAVS1 в районе hg38 chr19:55115745-55115764 (интрон гена *PPP1R12C*) (см. рис. 1А) [27] и для локуса GSH-Ch1 в позиции hg38 chr1:189847581-189847601 (см. рис. 2А) [28]. Дополнительно для изучения активности нуклеаз в транскрипционно неактивном хроматине был выбран ген кардиального миозинсвязывающего белка сMyBP-C, который не экспрессируется в клетках HEK293FT (протоспейсер hg38 chr11:47342656-47342675) (рис. 4).

Предварительно проводили оценку степени ассоциации целевых районов с нуклеосомами и другими белками с помощью анализа данных, полученных методом ATAC-seq базы NCBI SRA для хроматина клеток линии HEK293FT и кардиомиоцитов. Метод ATAC-seq выявляет доступные участки ДНК в составе хроматина с помощью гиперактивной мутантной формы транспозазы Tn5, которая интегрирует линкеры ДНК в открытые участки генома. Фрагменты генома, содержащие линкеры, очищают, амплифицируют с помощью ПЦР, после чего определяют последовательность ДНК с помощью секвенирования нового поколения (Illumina). На основании анализа прочтений ДНК можно выявить открытые участки хроматина, сайты связывания транскрипционных факторов, а также позиции нуклеосом. Чем более открыт хроматин, тем больше прочтений ДНК приходится на соответствующий участок генома [29, 30].

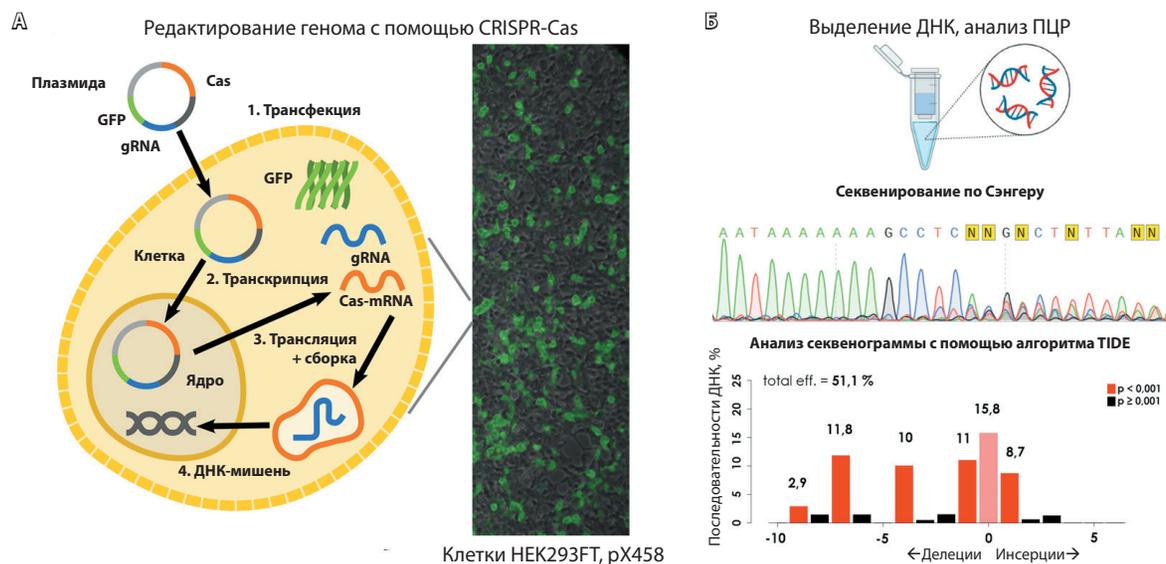


Рис. 5. Схема эксперимента. **А** – плазмиды, кодирующие компоненты систем CRISPR-SpCas9 и CRISPR-AsCpf1, трансфицировали в клетки HEK293FT. *In vivo* в ядрах клеток происходила транскрипция ДНК плазмиды и синтез направляющей РНК (gRNA), мРНК нуклеаз Cas (Cas-mRNA) и флуоресцентного белка GFP. В цитоплазме происходила трансляция мРНК и сборка комплексов CRISPR-Cas:gRNA, которые перемещались в ядро и вносили двуцепочечные разрывы в ДНК целевых регионов (ДНК-мишень). По наличию сигнала белка GFP, закодированного в плазмиде рХ458, определяли уровень трансфекции плазмид в клетки линии HEK293FT. **Б** – выделяли ДНК клеток линии HEK293FT, амплифицировали целевой район методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), определяли последовательность нуклеотидов ДНК по Сэнгеру и анализировали секвеннограммы при помощи алгоритма TIDE

В данном исследовании мы оценили количество прочтений ДНК (плотность покрытия) в локусах AAVS1, GSH-Ch1 и гене MYBPC3 в аннотируемых экспериментах ATAC-seq, проведенных на клетках HEK293 (3 варианта) и кардиомиоцитах, полученных из ИПСК (2 варианта). Полученные данные для каждого эксперимента нормировали на

плотность покрытия, выявляемую для хроматина кодирующей области гена домашнего хозяйства ACTB (beta-actin). Из данных табл. 3 видно, что в клетках HEK293 локус GSH-Ch1, вероятнее всего, относится к закрытому хроматину, поскольку плотность прочтений ДНК составляет в среднем 5% от плотности прочтений, картируемых в гене

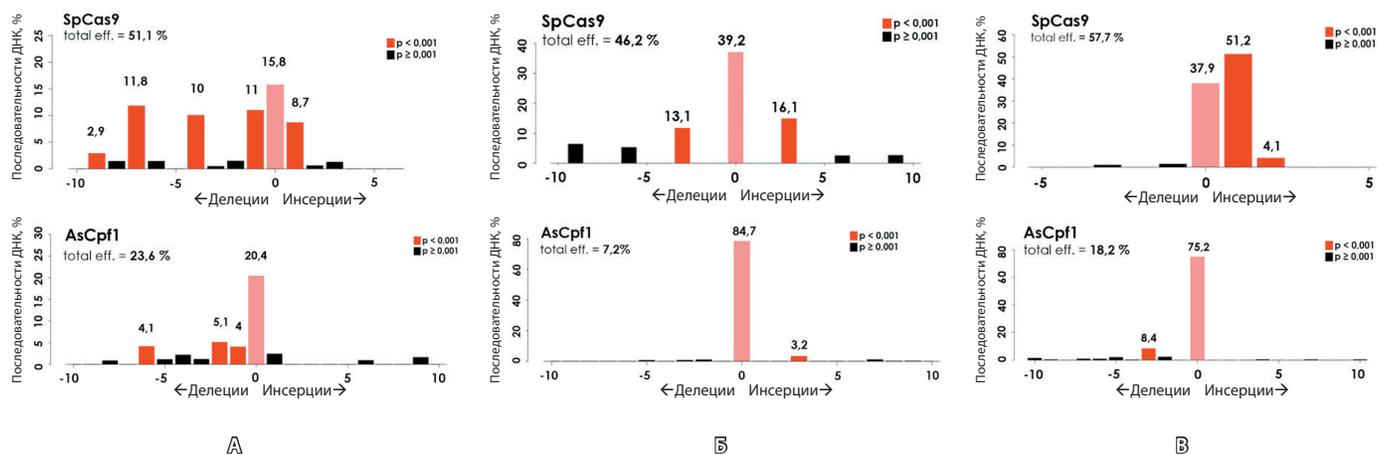


Рис. 6. Результаты анализа секвеннограмм целевых регионов ДНК локусов AAVS1 (**А**), GSH-Ch1 (**Б**), MYBPC3 (**В**) клеток линии HEK293FT после внесения плазмид, кодирующих компоненты CRISPR-SpCas9 и CRISPR-AsCpf1, с помощью алгоритма TIDE. На оси абсцисс в нуле показано отсутствие событий редактирования, слева от нуля отложены делеции, справа от нуля – инсерции, цифрами указано, сколько нуклеотидов удалено или вставлено. По оси ординат отложен процент выявленных событий

домашнего хозяйства *ACTB*, хроматин которого мы считаем открытым. Разброс значений покрытия прочтений ДНК для локуса *AAVS1* составляет от 23,3 до 68,9% относительно гена *ACTB*.

Наряду с этим в локусе *AAVS1* (интрон 1 гена *PPP1R12C*) с помощью программы BLAT (<http://genome.ucsc.edu>) были выявлены потенциальные сайты регуляторных элементов cCREs (candidate cis-Regulatory Elements), а именно потенциальные энхансеры (см. рис. 2Б). Элементы cCREs выявляются в районах открытого хроматина (свободного от нуклеосом), гиперчувствительных к ДНКазе 1 (см. рис. 2Б, В). Таким образом, можно считать, что район *AAVS1*, в котором расположен протоспейсер в клетках НЕК293, содержит открытый хроматин, доступный для связывания белков комплекса CRISPR-Cas, а район safe harbor на первой хромосоме GSH-Ch1 – закрытый хроматин, который может быть проблемным для активности AsCpf1. Ген *MYBPC3* неактивен в клетках НЕК293, однако значения покрытия прочтений ДНК в экспериментах ATAC-seq в этом случае варьируют от 6,6 до 27,1% относительно гена домашнего хозяйства *ACTB*. Мы оценили плотность прочтений в экспериментах ATAC-seq, проведенных на кардиомиоцитах, полученных из ИПСК, в гене *MYBPC3*, который экспрессируется в клетках. Анализ данных показывает, что транскрипционно активный ген *MYBPC3* действительно приобретает черты открытого хроматина. Интересно, что хроматин локуса GSH-Ch1 в кардиомиоцитах также становится открытым в отличие от НЕК293 (см. табл. 3).

Примеры картирования прочтений в исследуемых районах клеток НЕК293FT даны на рис. 2В (локус *AAVS1*), 3Б (локус GSH-Ch1), 4 (ген *MYBPC3*).

Протоспейсеры для нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 были клонированы в соответствующие плазмиды (см. табл. 2), и с помощью электропорации проведена доставка кодирующих конструкций в клетки НЕК293FT. Уровень трансфекции оценивали по флуоресценции белка EGFP, который присутствует в плазмиде pX458, кодирующей белок SpCas9 и направляющей sgRNA (доставка конструкции происходила в 70% клеток). Уровень доставки плазмид, кодирующих компоненты CRISPR-AsCpf1, считали таким же. Далее геномную ДНК выделяли спустя 48 часов после трансфекции, целевые районы амплифицировали и секвенировали. Полученные данные секвенограмм были проанализированы с помощью алгоритма TIDE (рис. 5). Программа статистически оценивает вероятность присутствия делеций и инсерций, появившихся в районе протоспейсера после негомологичной репарации разрывов ДНК, и представляет результаты в виде

диаграмм, на которых можно оценить степень активности системы CRISPR-Cas в целевом районе.

Как и ожидалось, в локусе *AAVS1* нуклеазы SpCas9 и AsCpf1 эффективно взаимодействовали с хроматином (рис. 6А). По данным программы TIDE, общая эффективность редактирования составляла 51,1% для SpCas9 и 23,6% для AsCpf1. В локусе GSH-Ch1 была активна исключительно SpCas9 (46,2%), в то время как нуклеаза AsCpf1 вносила разрывы в хроматин с очень низкой эффективностью – 7,2% (рис. 6Б). В целевом районе гена *MYBPC3* эффективность редактирования для SpCas9 была равна 57,7%, для AsCpf1 – 18,2% (рис. 6В).

Обсуждение и заключение

Открытие программированных нуклеаз CRISPR-Cas и создание на их основе инструментов редактирования генома эукариот позволяют эффективно изучать мутации и создавать модели для изучения наследственных заболеваний. Для безопасного и эффективного трансгеноза в геноме человека выявлены специальные GSH-локусы. С целью уменьшения вероятности ошибок редактирования подбирают более точные нуклеазы Cas, оценивают разные аспекты – частоту встречаемости PAM, эффективность нуклеазной активности в различных районах хроматина. Система редактирования CRISPR-Cas была создана на основе механизмов иммунитета бактерий, основанного на специфическом узнавании и расщеплении ДНК вирусом и не была адаптирована для расщепления ДНК в составе нуклеосом, которые служат структурной единицей хроматина эукариот. Участки ДНК, свободные от нуклеосом эукариот (так называемый открытый хроматин), встречаются в промоторах и энхансерах генов – сайтах связывания транскрипционных факторов или регуляторных белков. Открытый хроматин также присутствует в экзонах и интронах активно транскрибируемых генов [31]. Участки ДНК, свободные от нуклеосом, в активных генах образуются в результате динамического процесса взаимодействия ДНК и белков нуклеосом (октамера гистонов 2xH2A, 2xH2B, 2xH3 и 2xH4), так называемого дыхания нуклеосом за счет привлечения белков ремоделирования хроматина. Данные белки узнают активные модификации гистонов и способствуют уменьшению сродства между ДНК и гистонами, за счет чего ДНК чаще остается свободной от нуклеосом. Эпигенетические модификации гистонов активного хроматина (например, ацетилованный лизин гистона H3 (H3K9ac, H3K27ac) в положении 9 или 27,



ди- и триметилированный лизин гистона H3 (H3K4me2-me3) в положении 4 и др.) считаются маркерами открытого хроматина [31, 32].

Современным, доступным и чувствительным методом полногеномного анализа участков ДНК, свободных от нуклеосом, считается анализ ATAC-seq. Данные, полученные ранее с помощью других методов исследования структуры хроматина, – DNase-seq (DNase I hypersensitive sites sequencing – анализ гиперчувствительных к расщеплению ДНКазой районов генома), MNase-seq (Micrococcal Nuclease digestion with deep sequencing – анализ участков, чувствительных к микрококковой нуклеазе), ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing – анализ ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина для анализа распределения модифицированных гистонов) – полностью согласуются с результатами ATAC-seq. С помощью метода ATAC-seq можно выявлять области открытого хроматина, уточнять позиции нуклеосом или сайтов связывания регуляторных элементов с высокой точностью [23, 30, 33].

Мы исследовали нуклеазную активность SpCas9 и AsCpf1 в клетках HEK293FT в safe harbor локусах на 19-й хромосоме (AAVS1) и на 1-й хромосоме (GSH-Ch1). Изучение данных экспериментов ATAC-seq для клеток HEK293FT показало, что локус AAVS1 можно отнести к открытому хроматину, а локус GSH-Ch1 – к закрытому. Ген кардиального белка MyBPC3 в клетках HEK293FT имеет промежуточные характеристики хроматина. Проведенное исследование эффективности

внесения разрывов в исследуемые локусы хроматина клеток HEK293FT нуклеазами позволило обнаружить, что SpCas9 справляется с хроматином любой плотности, тогда как AsCpf1 эффективно вносит разрывы в ДНК только в локусах с открытым хроматином – AAVS1 и MYBPC3. В локусе с закрытым хроматином GSH-Ch1 события редактирования в данном случае происходят на очень низком уровне.

Как было показано нами в данной работе, а также другими исследователями, на нуклеазную активность SpCas9 *in vivo* структура хроматина не оказывает влияния [21]. Обнаруженная низкая активность AsCpf1 в GSH-Ch1 может быть свидетельством того, что плотный хроматин данного локуса в клетках HEK293FT препятствует внесению разрывов в ДНК данной нуклеазой *in vivo*. Существует специфический паттерн распределения нуклеосом в целевых районах в разных типах клеток. Анализируя эксперименты ATAC-seq, проведенные на кардиомиоцитах, дифференцированных из ИПСК, мы обнаружили, что MYBPC3 хроматина становится более открытым не только в транскрипционном активном гене, но и в локусе GSH-Ch1.

Таким образом, чтобы использовать для редактирования более точную программируемую нуклеазу AsCpf1, следует тщательно выбирать район протоспейсера, учитывая эпигенетический ландшафт хроматина и степень его открытости в разных типах клеток, либо применять в эксперименте вещества и условия культивирования клеток, влияющие на структуру хроматина. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

С.В. Павлова – дизайн и проведение экспериментальной части исследования, интерпретация результатов, написание текста; Е.А. Елисафенко – проведение биоинформатического анализа данных, анализ результатов исследования, редактирование текста

статьи; Л.Ш. Шаяхметова – проведение экспериментальной части исследования, редактирование рукописи; С.П. Медведев – концепция и дизайн исследования, интерпретация результатов, написание текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований и Новосибирской областью, номер проекта 19-44-540002 р_а. Бюджетный проект 0259-2021-0011.

Литература / References

- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823–826. doi: 10.1126/science.1232033.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709–1712. doi: 10.1126/science.1138140.



4. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* 2000;36(1):244–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
5. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2): 174–182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.
6. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67–78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
7. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096): 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
8. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213): 1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
9. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9): 822–826. doi: 10.1038/nbt.2623.
10. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, McCaw ZR, Aryee MJ, Joung JK. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):869–874. doi: 10.1038/nbt.3620.
11. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759–771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
12. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):863–868. doi: 10.1038/nbt.3609.
13. Gao L, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, Nishimasu H, Nureki O, Crosetto N, Zhang F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol.* 2017;35(8):789–792. doi: 10.1038/nbt.3900.
14. Rivière I, Dunbar CE, Sadelain M. Hematopoietic stem cell engineering at a crossroads. *Blood.* 2012;119(5):1107–1116. doi: 10.1182/blood-2011-09-349993.
15. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S, Björkregren E, Bayford J, Brown L, Davies EG, Veys P, Fairbanks L, Bordon V, Petropoulou T, Kinnon C, Thrasher AJ. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med.* 2011;3(97):97ra80. doi: 10.1126/scitranslmed.3002716.
16. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science.* 2009;326(5954):818–823. doi: 10.1126/science.1171242.
17. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer.* 2011;12(1): 51–58. doi: 10.1038/nrc3179.
18. Pellenz S, Phelps M, Tang W, Hovde BT, Sinit RB, Fu W, Li H, Chen E, Monnat RJ Jr. New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion. *Hum Gene Ther.* 2019;30(7):814–828. doi: 10.1089/hum.2018.169.
19. Horlbeck MA, Witkowski LB, Guglielmi B, Replogle JM, Gilbert LA, Villalta JE, Torigoe SE, Tjian R, Weissman JS. Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *Elife.* 2016;5:e12677. doi: 10.7554/eLife.12677.
20. Strohkendl I, Saifuddin FA, Gibson BA, Rosen MK, Russell R, Finkelstein IJ. Inhibition of CRISPR-Cas12a DNA targeting by nucleosomes and chromatin. *Sci Adv.* 2021;7(11):eabd6030. doi: 10.1126/sciadv.abd6030.
21. Barkal AA, Srinivasan S, Hashimoto T, Gifford DK, Sherwood RI. Cas9 Functionally Opens Chromatin. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152683. doi: 10.1371/journal.pone.0152683.
22. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
23. Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods.* 2013;10(12):1213–1218. doi: 10.1038/nmeth.2688.
24. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015;12(4):357–360. doi: 10.1038/nmeth.3317.
25. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28(12): 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
26. Smit AFA, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015. Available from: <http://www.repeatmasker.org>.
27. Ustyantseva EI, Medvedev SP, Vetchinova AS, Minina JM, Illarionovskiy SN, Zakian SM. A Platform for Studying Neurodegeneration Mechanisms Using Genetically Encoded Biosensors. *Biochemistry (Mosc).* 2019;84(3):299–309. doi: 10.1134/S000629791903012X.
28. Kimura Y, Shofuda T, Higuchi Y, Nagamori I, Oda M, Nakamori M, Onodera M, Kanematsu D, Yamamoto A, Katsuma A, Suemizu H, Nakano T, Kanemura Y, Mochizuki H. Human Genomic Safe Harbors and the Suicide Gene-Based Safeguard System for iPSC-Based Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(7): 627–638. doi: 10.1002/sctm.18-0039.
29. Schep AN, Buenrostro JD, Denny SK, Schwartz K, Sherlock G, Greenleaf WJ. Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions. *Genome Res.* 2015;25(11):1757–1770. doi: 10.1101/gr.192294.115.
30. Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, Greenleaf WJ. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr Protoc Mol Biol.* 2015;109:21.29.1–21.29.9. doi: 10.1002/0471142727.mb2129s109.
31. Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.* 2008;132(2):311–322. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.014.
32. Igolkina AA, Zinkevich A, Karandasheva KO, Popov AA, Selifanova MV, Nikolaeva D, Tkachev V, Penzar D, Nikitin DM, Buzdin A. H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 Histone Tags Suggest Distinct Regulatory Evolution of Open and Condensed Chromatin Landmarks. *Cells.* 2019;8(9):1034. doi: 10.3390/cells8091034.
33. Voong LN, Xi L, Wang JP, Wang X. Genome-wide Mapping of the Nucleosome Landscape by Micrococcal Nuclease and Chemical Mapping. *Trends Genet.* 2017;33(8):495–507. doi: 10.1016/j.tig.2017.05.007.



Efficiency of SpCas9 and AsCpf1 (Cas12a) programmable nucleases at genomic safe harbor loci in HEK293 cells

S.V. Pavlova¹ • E.A. Elisaphenko¹ • L.Sh. Shayakhmetova^{1, 2} • S.P. Medvedev¹

Rationale: The development of eukaryote genome engineering tools based on CRISPR-Cas programmable bacterial nucleases systems opens wide horizons for gene therapies, human disease cell modeling, as well as investigation into manifestation of disease phenotypes and visualization of cellular processes. The safety and approximation of experiments both at the cellular and organismal levels depend on the accuracy of introducing double-stranded breaks into the target DNA regions. The search for new variants of more accurate CRISPR-Cas nucleases and evaluation of their ability to hydrolyze nucleosome DNA *in vivo* is considered a critical task for the development of the genome engineering technologies.

Aim: To analyze the activity of the programmable nuclease AsCpf1 (Cas12a), with low level of off-target activity, in the human genome loci that are safe for the introduction of transgenic constructs (“safe harbor”) and to compare its efficiency with that of the widely used SpCas9 nuclease in HEK293 cells.

Materials and methods: We performed the bioinformatics analysis of the association between target regions with nucleosomes and other proteins in the safe harbor loci AAVS1 and GSH-Ch1 and the transcriptionally inactive gene *MYBPC3* (cardiac myosin binding protein 3) based on ATAC-seq data for the HEK293FT cells obtained from the NCBI SRA database. Plasmids encoding SpCas9 and AsCpf1 nucleases and guide RNA to the target regions were constructed and transfected into the HEK293FT cells. Events in the target regions of the HEK293FT cell genome were studied in the sequenograms with the TIDE algorithm.

Results: The results of the ATAC-seq experiments for HEK293FT cells have shown that the AAVS1 locus can be referred as open chromatin with a low nucleosome density, while the GSH-Ch1 locus can be attributed to closed chromatin. In HEK293FT cells, the cardiac *MYBPC3* gene has intermediate chromatin density. Assessment of the efficiency of introducing breaks into the studied HEK293FT cell chromatin loci by nucleases has shown that SpCas9 is able to cope with chromatin of any nucleosome density, while AsCpf1 can effectively introduce DNA breaks only at loci with open chromatin, such as AAVS1 and *MYBPC3*. Editing events occur at a very low rate at the GSH-Ch1 locus with a high nucleosome density.

Conclusion: We have found low efficiency of the AsCpf1 nuclease in the genomic safe harbor locus GSH-Ch1, which is characterized by a high nucleosome density. When planning an experiment on AsCpf1 nuclease genome editing, the epigenetic chromatin landscape and the nucleosome density should be considered, as well as chromatin opening substances should be used.

Key words: gene editing, CRISPR-Cas nuclease SpCas9 and AsCpf1, guide RNA, nucleosomes, open chromatin

For citation: Pavlova SV, Elisaphenko EA, Shayakhmetova LSh, Medvedev SP. Efficiency of SpCas9 and AsCpf1 (Cas12a) programmable nucleases at genomic safe harbor loci in HEK293 cells. Almanac of Clinical Medicine. 2021;49(6):385–395. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-037.

Received 29 June 2021; accepted 28 July 2021; published online 15 September 2021

Sophia V. Pavlova – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Developmental Epigenetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>
✉ 1–16 Mal'tseva ul., Novosibirsk, 630090, Russian Federation. Tel.: +7 (913) 903 13 62.
E-mail: sonpavlova@gmail.com

Evgeny A. Elisaphenko – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Developmental Epigenetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3204-8178>. E-mail: antares@bionet.nsc.ru

Lilia Sh. Shayakhmetova – Laboratory Assistant¹; Bachelor²

Sergey P. Medvedev – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Developmental Epigenetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

S.V. Pavlova, the study design and its experimental part, interpretation of the results, text writing; E.A. Elisaphenko, bioinformatics data analysis, analysis of the study results, editing of the manuscript; L.Sh. Shayakhmetova, conduction of the experiments, editing of the manuscript; S.P. Medvedev, the study concept and design, interpretation of the results, text writing, approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

Acknowledgements

The study was supported by the Russian Foundation for Fundamental Research and by the Novosibirsk Oblast, project # 19-44-540002_p_a., budget project 0259-2021-0011.

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; 10 Akademika Lavrent'yeva prospekt, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

²Novosibirsk State University; 1 Pirogova ul., Novosibirsk, 630090, Russian Federation



Оригинальная статья

Оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на подкожных ксенографтах культуры опухолевых клеток A-549

Лукбанова Е.А.¹ • Заикина Е.В.¹ • Саяпин Ю.А.² • Гусаков Е.А.³ • Филиппова С.Ю.¹ • Златник Е.Ю.¹ • Волкова А.В.¹ • Курбанова Л.З.¹ • Ходакова Д.В.¹ • Каймакчи Д.О.¹ • Лазутин Ю.Н.¹ • Шевченко А.Н.¹ • Пандова О.В.¹

Лукбанова Екатерина Алексеевна – науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>

✉ 346783, Ростовская область, г. Азов, ул. Азовская, 163, Российская Федерация. Тел.: +7 (863) 300 02 00, доб. 490. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Заикина Екатерина Владиславовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Саяпин Юрий Анатольевич – канд. хим. наук, заведующий лабораторией физической органической химии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3180-1762>

Гусаков Евгений Александрович – канд. хим. наук, науч. сотр.³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7593-1334>

Филиппова Светлана Юрьевна – науч. сотр. лаборатории клеточных технологий¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

Златник Елена Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории иммунофенотипирования опухолей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>

Волкова Анастасия Владимировна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Курбанова Луиза Зулкаидовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>

Ходакова Дарья Владиславовна – мл. науч. сотр. Испытательного лабораторного центра¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Каймакчи Дмитрий Олегович – врач-хирург отделения абдоминальной онкологии № 2¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7556-9897>

Лазутин Юрий Николаевич – врач-онколог отделения торакальной хирургии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>

Шевченко Алексей Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделением онкоурологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-134X>

Пандова Ольга Витальевна – мл. науч. сотр. отделения нейроонкологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2218-9345>

Актуальность. Химиотерапия – один из методов лечения рака легкого. В связи с невысокой эффективностью цитотоксических препаратов и их побочными эффектами актуален поиск новых веществ. Перспективную группу соединений, проявляющих различные виды биологической активности, в том числе противоопухолевую, составляют алкалоиды трополонового ряда – семичленные небензоидные ароматические соединения. 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, синтезированный в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, относится к новым соединениям в ряду 2-хинолин-2-ил-производных 1,3-трополона.

Цель – оценить противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона в отношении подкожных ксенографтов культуры рака легкого A-549 на иммунодефицитных мышах Balb/c Nude.

Материал и методы. Исследование проводили на 50 иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude, разделенных на 4 опытные группы в зависимости от дозы исследуемого вещества – 0,0055, 0,055, 0,55 и 2,75 мг/г и на 5-ю – контрольную. В качестве ксенотрансплантата использовали клеточную линию рака легкого A-549. Противоопухолевый эффект трополона оценивали с учетом показателя торможения роста опухоли и индекса роста опухоли. Длительность эксперимента составляла 36 дней начиная с первого введения веществ.

Результаты. Показатель среднего объема опухоли на 36-е сутки эксперимента в группе контроля и опытных группах 1, 2, 3 и 4 составил 2729,5; 2150,8; 1746,4; 952,3 и 678,9 мм³ соответственно. Значения индекса роста опухоли в группах 1, 2, 3 и 4 были статистически значимо ниже в сравнении с 5-й группой (контроль) начиная с 24, 21, 21 и 15 суток соответственно и до конца эксперимента. Наибольшие

различия между группами 4 и 5 наблюдались на 33- и 36-е сутки исследования – в 3,7 (p=0,01) и 4,1 (p=0,003) раза соответственно.

Обсуждение. Выявленный в данном исследовании противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона может быть связан с различными механизмами. Например, его близкородственное соединение хиноктиол, по результатам многочисленных исследований, проявляет цитотоксическое действие, связанное с остановкой клеточного цикла, индукцией апоптоза, повреждением ДНК, аутофагической гибелью опухолевых клеток.

Заключение. Получены статистически значимые различия показателей объемов ксенографтов во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Наиболее эффективной дозой исследуемого соединения, приводящей к медленному снижению темпов роста опухоли и уменьшению объемов подкожных ксенографтов, была 2,75 мг/г массы мыши.

Ключевые слова: трополоны, противоопухолевый эффект, мыши линии Balb/c Nude, ксенографт, торможение роста опухоли

Для цитирования: Лукбанова ЕА, Заикина ЕВ, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Филиппова СЮ, Златник ЕЮ, Волкова АВ, Курбанова ЛЗ, Ходакова ДВ, Каймакчи ДО, Лазутин ЮН, Шевченко АН, Пандова ОВ. Оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на подкожных ксенографтах культуры опухолевых клеток A-549. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):396–404. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-021.

Поступила 09.02.2021; доработана 16.04.2021; принята к публикации 19.04.2021; опубликована онлайн 26.04.2021

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, Российская Федерация

² ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук»; 344006, г. Ростов-на-Дону, пр-т Чехова, 41, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт физической и органической химии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет»; 344090, г. Ростов-на-Дону, пр-т Стачки, 194/2, Российская Федерация



Рак легкого занимает лидирующие позиции (11,6%) в структуре онкологической заболеваемости в мире [1]. Будучи неотъемлемой частью комбинированного лечения опухолей легких, химиотерапия позволяет снизить риск последующего прогрессирования заболевания [2, 3]. Проявляя относительно высокую эффективность в отношении местнораспространенных форм рака легких, химиотерапия не способствует значительному увеличению показателей выживаемости пациентов. Так, в России за период с 2015 по 2019 г. летальность больных в течение года с момента установления диагноза составила от 48,4 до 50,6% [4, 5].

Наряду с относительно низкой эффективностью цитотоксических препаратов, обусловленной их невысокой избирательностью, убедительно показаны такие множественные побочные эффекты, как миелосупрессия, снижение фертильности, развитие вторичных злокачественных опухолей, мукозиты, алоpecia, тошнота и рвота [6]. Довольно часто встречаются воспаление и некротические процессы, развивающиеся вследствие проникновения противоопухолевых препаратов в ткани перитуморальной зоны [7]. Нередко возникает ситуация, когда цитотоксический препарат чрезвычайно эффективен при лечении конкретного рака, однако оптимально необходимая доза может быть недостижимой без чрезмерных побочных эффектов для пациента [8]. Причиной тому помимо неселективности действия химиопрепаратов служит их неселективная доставка, то есть воздействие в большей степени на жизненно важные органы и ткани, чем на опухолевые [9].

В качестве терапевтических агентов при раке легкого используются распространённые комбинации известных препаратов – таксана, винорелбина, доцетаксела, пеметрекседа и др., а также предложены некоторые дитерпены, алкалоиды, гинсенозиды, куркумин, триптолид, астаксантин и др. [10, 11].

В связи с вышеизложенным представляется актуальным поиск новых веществ, проявляющих противоопухолевый эффект в отношении злокачественных новообразований легких. К перспективным ингибиторам опухолевого роста относят алкалоиды трополонового ряда. Это семичленные небензоидные ароматические соединения с разнообразными видами биологической активности [10, 12, 13]. Цитотоксическое действие трополонов в отношении опухолевых клеток млекопитающих обнаружено J.S. Seo и соавт. [14].

Молекулярный механизм действия трополонов, который предполагает способность данных

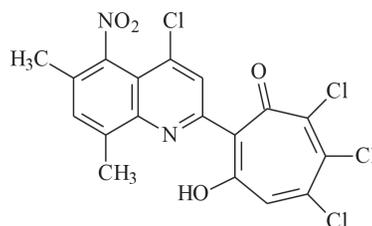
соединений функционировать как липофильные хелаторы двухвалентных катионов, образующие стабильные химические комплексы с ионами меди, магния и кальция, был описан еще в 1965 г.: I.F. Skidmore и M.W. Whitehouse показали способность 2-гидрокси-4-изопропил-2,4,6-циклохепатриена-1 ингибировать процессы окислительного фосфорилирования [15]. Однако вопрос о спектре и механизмах противоопухолевой активности трополонов не утратил своей актуальности вплоть до настоящего времени [13, 16].

Цель настоящего исследования – оценить противоопухолевый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона (далее – трополон) в отношении подкожных ксенографтов культуры рака легкого A-549 на иммунодефицитных мышях Balb/c Nude.

Материал и методы

Исследуемое соединение

2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, синтезированный в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, относится к новым соединениям в ряду 2-хинолин-2-ил-производных 1,3-трополона и имеет следующую структурную формулу:



Синтез соединения заключается в реакции расширения о-хинонового цикла, протекающей между 5-нитро-2,6,8-триметил-4-хлорхинолином 2 и 3,4,5,6-тетрахлор-1,2-бензохиноном 3 при кипячении в диоксане [17].

Лабораторные животные

Исследование проводили на 50 (25 самок и 25 самцов) интактных иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude с массой тела 18–24 г, возрастом 5–6 недель. Модельные животные были получены в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск), после чего содержались в SPF-виварии Испытательного лабораторного центра в системе искусственно вентилируемых клеток с соблюдением светового режима день/ночь (12/12 часов) при температуре 22–26 °С

**Таблица 1.** Распределение мышей по группам в эксперименте

Наименование группы	Количество и пол животных	Вещество-носитель	Доза исследуемого соединения, мг/г
Опытная 1	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,0055
Опытная 2	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,055
Опытная 3	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	0,55
Опытная 4	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	2,75
5 (контрольная)	5 ♂ и 5 ♀	1% крахмальный гель	–

и относительной влажности воздуха 50–60%. Экспериментальные работы с участием лабораторных животных проводились в соответствии с этическими правилами (план исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России – протокол № 1/61 от 19.02.2019).

Опухолевый материал и создание подкожной CDX-модели

В качестве трансплантируемого опухолевого биоматериала использовали клеточную линию рака легкого А-549, полученную в коллекции клеточных культур Института цитологии РАН и хранящуюся в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в жидком азоте. Образец клеточной культуры размораживали, после чего культивировали в объеме 5 пассажей в среде RPMI-1640 («БиолоТ», Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотке (Gibco, США) при 37 °С и 5% CO₂. Снятие культуры клеток осуществляли с помощью раствора трипсина/версена.

Опухолевые клетки вводили подкожно в область правого бедра, формируя кожную складку, в количестве 5 × 10⁶ клеток в 0,2 мл раствора бесывороточной питательной среды 199 и Матрикс-геля в соотношении 1:1.

Распределение животных-носителей по группам

По достижении опухолевыми узлами объемов 100 мм³ животные были распределены на 5 групп таким образом, чтобы средний объем подкожных ксенографтов не различался между группами. Схема распределения животных по группам и соответствующие дозы трополона обобщены в табл. 1.

Выбор наименьшей дозы трополона был основан на данных литературы о дозировках известного трополона – хиноктиола [18]. Наибольшая доза была максимально возможной, при которой

вещество могло быть ресуспендировано в веществе-носителе. Исследуемый трополон ресуспендировали в 1% крахмальном геле и вводили перорально при помощи зонда для мышей № 16 (1,6 × 80 мм) в 4 дозах с кратностью 1 раз в 3 дня. Введение веществ осуществляли независимо от приема корма и воды, доступ к которым был неограничен во время всего эксперимента.

Анализ роста подкожных ксенографтов и оценка противоопухолевого эффекта 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона

Динамику роста подкожного ксенографта оценивали при проведении замеров опухолевых узлов с частотой 1 раз в 3 дня, начиная с 3-го дня после первого введения веществ. Объем опухолевых узлов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида: $V = a \times b \times c \times \pi / 6$, где V – объем опухоли (мм³), a , b , c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

Оценку противоопухолевого эффекта трополона проводили с учетом показателя торможения роста опухоли (ТРО%) и индекса роста опухоли (I) [19]:

$$TPO (\%) = (Vk - Vo) / Vk \times 100,$$

где Vk и Vo – средний объем опухоли (мм³) в контрольной и опытных группах соответственно;

$$I_i = V_i / V_0,$$

где I – индекс роста опухоли, i – сутки эксперимента, V_0 – объем опухоли в день начала лечения.

Процедура эвтаназии и выделение опухолевого материала

Длительность эксперимента составляла 36 дней начиная с первого введения веществ.



Продолжительность исследования была ограничена тем, что активный рост ксенографтов в контрольной группе отрицательно влиял на состояние здоровья животных по достижении опухолевыми узлами объемов 2728,5 мм³.

Процедуру эвтаназии осуществляли путем проведения дислокации шейных позвонков, после чего выделяли опухолевый материал и помещали в криобирки для хранения в жидком азоте в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с целью дальнейших исследований.

Статистический анализ

При статистическом анализе были рассчитаны средние арифметические значения (M). Анализ статистической значимости различий между показателями массы тела, размерами опухолевых узлов и степенью торможения роста ксенографтов в изучаемых группах выполняли с помощью критерия Манна – Уитни. Для статистического анализа данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2019, Medstatistic (<https://medstatistic.ru/index.php>).

Результаты

Показатель среднего объема опухоли на 36-е сутки эксперимента в группе контроля и опытных группах 1, 2, 3 и 4 составил 2729,5 ± 182,8; 2150,8 ± 132; 1746,4 ± 157,7; 952,3 ± 62,5 и 678,9 ± 63,6 мм³ соответственно.

Индекс роста подкожных ксенографтов во всех исследуемых группах приведен на рис. 1.

Значения индекса роста опухоли в группе 1 были статистически значимо ниже в сравнении с группой 5 (контроль) начиная с 24-х суток и до конца эксперимента (табл. 2). Максимальные различия между группами 1 и 5 наблюдались на 33-е сутки после начала введения препаратов (индекс роста опухоли группы 1 был меньше, чем индекс роста опухоли группы 5 в 1,75 раза (p=0,042)). В группах 2 и 3 значения индекса роста опухоли статистически значимо отличались от контроля в течение эксперимента начиная с 21-х суток после первого введения трополона. Индекс роста опухоли в группах 2 и 3 максимально отличался от контроля на 33-и (меньше в 1,77 и 2,97 раза соответственно) и 36-е (меньше в 1,8 и 3,2 раза соответственно) сутки эксперимента. Значения индекса роста опухоли группы 4 были статистически значимо ниже по сравнению с группой 5 в течение эксперимента начиная с 15-х суток. Наибольшие различия между группами 4 и 5 наблюдались на 33-и и 36-е сутки исследования (индекс роста опухоли группы 4 был меньше, чем индекс роста опухоли группы 5 в 3,7 (p=0,01) и 4,1 (p=0,003) раза соответственно).

Описательная статистика для значений индекса роста опухоли приведена в табл. 2. Как видно из ее данных, статистически значимые различия индекса роста опухоли в опытных группах развивались в разные сроки.

Рис. 2 отражает динамику показателя ТРО в зависимости от дозы исследуемого соединения и времени его воздействия. Максимальное торможение роста опухоли (75,1%) наблюдалось

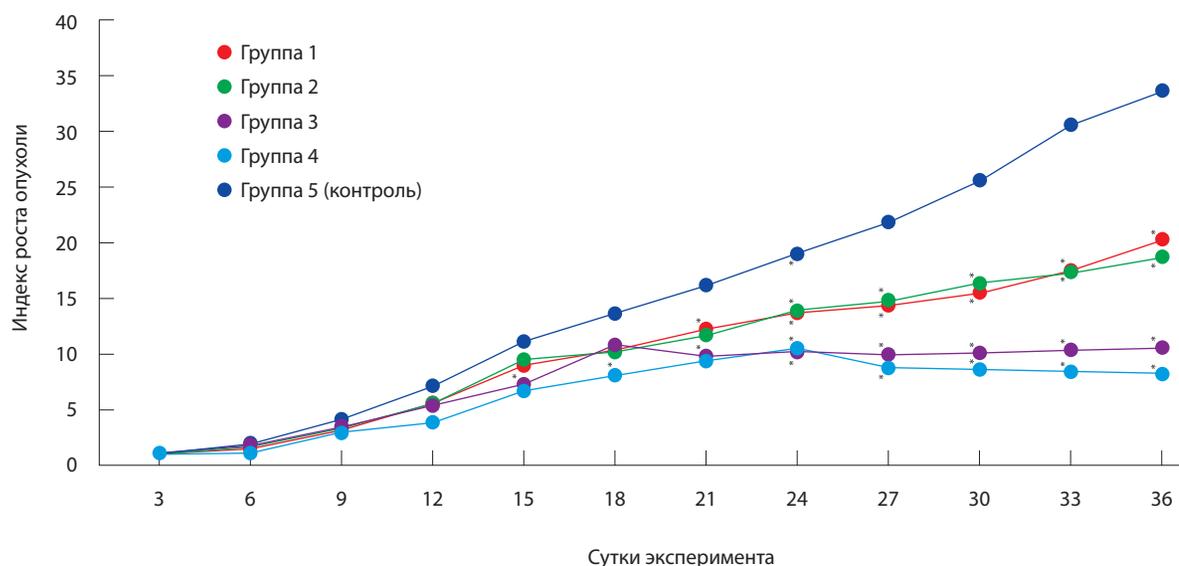


Рис. 1. Показатели индекса роста опухоли; * статистически значимые различия между опытной группой и группой контроля (p ≤ 0,05)

**Таблица 2.** Статистическая значимость отличий показателя индекса роста опухоли в опытных группах по сравнению с группой контроля

Группа	Показатель	Сутки после имплантации											
		3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
1	Значение <i>p</i>	0,25	0,32	0,12	0,09	0,1	0,078	0,06	0,023	0,031	0,025	0,042	0,03
	Среднее	1,00	1,53	3,39	6,08	10,01	11,45	13,55	15,25	15,95	17,08	19,38	22,50
	Медиана	1,00	1,54	3,48	6,04	9,95	11,66	14,23	15,68	15,97	17,08	19,32	22,75
	25-й квартиль	1,00	1,40	3,18	5,91	9,72	10,23	12,01	13,30	14,86	13,41	16,44	20,59
	75-й квартиль	1,00	1,58	3,62	6,40	10,57	12,07	15,37	16,23	16,77	19,86	22,07	25,11
	Стандартное отклонение	0,00	0,13	0,26	0,60	0,85	1,31	1,96	2,07	2,18	3,39	2,73	2,86
2	Значение <i>p</i>	0,45	0,5	0,08	0,17	0,071	0,2	0,03	0,05	0,038	0,027	0,034	0,04
	Среднее	1,00	1,66	3,67	5,95	10,51	11,29	12,86	15,27	16,33	18,12	19,07	20,67
	Медиана	1,00	1,64	3,70	5,85	10,51	11,22	13,31	14,97	16,72	17,90	19,03	20,86
	25-й квартиль	1,00	1,62	3,49	5,74	9,79	10,81	11,43	14,35	14,08	15,97	18,11	18,40
	75-й квартиль	1,00	1,71	3,76	6,24	11,19	11,80	14,02	16,36	18,20	20,26	20,33	22,76
	Стандартное отклонение	0,00	0,11	0,29	0,34	0,73	0,73	1,85	2,06	2,41	2,58	1,97	2,22
3	Значение <i>p</i>	0,4	0,14	0,6	0,095	0,078	0,08	0,042	0,04	0,024	0,01	0,01	0,015
	Среднее	1,00	1,65	3,63	5,93	7,94	11,94	10,68	11,34	10,89	11,14	11,38	11,58
	Медиана	1,00	1,56	3,60	5,79	8,17	11,71	10,83	11,37	11,27	10,95	11,61	12,15
	25-й квартиль	1,00	1,51	3,35	5,50	7,80	10,71	9,94	10,41	9,72	10,34	10,22	9,85
	75-й квартиль	1,00	1,81	3,80	6,45	8,35	13,32	11,17	11,79	11,95	12,12	12,19	12,64
	Стандартное отклонение	0,00	0,24	0,34	0,54	0,79	1,50	0,89	1,23	1,12	1,06	1,05	1,50
4	Значение <i>p</i>	0,9	0,256	0,12	0,07	0,04	0,022	0,003	0,003	0,007	0,007	0,01	0,003
	Среднее	1,00	1,14	3,13	4,07	7,28	8,79	10,25	11,52	9,68	9,41	9,20	9,05
	Медиана	1,00	1,16	3,16	4,19	7,35	8,60	10,09	11,20	10,12	9,66	9,64	9,24
	25-й квартиль	1,00	1,04	2,67	3,83	6,63	8,10	9,24	10,23	8,41	8,42	8,07	7,39
	75-й квартиль	1,00	1,20	3,71	4,45	7,77	9,52	11,30	13,19	10,56	10,63	10,18	10,16
	Стандартное отклонение	0,00	0,11	0,75	0,72	0,82	1,06	1,29	1,67	1,57	1,50	1,74	1,78
5 (контроль)	Значение <i>p</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Среднее	1,00	2,04	4,38	7,83	12,25	14,94	17,75	21,11	24,13	28,25	33,87	37,18
	Медиана	1,00	2,05	4,40	8,00	12,30	15,04	17,96	21,25	24,13	28,56	33,77	36,82
	25-й квартиль	1,00	1,97	4,25	7,43	12,14	14,18	14,64	20,63	22,93	26,21	30,57	36,45
	75-й квартиль	1,00	2,14	4,48	8,21	12,92	15,92	19,42	22,22	25,48	29,21	38,35	38,59
	Стандартное отклонение	0,00	0,12	0,33	0,51	0,80	1,55	3,46	2,66	1,94	2,42	4,12	1,90

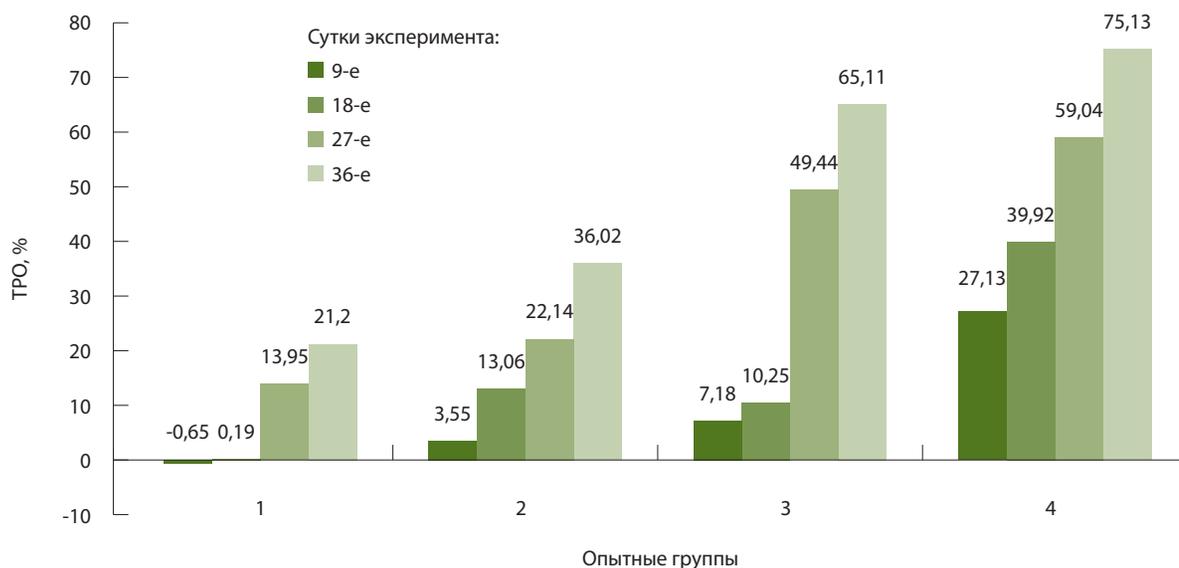


Рис. 2. Показатель торможения роста опухоли (ТРО) в исследуемых группах на 9, 18, 27 и 36-е сутки эксперимента

в последний день эксперимента в группе 4, которой вводили наибольшую дозу исследуемого соединения – 2,75 мг/г. В этой группе отмечалась тенденция к постепенному снижению интенсивности роста новообразований, достигавших максимального значения (864,1 мм³) на 24-й день эксперимента, после чего объемы опухолевых узлов уменьшались.

Наблюдаемая динамика, проявляющаяся в постепенном снижении темпов роста, может быть связана с накопительным эффектом трополона. Стоит отметить, что степень торможения опухолевого роста находилась в прямой пропорциональной зависимости от дозы вводимой субстанции. Таким образом, в проведенном исследовании нами был получен дозозависимый эффект исследуемого вещества.

Обсуждение

В результате исследования был выявлен дозозависимый эффект 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона. Так, на 36-е сутки эксперимента средний объем опухоли в группе 4 с воздействием изучаемого соединения в максимальной дозе был равен 678,9 мм³, что составляет 24,8% от среднего объема ксенографта в контрольной группе. Результаты, полученные в нашем исследовании, сопоставимы с данными литературы. Например, G. Zhang и соавт. установили: при воздействии вещества из группы трополонов β-туяплицина в дозе 5 мг/кг массы тела на ксенотрансплантаты

культуры опухолевых клеток HepG2 объем опухоли в опытной группе составлял 16% от объема ксенографта в контроле [20]. Полученные нами результаты являются однонаправленными с указанными, а различия показателей можно объяснить химическим строением веществ, другими дозами, а также CDX-моделями, используемыми в экспериментах.

В нашем исследовании на фоне воздействия трополона в наибольшей дозе происходило торможение роста опухоли до 75,1%. Сравнение выявленных нами противоопухолевых эффектов трополона с экспериментальными данными о противоопухолевой активности применяемых в клинической практике химиопрепаратов также показало их сопоставимость. Так, при оценке действия препарата доксорубина в дозе LD10 на сингенной модели карциномы легкого Льюис у мышей линии C57Bl/6 ТРО составлял 44,1% [21]. Таким образом, 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-91,3-трополона обладает выраженным противоопухолевым эффектом, который может быть обусловлен различными механизмами. В частности, в проведенных исследованиях механизмов противоопухолевого действия хиноктиола, являющегося близкородственным соединением с исследуемым трополоном, было показано, что он влияет на остановку клеточного цикла в опухолевых клетках [22], индукцию апоптоза [23], ДНК-повреждения [24], аутофагию [18].



Заключение

В нашем исследовании получены статистически значимые различия показателей объемов ксенографтов во всех опытных группах по сравнению с группой контроля. Наиболее эффективной дозой 2-(6,8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона, приводящей

к снижению темпов роста опухолей и уменьшению объемов подкожных ксенографтов, была 2,75 мг/г массы мышцы. В отношении всех доз изучаемого алкалоида показана тенденция к снижению интенсивности опухолевого роста на 21-й день эксперимента, что может быть связано с накопительным эффектом трополона. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания «Изучение противоопухолевой активности новых фармакологических субстанций на моделях *in vitro* и *in vivo*».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с данной работой.

Участие авторов

Е.А. Лукбанова – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование и отправка рукописи; Е.В. Заикина – проведение комплексного обследования животных, написание текста; Ю.А. Саяпин – синтез исследуемых соединений, концепция и дизайн исследования; Е.А. Гусаков – синтез исследуемых соединений,

написание текста, редактирование рукописи; С.Ю. Филиппова – проведение экспериментальных работ с культурой клеток, анализ полученных данных; Е.Ю. Златник – анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; А.В. Волкова, Л.З. Курбанова и Д.В. Хоудакова – экспериментальные работы с животными, сбор и обработка материала; Д.О. Каймакчи и Ю.Н. Лазутин – концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи; А.Н. Шевченко – статистическая обработка данных, редактирование рукописи; О.В. Пандова – статистический анализ данных, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: Lung [Internet]. 2020 Dec. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>.
2. Leonetti A, Wever B, Mazzaschi G, Assaraf YG, Rolfo C, Quaini F, Tiseo M, Giovannetti E. Molecular basis and rationale for combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Updat*. 2019;46:100644. doi: 10.1016/j.drup.2019.100644.
3. Xiao W, Hong M. Concurrent vs sequential chemoradiotherapy for patients with advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(11):e21455. doi: 10.1097/MD.00000000000021455.
4. Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО, ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020. 239 с. [Интернет]. Доступно на: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf. [Kaprin AD, Starinskiy VV, Shakhzadova AO, editors. [The state of cancer care to the Russian population in 2019]. Moscow: National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2020. 239 p. Russian [Internet]. Available from: https://glavonco.ru/cancer_register/%D0%9F%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%89%D1%8C%202019.pdf.]
5. Цыганов ММ, Родионов ЕО, Миллер СВ, Литвяков НВ. Обоснование использования экспрессионных маркеров для персонализации химиотерапии рака легкого. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015;60(9–10):38–45. [Tsyganov MM, Rodionov EO, Miller SV, Litvyakov NV. [Substantiation of expressive markers use to personalize lung cancer chemotherapy]. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2015;60(9–10): 38–45. Russian.]
6. Wu LG, Zhou DN, Wang T, Ma JZ, Sui H, Deng WL. The efficacy and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors versus chemotherapy in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(12):e25145. doi: 10.1097/MD.00000000000025145.
7. Бурнашева ЕВ, Шатохин ЮВ, Снежко ИВ, Мацуга АА. Поражение почек при противоопухолевой терапии. *Нефрология*. 2018;22(5):17–24. doi: 10.24884/1561-6274-2018-22-5-17-24. [Burnasheva EV, Shatokhin YV, Snezhko IV, Matsuga AA. [Kidney injury in cancer therapy]. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2018;22(5):17–24. Russian. doi: 10.24884/1561-6274-2018-22-5-17-24.]
8. Coburn JM, Kaplan DL. Engineering biomaterial-drug conjugates for local and sustained chemotherapeutic delivery. *Bioconjug Chem*. 2015;26(7):1212–1223. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00046.
9. Nakamura H, Fang J, Maeda H. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(1):53–64. doi: 10.1517/17425247.2014.955011.
10. Максимов АЮ, Лукбанова ЕА, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Гончарова АС, Лысенко ИБ, Протасова ТП. Противоопухолевая активность алкалоидов трополонового ряда *in vitro* и *in vivo*. Современные проблемы науки и образования. 2020;(2) [Интернет]. Доступно на: <http://science-education.ru/article/view?id=29722>. [Maksimov AYU, Lukbanova EA, Sayapin YA, Gusakov EA, Goncharova AS, Lysenko IB, Protasova TP. [Anticancer activity of tropolone alkaloids *in vitro* and *in vivo*]. *Modern Problems of Science and Education*. 2020;(2) [Internet]. Russian. doi: 10.17513/spno.2972.]
11. Wen T, Song L, Hua S. Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer. *Cancer Med*. 2021;10(7):2396–2422. doi: 10.1002/cam4.3660.
12. Банг ЗН, Саяпин ЮА, Лам Х, Дык НД, Комиссаров ВН. Синтез и цитотоксическая активность производных [бензо[b][1,4]оксазепино[7,6,5-de]хинолин-2-ил]-1,3-трополонов. *Химия гетероциклических соединений*. 2015;51(3):291–294. [Bang DN, Sayapin YA, Lam H, Duc ND, Komissarov VN. Synthesis and cytotoxic activity of [benzo[b][1,4]oxazepino[7,6,5-de]quino-



- lin-2-yl]-1,3-tropolones. *Chem Heterocycl Comp.* 2015;51(3):291–294. Russian. doi: 10.1007/s10593-015-1697-2.]
13. Jansen van Vuuren L, Visser HG, Schutte-Smith M. Crystal structure of 2-(methyl-amino)-tropone. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun.* 2019;75(Pt 8):1128–1132. doi: 10.1107/S2056989019009502.
14. Seo JS, Choi YH, Moon JW, Kim HS, Park SH. Hinokitiol induces DNA demethylation via DNMT1 and UHRF1 inhibition in colon cancer cells. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):14. doi: 10.1186/s12860-017-0130-3.
15. Skidmore IF, Whitehouse MW. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs. IV. Uncoupling of oxidative phosphorylation by resorcinols, tropolones and diones. *Biochem Pharmacol.* 1965;14:547–555. doi: 10.1016/0006-2952(65)90227-3.
16. Kurek J, Kwaśniewska-Sip P, Myszkowski K, Cofta G, Barczyński P, Murias M, Kurczab R, Śliwa P, Przybylski P. Antifungal, anticancer, and docking studies of colchicine complexes with monovalent metal cation salts. *Chem Biol Drug Des.* 2019;94(5):1930–1943. doi: 10.1111/cbdd.13583.
17. Минкин ВИ, Кит ОИ, Гончарова АС, Лукбанова ЕА, Саяпин ЮА, Гусаков ЕА, Туркин ИН, Ситковская АО, Филлипова СЮ, Лейман ИА, Лазутин ЮН, Чубарян АВ, Пащенко ДГ, Тищенко ИС, авторы; ФГАОУ ВО Южный федеральный университет, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, патентообладатели. Средство, обладающее цитотоксической активностью в отношении культуры клеток немелкоклеточного рака легких А 549. Пат. RU2741311C1 Рос. Федерация. Оpubл. 25.01.2021. [Minkin VI, Kit OI, Goncharova AS, Lukbanova EA, Saiapin IuA, Gusakov EA, Turkin IN, Sitkovskaia AO, Fillipova Slu, Leiman IA, Lazutin IuN, Chubarian AV, Pashchenko DG, Tishchenko IS, inventors; FGAOU VO Iuzhnyi federalnyi universitet, FGBU "NMITs onkologii" Minzdrava Rossii, assignees. [Agent having cytotoxic activity on non-small-cell lung cancer cell culture A 549]. Russian Federation patent RU2741311C1. 2021 Jan 25. Russian.]
18. Li LH, Wu P, Lee JY, Li PR, Hsieh WY, Ho CC, Ho CL, Chen WJ, Wang CC, Yen MY, Yang SM, Chen HW. Hinokitiol induces DNA damage and autophagy followed by cell cycle arrest and senescence in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2014;9(8):e104203. doi: 10.1371/journal.pone.0104203.
19. Трещалина ЕМ, Жукова ОС, Герасимова ГК, Андропова НВ, Гарин АМ. Методические указания по изучению противоопухолевой

Assessment of an antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone in A-549 tumor cell subcutaneous xenografts

E.A. Lukbanova¹ • E.V. Zaikina¹ • Yu.A. Sayapin² • E.A. Gusakov³ • S.Yu. Filippova¹ • E.Yu. Zlatnik¹ • A.V. Volkova¹ • L.Z. Kurbanova¹ • D.V. Khodakova¹ • D.O. Kaymakchi¹ • Ju.N. Lazutin¹ • A.N. Shevchenko¹ • O.V. Pandova¹

Rationale: Chemotherapy is one of the lung cancer treatment methods. The search for new substances with antitumor effect against malignant lung neoplasms is relevant because of low efficacy and side effects of cytotoxic agents. A promising substance class with various biological activities, including antitumor, includes alkaloids of the tropolone family, such as heptamers non-benzoid aromatic compounds. 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone has been synthesized in Institute of Physical and Organic Chemistry; it is a new compound belonging to 2-quinoline-2-yl derivatives of 1,3-tropolone.

Aim: To assess the antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone on subcutaneous xenografts of A-549 lung tumor cells in immunodeficient Balb/c Nude mice.

Materials and methods: The study included 50 immunodeficient Balb/c Nude mice divided into 4 experimental groups depending on the dosage of the study substance (0.0055, 0.055, 0.55, and 2.75 mg/g); group 5 was the control group. A-549 cells of lung cancer were used as

a xenograft. The antitumor effect of tropolone was evaluated by the inhibition of tumor growth and the index of tumor growth. The experiment lasted for 36 days starting from the first administration of the substances.

Results: The mean tumor volumes on day 36 of the experiment in the control group and four experimental groups were 2729.5; 2150.8; 1746.4; 952.3 and 678.9 mm³, respectively. The indices of tumor growth in groups 1, 2, 3 and 4 were significantly lower than in group 5 (control) starting from days 24, 21, 21 and 15, respectively, and till the end of the experiment. Maximal differences between groups 4 and 5 were observed at days 33 and 36 (by 3.7, p=0.01 and 4.1, p=0.003 times, respectively).

Discussion: The anti-tumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone demonstrated in the study could be related to various mechanisms. For example, numerous studies have shown that its related compound hinokitiol exerts a cytotoxic effect associated with cessation of the cell cycle, apoptosis induction, DNA damage, and autophagic death of tumor cells.

Conclusion: The study demonstrated significant differences in xenograft volumes in all experimental groups, compared to the control group. In mice, 2.75 mg/g bodyweight was the most effective dosage of the studied compound leading to a slow decrease in tumor growth rates and a decrease in the volumes of subcutaneous xenografts.

Key words: tropolones, anti-tumor effect, Balb/c Nude mice, xenograft, inhibition of tumor growth

For citation: Lukbanova EA, Zaikina EV, Sayapin YuA, Gusakov EA, Filippova SYu, Zlatnik EYu, Volkova AV, Kurbanova LZ, Khodakova DV, Kaymakchi DO, Lazutin JuN, Shevchenko AN, Pandova OV. Assessment of an antitumor effect of 2-(6,8-dimethyl-5-nitro-4-chloroquinoline-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone in A-549 tumor cell subcutaneous xenografts. *Almanac of Clinical Medicine.* 2021;49(6):396–404. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-021.

Received 9 February 2021; revised 16 April 2021; accepted 19 April 2021; published online 26 April 2021



- активности фармакологических веществ. В: Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: Медицина; 2005. с. 637–651. [Treshchalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, Andronova NV, Garin AM. [Guidelines on evaluation of anti-tumor activity of pharmacological compounds]. In: Khabriev RU, editor. [Manual on experimental (preclinical) evaluation of new pharmacological compounds]. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. p. 637–651. Russian.]
20. Zhang G, He J, Ye X, Zhu J, Hu X, Shen M, Ma Y, Mao Z, Song H, Chen F. β -Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(4):255. doi: 10.1038/s41419-019-1492-6.
21. Заборовский АВ, Кокорев АВ, Бродовская ЕП, Фирстов СА, Минаева ОВ, Куликов ОА, Червякова НН, Медвежонков ВЮ. Направленная доставка доксорубина с помощью экзогенных биосовместимых нановекторов при экспериментальных неоплазиях. *Вестник Мордовского университета.* 2017;27(1):93–107. doi: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107. [Zaborovskiy AV, Kokorev AV, Brodovskaya YeP, Firstov SA, Minayeva OV, Kulikov OA, Chervyakova NN, Medvezhonkov VYu. [Targeted delivery of doxorubicin by exogenous biocompatible nanovectors in experimental neoplasia]. *Mordovia University Bulletin.* 2017;1(27):93–107. Russian. doi: 10.15507/0236-2910.027.201701.093-107.]
22. Tu DG, Yu Y, Lee CH, Kuo YL, Lu YC, Tu CW, Chang WW. Hinokitiol inhibits vasculogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells through proteasome-mediated degradation of epidermal growth factor receptor. *Oncol Lett.* 2016;11(4):2934–2940. doi: 10.3892/ol.2016.4300.
23. Chen SM, Wang BY, Lee CH, Lee HT, Li JJ, Hong GC, Hung YC, Chien PJ, Chang CY, Hsu LS, Chang WW. Hinokitiol up-regulates miR-494-3p to suppress BMI1 expression and inhibits self-renewal of breast cancer stem/progenitor cells. *Oncotarget.* 2017;8(44):76057–76068. doi: 10.18632/oncotarget.18648.
24. Yamato M, Ando J, Sakaki K, Hashigaki K, Wataya Y, Tsukagoshi S, Tashiro T, Tsuruo T. Synthesis and antitumor activity of tropolone derivatives. 7. Bistropolones containing connecting methylene chains. *J Med Chem.* 1992;35(2): 267–273. doi: 10.1021/jm00080a010.

Funding

The study has been performed as a part of the state project “Evaluation of anti-tumor activity of new pharmacological substances in in vitro and in vivo models”.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest related to the study.

Authors' contributions

E.A. Lukbanova, the study concept and design, data collection and management, text editing, manuscript submission; E.V. Zaikina, comprehensive assessment of the animals, text writing; Yu.A. Sayapin, synthesis of the study compound, the study concept and design; E.A. Gusakov, synthesis of the study compound, text writing and editing; S.Yu. Filippova, experimental study with cell cultures, data analysis; E.Yu. Zlatnik, analysis and interpretation of the study results, text editing; A.V. Volkova, L.Z. Kurbanova, and D.V. Khodakova, animal experiments, data collection and management; D.O. Kaymakchi and Ju.N. Lazutin, the study concept and design, text editing; A.N. Shevchenko, statistical analysis, text editing; O.V. Pandova, statistical analysis, text editing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ekaterina A. Lukbanova – Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>

✉ 163 Azovskaya ul., Azov, 346783, Russian Federation. Tel.: +7 (863) 300 02 00, ext. 490. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Ekaterina V. Zaikina – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

Yurii A. Sayapin – PhD (in Chem.), Head of Laboratory of Physical Organic Chemistry²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3180-1762>

Evgeniy A. Gusakov – PhD (in Chem.), Research Fellow³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7593-1334>

Svetlana Yu. Filippova – Research Fellow, Cell Technologies Laboratory¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

Elena Yu. Zlatnik – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Laboratory for Immunophenotyping of Tumors¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>

Anastasia V. Volkova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>

Luiza Z. Kurbanova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>

Darya V. Khodakova – Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3753-4463>

Dmitriy O. Kaymakchi – Surgeon, Department of Abdominal Oncology No. 2¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7556-9897>

Jurij N. Lazutin – Oncologist, Department of Thoracic Surgery¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>

Alexey N. Shevchenko – MD, PhD, Professor, Head of Oncological Department¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9468-134X>

Olga V. Pandova – Junior Research Fellow, Department of Neuro-oncology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2218-9345>

¹ National Medical Research Centre for Oncology; 63 14-ya liniya, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

² Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences; 41 Chekhova prospekt, Rostov-on-Don, 344006, Russian Federation

³ Institute of Physical and Organic Chemistry; 194/2 Stachki prospekt, Rostov-on-Don, 344090, Russian Federation



Оригинальная статья

Критерии диагностики лимфопролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа

Федянина О.С.^{1,2} • Чуксина Ю.Ю.³ • Хмелевская А.Н.³ • Хвастунова А.Н.² • Матвеев Ю.Н.³ • Катаева Е.В.³ • Филатов А.В.⁴ • Кузнецова С.А.^{1,2}

Актуальность. В настоящее время диагностика лимфопролиферативных заболеваний базируется на сочетании морфологического исследования мазков крови или костного мозга с иммунофенотипированием методом проточной цитометрии. Проведение иммунофенотипического исследования методом проточной цитометрии возможно только в крупных медицинских центрах, что не всегда удобно для пациента. В этой связи создание доступного метода предварительной диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний, который не требует специального оборудования, представляется актуальной задачей.

Материал и методы. Мононуклеары периферической крови 17 пациентов, поступивших в стационар с подозрением на лимфо-пролиферативное заболевание, и 17 здоровых доноров исследовались на клеточном биочипе для определения доли клеток, положительных по различным поверхностным CD-антигенам. Для верификации диагноза использовали проточную цитометрию.

Результаты. Пациенты с В-клеточными лимфо-пролиферативными заболеваниями (В-ЛПЗ)

статистически значимо отличались от здоровых доноров более низкой долей CD7⁺ (медианы 7 и 73% при сравнении В-ЛПЗ и контроля, $p=2 \times 10^{-6}$; медианы 93 и 7% при сравнении пациентов с Т-клеточными лимфо-пролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ) и В-ЛПЗ, $p=0,032$) и более высокой долей CD19⁺ мононуклеарных клеток периферической крови по сравнению с пациентами с Т-ЛПЗ и здоровыми донорами (медианы 84 и 13% при сравнении пациентов с В-ЛПЗ и контроля, $p=2 \times 10^{-5}$; 84 и 3% при сравнении пациентов с В-ЛПЗ и Т-ЛПЗ, $p=0,033$). Пациенты с В-клеточным хроническим лимфо-лейкозом (В-ХЛЛ) статистически значимо отличались от пациентов с другими В-ЛПЗ более высокой долей CD5⁺ клеток на клеточном биочипе (медианы 72 и 9% при сравнении пациентов с В-ХЛЛ и В-ЛПЗ, $p=0,024$). Пациенты с Т-ЛПЗ статистически значимо отличались от здоровых доноров более низкой долей CD19⁺ клеток (медианы 3 и 13% при сравнении пациентов с Т-ЛПЗ и контроля, $p=0,042$).

Заключение. Показана возможность диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний с использованием разработанного ранее

клеточного биочипа. С его помощью можно рассортировать лейкоциты в пространстве по их поверхностным дифференцировочным антигенам для дальнейшего морфологического анализа. Клеточный биочип позволяет проводить дифференциальную диагностику между В- и Т-ЛПЗ и определять клональность В-лимфоцитов на основе экспрессии легких цепей иммуноглобулинов.

Ключевые слова: лимфо-пролиферативные заболевания, лейкоз, лимфома, В-клеточный хронический лимфолейкоз, клеточный биочип

Для цитирования: Федянина ОС, Чуксина ЮЮ, Хмелевская АН, Хвастунова АН, Матвеев ЮН, Катаева ЕВ, Филатов АВ, Кузнецова СА. Критерии диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):405–411. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-053.

Поступила 21.05.2021; доработана 15.11.2021; принята к публикации 17.11.2021; опубликована онлайн 24.11.2021

Лимфо-пролиферативные заболевания (ЛПЗ) – самый распространенный вид гемобластозов [1, 2]. Диагностика ЛПЗ возможна только в крупных медицинских центрах с использованием дорогостоящего оборудования. В этой связи создание доступных диагностических методов, позволяющих выявить или исключить ЛПЗ, остается актуальной задачей. Одним из таких методов может стать клеточный биочип, разработанный ранее на базе НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева [3, 4]. Анализ крови при помощи клеточного биочипа может быть использован в медицинских учреждениях любого уровня как метод предварительной диагностики, позволяющий предположить наличие ЛПЗ, или как альтернатива проточной цитометрии

в том случае, когда проведение цитометрического анализа по каким-либо причинам невозможно.

Клеточный биочип представляет собой прозрачную пластиковую подложку размером 22×22 мм, на которую в определенном порядке нанесены антитела к поверхностным кластерам дифференцировки (CD-антигенам) лейкоцитов. На биочип наносят суспензию мононуклеарных клеток, выделенную из периферической крови или костного мозга человека, и инкубируют без перемешивания. В процессе инкубации клетки равномерно оседают на поверхность биочипа. Если клетка попадает в область, где иммобилизовано антитело к одному из CD-антигенов, присутствующих на ее поверхности, она связывается с иммобилизованными на биочипе антителами.



Все не связавшиеся с антителами клетки удаляются в процессе отмывки. Таким образом, после отмывки, сушки и окраски по Романовскому – Гимзе на биочипе останутся области со связавшимися клетками, при этом в каждой из областей локализованы клетки, положительные по определенному кластеру дифференцировки. Ранее было показано, что морфология связавшихся на биочипе клеток идентична морфологии аналогичных клеток в мазках как для нормальных лейкоцитов, так и для опухолевых клеток при широком спектре гемобластозов [3, 4]. Кроме того, плотность связывания клеток с антителами к каждому CD-антигену на биочипе, нормированная на плотность связывания клеток с антителами к панлейкоцитарному антигену CD45 или CD45RA, равна доле в исследуемой суспензии клеток, положительных по соответствующему CD-антигену [3]. Следовательно, биочип позволяет определить долю в исследуемой суспензии клеток, положительных по всем CD-антигенам, входящим в его панель, и исследовать отдельно морфологию клеток, несущих на поверхности каждый из этих CD-антигенов.

Цель настоящего исследования – сформулировать критерии определения наличия В-клеточных (В-ЛПЗ) и Т-клеточных лимфопрлиферативных заболеваний (Т-ЛПЗ) на основе данных, полученных с помощью клеточного биочипа при обследовании пациентов с подозрением на ЛПЗ, поступивших для первичной диагностики.

Материал и методы

Пациенты и здоровые доноры. В исследование была включена группа из 17 пациентов, поступивших в стационар с подозрением на ЛПЗ, в возрасте от 42 до 83 лет (соотношение мужчин и женщин составило 10:7), и группа из 17 здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 43 лет (соотношение мужчин и женщин – 5:12). Критерием включения здоровых добровольцев было отсутствие в момент взятия крови острой инфекции и/или обострения хронической. Критерием включения пациентов в данную работу было обнаружение у них ЛПЗ методом проточной цитометрии. Стандартными диагностическими методами у 15 пациентов выявлены В-ЛПЗ (11 пациентов

Федянина Ольга Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела разработок¹, вед. науч. сотр. лаборатории биофизики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>

Чуксина Юлия Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биомедицинских методов исследования³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4744-347X>

Хмелевская Анна Николаевна – мл. науч. сотр. лаборатории биомедицинских методов исследования³

Хвастунова Алина Николаевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биофизики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7117-0168>

Матвеев Юрий Николаевич – старший лаборант лаборатории биомедицинских методов исследования³

Катаева Елена Васильевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения клинической гематологии и иммунотерапии⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

Филатов Александр Васильевич – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

Кузнецова Софья Алексеевна – канд. физ.-мат. наук, заведующая отделом разработок¹, вед. науч. сотр. лаборатории биофизики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>
✉ 117198, г. Москва, ул. Саморы Машела, 1, Российская Федерация. Тел.: +7 (917) 508 45 50. E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ), 3 – с лейкоемизацией лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) и 1 – с лейкоемизацией лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ)), у 2 пациентов – Т-ЛПЗ.

Медиана возраста больных составила 64 года (42–83). Стадию болезни при ХЛЛ оценивали согласно классификации Rai на основании физикального осмотра и дополнительного обследования (компьютерная томография органов грудной клетки, брюшной полости и забрюшинного пространства или ультразвуковое исследование брюшной полости и забрюшинного пространства с рентгенографией органов грудной клетки). II стадия ХЛЛ была установлена у 9 пациентов, IV стадия – у 2, все больные были с показаниями для проведения терапии, у 7 пациентов ХЛЛ был выявлен впервые; 2 пациентам было проведено 2 курса RFC (ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид); 3 пациента исследованы во время рецидива ХЛЛ. Лимфома из клеток маргинальной зоны выявлена у 3 пациентов, все имели IV стадию. У 1 больного диагностирована ЛКМЗ IV стадии. У 1 пациентки установлена лимфома из периферических Т-лимфоцитов, неуточненная, IV стадии, еще у 1 – Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов.

Характеристика исследования. Пилотное, observational, одномоментное, нерандомизированное исследование.

Этическая экспертиза. Протокол исследования одобрен независимым этическим комитетом при ЦТП ФХФ РАН, выписка из протокола от 25.01.2021 №1/1-21(НЭК). Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. От всех людей, ставших объектами исследования, было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов.

Изготовление биочипов. Биочипы изготавливали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [3, 4] с небольшими модификациями. В панель биочипа входили антитела к CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23, CD45, CD56, иммуноглобулинам класса М (IgM)

¹ ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук; 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; 117198, г. Москва, ул. Саморы Машела, 1, Российская Федерация

³ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

⁴ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



(ООО «Сорбент», Москва, Россия) и CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD25, CD33, CD38, CD41a, CD61, CD45RA, CD45RO, CD64, CD117, CD123, CD200, HLA-DR, легким цепям иммуноглобулинов (каппа/лямбда) и смеси мышиных IgG (изотипический отрицательный контроль) (eBioscience, Уолтем, Массачусетс, США).

Выделение лейкоцитов и их анализ. Лейкоциты были выделены из венозной крови, взятой самоотемом в S-Monovette 1,3 мл 106 mM цитрата натрия (рН 5,5) (соотношение крови и цитрата 9:1) или S-Monovette 9 мл 1,6 мг EDTA/мл крови путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 с последующей отмывкой и инкубацией с биочипом при 4 °С в течение 1 часа, процедура описана в [3, 4] с небольшими модификациями (выделенные мононуклеары инкубировались с биочипом в 100% эмбриональной телячьей сыворотке (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Для анализа плотности связывания клеток на биочипе использовали микроскоп Nikon Eclipse Ni, объектив 20× и камеру Nikon DS-Ri1. Плотность связывания на разных анти-CDx была нормирована на плотность связывания в пятне анти-CD45RA.

Проточная цитометрия. Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови и костного мозга проводили с диагностической целью методом 4-/6-цветной лазерной проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр FACSCalibur Becton Dickinson, проточный цитометр Navios, Becton Coulter, США). Использовали моноклональные антитела (МАТ), конъюгированные с флюоресцентными красителями производства BD Biosciences (США). Определяли экспрессию CD45, CD19, CD20, CD22, CD79b, CD23, CD43, CD200, CD25, CD38, CD2, CD4, CD5, CD8, CD7, CD11c, CD103, CD305, CD16, CD56, CD57, CD10, CD45RA, CD45RO, CD123, тип Т-клеточного рецептора (TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$), поверхностную экспрессию легких цепей иммуноглобулинов (Каппа/Lambda). Иммунофенотипическое исследование проводилось с применением стандартной методики пробоподготовки. Критерием позитивности считали наличие экспрессии антигена на поверхности или в цитоплазме более чем 20% опухолевых клеток. Оценку интенсивности экспрессии антигенов проводили по параметру средней интенсивности флюоресценции (англ. mean fluorescence intensity, MFI), выраженной в условных единицах (у.е.).

Статистическую обработку данных и сравнение плотностей связывания клеток по критерию Манна – Уитни выполняли при помощи OriginPro 9 (OriginLab Corp., США). Значимо различающимися считались выборки с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Определение порогов доли В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов среди всех мононуклеаров периферической крови для выделения В-клеточных и Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Основной задачей исследования была разработка критериев наличия В-ЛПЗ или Т-ЛПЗ на основе анализа мононуклеаров периферической крови пациента с помощью клеточного биочипа. Было высказано предположение, что у пациентов с В-ЛПЗ доля клеток, положительных по Т-клеточным маркерам пролиферации, будет значимо снижена, а клеток, положительных по В-клеточным маркерам пролиферации, – значимо повышена по сравнению с нормой за счет размера опухолевой популяции [5], и эти признаки могут быть использованы в качестве первого критерия наличия В-клеточного пролиферативного заболевания. Для проверки этой гипотезы с помощью клеточного биочипа были определены доли мононуклеаров периферической крови, положительных по CD7 для выделения фракции Т-лимфоцитов и CD19 для выделения В-клеток, у 15 пациентов с подтвержденными В-ЛПЗ, 2 пациентов с подтвержденными Т-ЛПЗ и проведено сравнение полученных результатов с аналогичными данными для 17 здоровых доноров. Маркер CD7 был выбран для выделения Т-лимфоцитов потому, что по данным литературы из всех поверхностных CD, характерных для Т-клеток, его низкая или отсутствующая экспрессия при Т-ЛПЗ и аберрантная экспрессия при В-ЛПЗ встречаются реже всего [6, 7].

Доля CD7⁺ клеток среди мононуклеаров периферической крови пациентов с В-ЛПЗ значимо ниже, чем у пациентов с Т-ЛПЗ и здоровых доноров (рис. 1), что может быть использовано в качестве одного из критериев присутствия В-ЛПЗ. И хотя данных для точного определения порогового значения для доли CD7⁺ клеток с целью выделения группы пациентов с В-ЛПЗ методом ROC-анализа недостаточно, из рис. 1 видно, что этот порог будет лежать между 40 и 60%.

Доля мононуклеаров, положительных по CD2 и CD3, также была снижена у пациентов с В-ЛПЗ по сравнению с контролем и пациентами, имеющими Т-ЛПЗ, что хорошо соотносится с результатами проточной цитометрии (данные не показаны). В литературе описана экспрессия CD2 на опухолевых клетках при различных В-ЛПЗ [7, 8], однако среди исследованных пациентов таких случаев не обнаружено.

Доля CD19⁺ клеток среди мононуклеаров периферической крови у пациентов с В-ЛПЗ была статистически значимо выше, чем у пациентов с Т-ЛПЗ и здоровых доноров (рис. 2). Порог по плотности

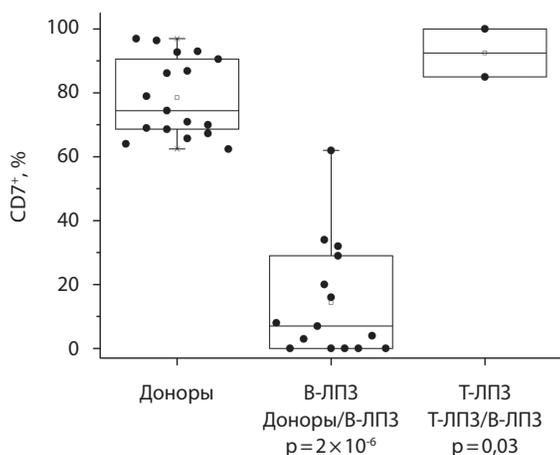


Рис. 1. Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD7 у здоровых доноров, пациентов с В-клеточными (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения $p < 0,05$, посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (└) – минимальное и максимальное значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

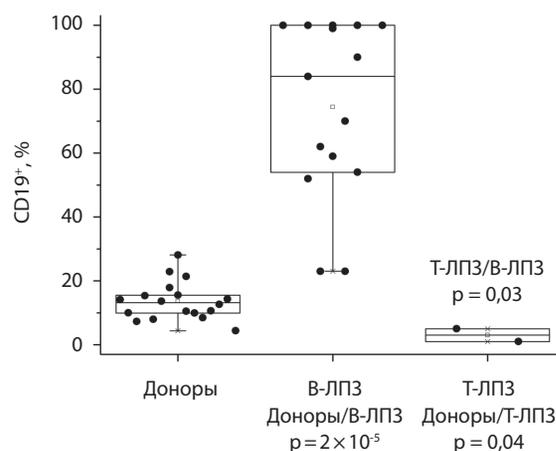


Рис. 2. Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD19 у здоровых доноров, пациентов с В-клеточными (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения $p < 0,05$, посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (└) – минимальное и максимальное значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

заполнения клетками анти-CD19 на клеточном биочипе может быть выбран около 40%. Два наименьших значения доли CD19⁺ клеток среди пациентов с В-ЛПЗ имеют пациенты с ЛКЗМС, но у них доля клеток, положительных по CD20 и CD22, составляла 61–74 и 54–64% соответственно, что значительно превышает долю мононуклеаров, несущих эти поверхностные антигены, у здоровых доноров (4–21 и 4–22% соответственно) [9]. Данный факт уверенно свидетельствует о В-клеточной природе опухолевых клеток и хорошо согласуется с данными проточной цитометрии и данными литературы [10]. Вместе с тем у пациентов с Т-ЛПЗ доля CD19⁺ мононуклеаров была статистически значимо ниже, чем в контроле и у пациентов с В-ЛПЗ (см. рис. 2) с пороговым значением 5%.

На основании полученных результатов в качестве предварительного критерия наличия Т-ЛПЗ по данным анализа мононуклеаров периферической крови с помощью клеточного биочипа может быть предложено значение доли CD19⁺ ниже 5%, а в качестве критерия наличия В-ЛПЗ – значение доли CD7⁺ ниже 40% и максимальное значение из долей CD19⁺, CD20⁺ и CD22⁺ клеток выше 40%.

Определение клональности опухолевых клеток на клеточном биочипе у пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями. Основным признаком ЛПЗ считается клональность опухолевых клеток, определяемая в случае Т-лимфоцитов генетическими методами [11],

а в случае В-лимфоцитов – на основании выявления рестрикции одного из двух вариантов легких цепей иммуноглобулинов (каппа или лямбда) при детекции их мембранной или внутрицитоплазматической экспрессии с помощью анти-каппа и анти-лямбда антител методом проточной цитометрии. Методом клеточного биочипа клональность опухолевых клеток пациентов с В-ЛПЗ определяли на основании долей каппа⁺ и лямбда⁺ клеток среди мононуклеаров периферической крови. У 13 из 15 пациентов с В-ЛПЗ доля каппа⁺ или лямбда⁺ клеток превышала другую в 3 и более раз, и преобладающая легкая цепь определяла клональность опухолевых клеток. У 2 из 15 пациентов (пациент с В-ХЛЛ и пациент с ЛКМЗС) доля каппа⁺ клеток превышала долю лямбда⁺ клеток незначительно, в 1,2 и 2 раза соответственно, в этом случае клональность определяли при помощи морфологического исследования клеток, связавшихся с антителами к каппа и лямбда легким цепям иммуноглобулинов, по тому, с каким из антител связалось больше клеток с патологической морфологией. Клональность опухолевых В-клеток, определенная с помощью клеточного биочипа описанным способом, для всех пациентов совпала с клональностью, определенной цитометрически.

Дифференциальная диагностика В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний с помощью клеточного биочипа. Следующей задачей работы была выработка критериев дифференциальной диагностики пациентов,

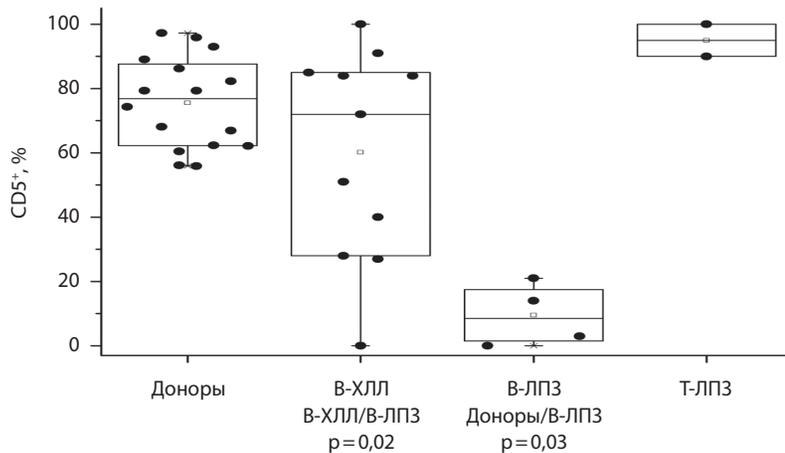


Рис. 3. Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD5 у здоровых доноров, пациентов с хроническим В-клеточным лимфолейкозом (В-ХЛЛ), другими В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения $p < 0,05$, посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (└) – минимальное и максимальные значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

выделенных на основании предложенных выше критериев наличия В-ЛПЗ. Как было показано ранее [3], в тех случаях когда опухолевые клетки могут быть выявлены морфологически, диагностика может быть проведена на основе морфологической картины опухолевых клеток и набора CD на их поверхности, определяемого как набор тех антител на биочипе, с которыми наблюдается связывание клеток патологической морфологии. Исключение – ХЛЛ, клетки которого морфологически неотличимы от зрелых лимфоцитов, и поэтому его диагностика с помощью биочипа должна проводиться на основе распределения доли мононуклеарных клеток, положительных по различным поверхностным антигенам.

Хронический В-клеточный лимфолейкоз – самое распространенное онкогематологическое заболевание у людей европеоидной расы [12]. Для

В-ХЛЛ типично накопление зрелых клональных В-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные CD5, CD19 и CD23 антигены [13]. В наше исследование было включено 11 пациентов с диагнозом В-ХЛЛ. Поскольку опухолевая популяция при В-ХЛЛ характеризуется коэкспрессией CD5 и CD19, мы проанализировали долю CD5⁺ мононуклеаров периферической крови у пациентов с В-ХЛЛ и другими В-ЛПЗ.

Как видно из рис. 3, доля CD5⁺ мононуклеаров периферической крови, определенная с помощью клеточного биочипа, статистически значимо выше у пациентов с В-ХЛЛ, чем с другими В-ЛПЗ. Коэкспрессия CD5 и CD19 характерна также для пациентов с ЛКМЗ. В нашей выборке был 1 пациент с данным диагнозом, однако при исследовании его крови на клеточном биочипе на анти-CD5 не было обнаружено ни связывания значимого количества мононуклеаров, ни клеток с характерной для ЛКМЗ морфологией. Предварительные данные, опубликованные ранее [3], позволяют предположить, что для дифференциальной диагностики двух CD5⁺ В-ЛПЗ на клеточном биочипе могут быть использованы данные о доле CD23⁺ и CD200⁺ клеток и наличии среди них клеток с морфологией опухолевых клеток при ЛКМЗ [14], однако для выработки соответствующих критериев необходимо проведение дополнительных исследований.

Для пациентов с ЛКМЗ и ЛКМЗС с помощью клеточного биочипа было проведено определение иммунофенотипа и клональности (каппа/лямбда) опухолевых клеток как набора поверхностных антигенов, с антителами которых связываются клетки соответствующих лимфом. Полученные результаты в сравнении с данными проточной цитометрии представлены в таблице. Данные, полученные на клеточном биочипе, совпадали с данными цитометра в 100% случаев для маркеров CD19, CD20, CD22, CD23 и экспрессии легких цепей иммуноглобулинов; не совпали в 1 случае для маркеров CD5 и CD25; данные для CD11c и CD200 не совпали ни у одного из 3 пациентов. Несовпадение экспрессии маркеров может быть объяснено, во-первых, пониженной экспрессией этого маркера на поверхности опухолевых клеток, что приводит к недостаточно прочному связыванию данных клеток с соответствующим анти-CDx на клеточном биочипе и удалению клеток при отмывке. Второй причиной может быть использование различных клонов антител на биочипе и на цитометре.

Заключение

Определены критерии для дифференциальной диагностики В-ЛПЗ и Т-ЛПЗ при помощи

Сравнение экспрессии специфических антигенов и клональности опухолевых клеток у пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны и лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, определенной на биочипе и цитометрически

Антиген	CD5	CD11c	CD19	CD20	CD22	CD23	CD25	CD200	κ/λ
Биочип	1(3)	0(3)	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	1(3)	0(3)	2(4)
Цитометр	2(3)	3(3)	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	2(3)	3(3)	2(4)
Соответствие, %	67	0	100	100	100	100	67	0	100

Данные приведены в формате А(Б), где А – число пациентов, у которых была обнаружена экспрессия данного антигена на опухолевых клетках при помощи цитометра (в строчке «цитометр») или опухолевая клетка в соответствующем анти-CDx пятне биочипа (в строчке «биочип»), Б – общее количество пациентов, у которых определяли экспрессию данного антигена обоими методами



клеточного биочипа. Показано, что пациенты с В-ЛПЗ статистически значимо отличаются низкой долей CD7⁺ и высокой долей CD19⁺ мононуклеаров периферической крови по сравнению с пациентами с Т-ЛПЗ и здоровыми донорами. Пациентов с В-ХЛЛ можно достоверно отличить

на клеточном биочипе от пациентов с другими В-ЛПЗ по большей доле CD5⁺ клеток. Пациенты с Т-ЛПЗ статистически значимо отличаются на клеточном биочипе от здоровых доноров более низкой долей CD19⁺ мононуклеарных клеток в периферической крови. 

Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено при финансовом обеспечении ФГБУ «НИИЦ центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и ЦТП ФХФ РАН.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

О.С. Федянина – выполнение анализов венозной крови здоровых доноров на клеточном биочипе, анализ результатов, статистическая обработка данных, написание текста; Ю.Ю. Чуксина – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, выполнение иммунофенотипического исследования пациентов при помощи проточной цитометрии, написание текста; А.Н. Хмелевская – выполнение анализов

венозной крови пациентов на клеточном биочипе, редактирование рукописи; А.Н. Хвастунова – анализ результатов, подсчет плотности связывания клеток по клеточному биочипу здоровых доноров и пациентов при помощи программы ImageJ, редактирование рукописи; Ю.Н. Матвеев – выполнение анализов венозной крови пациентов на клеточном биочипе, редактирование рукописи; Е.В. Катаева – предоставление материала для исследований, редактирование рукописи; А.В. Филатов – разработка панели антител, редактирование рукописи; С.А. Кузнецова – концепция и дизайн исследования, выполнение анализов венозной крови пациентов на клеточном биочипе, анализ полученных данных, написание текста. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1): 7–33. doi: 10.3322/caac.21654.
2. Самойлова ОС. Современное лечение хронического лимфолейкоза в реальной клинической практике. Новые возможности и новые сложности. Современная онкология. 2016; 18 (5): 16–19. [Samoylova OS. [Current treatment of chronic lymphocytic leukemia. New opportunities and new difficulties]. *Journal of Modern Oncology.* 2016;18(5):16–19.]
3. Khvastunova AN, Kuznetsova SA, Al-Radi LS, Vylegzhaniya AV, Zakirova AO, Fedyanina OS, Filatov AV, Vorobjev IA, Ataullakhanov F. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep.* 2015;5:12573. doi: 10.1038/srep12573.
4. Хвастунова АН, Аль-Ради ЛС, Капранов НМ, Федянина ОС, Горгидзе ЛА, Луговская СА, Наумова ЕВ, Джулакян УЛ, Филатов АВ, Атауллаханов ФИ, Кузнецова СА. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология.* 2015;10(1):37–45. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45. [Khvastunova AN, Al-Radi LS, Kapranov NM, Fedyanina OS, Gorgidze LA, Lugovskaya SA, Naumova EV, Dzhulakyan UL, Filatov AV, Ataullakhanov FI, Kuznetsova SA. [Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia]. *Oncohematology.* 2015;10(1):37–45. Russian. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.]
5. de Weerd Iris, Hofland T, de Boer R, Dobber JA, Dubois J, van Nieuwenhuize D, Mobasher M, de Boer F, Hoogendoorn M, Velders GA, van der Klift M, Remmerswaal EBM, Bemelman FJ, Niemann CU, Kersting S, Levin MD, Eldering E, Tonino SH, Kater AP. Distinct immune composition in lymph node and peripheral blood of CLL patients is reshaped during venetoclax treatment. *Blood Adv.* 2019;3(17):2642–2652. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000360.
6. Gorczyca W, Weisberger J, Liu Z, Tsang P, Hussein M, Wu CD, Dong H, Wong JYL, Tugulea S, Dee S, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry.* 2002;50(3):177–190. doi: 10.1002/cyto.10003.
7. Kaleem Z, White G, Zutter MM. Aberrant expression of T-cell-associated antigens on B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(3):396–403. doi: 10.1309/v8yg-8pp4-b4te-9x6j.
8. Kingma DW, Imus P, Xie XY, Jasper G, Sorbara L, Stewart C, Stetler-Stevenson M. CD2 is expressed by a subpopulation of normal B cells and is frequently present in mature B-cell neoplasms. *Cytometry.* 2002;50(5):243–248. doi: 10.1002/cyto.10131.
9. Федянина ОС, Задорожная АЕ, Хвастунова АН, Кольцова ЕМ, Балашова ЕН, Тимофеева ЛА, Караваева АЛ, Шаманова МБ, Волков СН, Бурова ОС, Дашкевич НМ, Филатов АВ, Кузнецова СА. Исследование клеточного состава и морфологии лейкоцитов доношенных и недоношенных новорожденных при помощи клеточного биочипа. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2018;17(4):11–16. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-11-16.
10. Fedyanina OS, Zadorozhnaya AE, Khvastunova AN, Koltsova EM, Balashova EN, Timofeeva LA, Karavaeva AL, Shamanova MB, Volkov SN, Burova OS, Dashkevich NM, Filatov AV, Kuznetsova SA. [Leukocyte subgroup distribution and morphology in blood of premature and full-term newborn babies studied by the cell microarray]. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2018;17(4):11–16. Russian. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-11-16.]
10. D'Areola G, Musto P, Cascavilla N, Dell'Olio M, Di Renzo N, Carotenuto M. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol.* 2000;64(4):275–281. doi: 10.1002/1096-8652(200008)64:4<275::aid-ajh7>3.0.co;2-y.
11. Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol.* 2018;71(3):195–200. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204761.
12. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, O'Brien S, Gribben J, Rai K. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:16096. doi: 10.1038/nrdp.2016.96.
13. Chiorazzi N, Chen SS, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021;11(2):a035220. doi: 10.1101/cshperspect.a035220.
14. Debord C, Wuillème S, Eveillard M, Theisen O, Godon C, Le Bris Y, Béné MC. Flow cytometry in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(S1): 113–120. doi: 10.1111/ijlh.13170.



Diagnostic criteria of lymphoproliferative diseases from the peripheral blood samples using a cell biochip

O.S. Fedyanina^{1,2} • Yu.Yu. Chuksina³ • A.N. Khmelevskaya³ • A.N. Khvastunova² • Yu.N. Matveev³ • E.V. Kataeva³ • A.V. Filatov⁴ • S.A. Kuznetsova^{1,2}

Background: At present, the diagnosis of lymphoproliferative disorders is based on the combination of blood or bone marrow smear morphology and immunophenotyping by flow cytometry. Immunophenotypic testing by flow cytometry technique is available only in big medical centers, which is not always convenient for a patient. Therefore, development of an available method for preliminary diagnosis of lymphoproliferative diseases not requiring special equipment seems relevant.

Materials and methods: Peripheral blood mononuclear cells from 17 patients admitted to the hospital with suspicion of a lymphoproliferative disorder, and 17 healthy donors were studied on a cell biochip for determination of proportions of cells positive for various surface CD antigens. The diagnosis was verified by flow cytometry.

Results: Compared to healthy controls and patients with T-cell lymphoproliferative disorders (TCLPD), the patients with B-cell lymphoproliferative disorders (BCLPD) had significantly lower proportion of CD7⁺ cells (medians, 7% and 73% respectively, $p=2 \times 10^{-6}$ for comparison with healthy controls; median 7% and 93% for comparison with TCLPD, $p=0.032$). In addition, the patients with BCLPD had higher proportion of peripheral CD19⁺ mononuclear cells, compared to that in the patients with TCLPD and healthy donors (medians 84% and 13% for comparison between BCLPD and healthy control, $p=2 \times 10^{-5}$; 84% and 3% for comparison of BCLPD and TCLPD, $p=0.033$). The

patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia had significantly higher CD5⁺ cells in the cell biochip compared to the patients with other BCLPD (medians 72% and 9%, $p=0.024$). The patients with TCLPD had significantly lower proportion of CD19⁺ cells than the healthy controls (medians, 3% and 13%, respectively, $p=0.042$).

Conclusion: The study has demonstrated the potential to use the previously developed cell biochip for diagnosis of lymphoproliferative diseases. The biochip makes it possible to sort out white blood cells according to their surface differentiation antigen for their further morphological analysis. The cell biochip allows for the differential diagnosis between BCLPD and TCLPD and determination the lymphocyte clones based on the expression of immunoglobulin light chains.

Key words: lymphoproliferative diseases, leukemia, lymphoma, B-cell chronic lymphocytic leukemia, cell biochip

For citation: Fedyanina OS, Chuksina YuYu, Khmelevskaya AN, Khvastunova AN, Matveev YuN, Kataeva EV, Filatov AV, Kuznetsova SA. Diagnostic criteria of lymphoproliferative diseases from the peripheral blood samples using a cell biochip. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):405–411. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-053.

Received 21 May 2021; revised 15 November 2021; accepted 17 November 2021; published online 24 November 2021

Funding

The study was performed with financial support from Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI) and Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology.

Conflict of interests

The authors declare no obvious and potential conflicts of interests associated with the manuscript.

Authors' contributions

O.S. Fedyanina, analysis of venous blood samples from the healthy control with the cell biochip, analysis of the results, statistical analysis, text writing; Yu.Yu. Chuksina, the study concept and design, analysis of the study data, immunophenotypic testing by flow cytometry, text writing; A.N. Khmelevskaya, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, editing of the manuscript; A.N. Khvastunova, analysis of the results, calculation of the cell binding density within the cell biochip for the healthy donors and patients with the ImageJ software, editing of the manuscript; Yu.N. Matveev, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, editing of the manuscript; E.V. Kataeva, data collection, text editing; A.V. Filatov, preparation of the antibody panel, editing of the manuscript; S.A. Kuznetsova, the study concept and design, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, data analysis, text writing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

Olga S. Fedyanina – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Engineering Department¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>

Yuliya Yu. Chuksina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Biomedical Research Methods²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4744-347X>

Anna N. Khmelevskaya – Junior Research Fellow, Laboratory of Biomedical Research Methods³

Alina N. Khvastunova – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Biophysics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7117-0168>

Yuriy N. Matveev – Senior Technician, Laboratory of Biomedical Research Methods³

Elena V. Kataeva – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

Alexandr V. Filatov – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Immunochemistry⁴; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

Sofya A. Kuznetsova – PhD (in Phys. and Math.), Head of Engineering Department¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>

✉ 1 Samory Mashela ul., Moscow, 117198, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 508 45 50. E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

¹Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences; 30 Srednyaya Kalitnikovskaya ul., Moscow, 109029, Russian Federation

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela ul., Moscow, 117198, Russian Federation

³Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

⁴National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russian Federation



Оригинальная статья

Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлюориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека

Сустретов А.С.¹ • Богуш В.В.¹ • Гусева О.С.¹ • Ильясов П.В.¹ • Лимарева Л.В.¹

Актуальность. Исследование структурных особенностей и функционального состояния клеток иммунной системы и прежде всего лимфоцитов имеет большое значение как для фундаментальной, так и для клинической медицины. Необходима разработка простых и надежных методов анализа, позволяющих быстро и эффективно оценивать активность клеток в реальном времени.

Цель – оценить эффективность использования метода интерференционной микроскопии в сравнении с классическими методами (ДНК-спектрометрия, ДНК-цитометрия и проточная цитофлюориметрия с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)) при оценке индуцированной фитогемагглютинином (ФГА) пролиферации лимфоцитов крови человека.

Материал и методы. ФГА-индуцированную пролиферативную активность лимфоцитов крови 10 здоровых добровольцев оценивали с использованием различных методических подходов. Бласт-трансформацию лимфоцитов вызывали их инкубацией в течение 5 суток в присутствии 5 мкг/мл ФГА. Пролиферативную активность клеток оценивали 1) методом ДНК-метрии – в специализированном планшете Tecan NanoQuant Plate™ путем измерения оптической плотности, на планшет-ридере Infinite 200 Pro; 2) методом цитофотометрии с последующим анализом распределения клеток по содержанию дезоксирибонуклеиновой кислоты

(ДНК) после окраски красителем Фельгена с помощью системы визуализации на базе светового микроскопа Olympus BX41, видеокамеры ProgRes CF; 3) методом проточной цитометрии с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE, анализ проводили на проточном цитометре BD FACS Calibur; 4) измерением параметров интерференционного профиля лимфоцитов при помощи модуляционного интерференционного микроскопа МИМ-340 («Швабе», Россия). В качестве критерия оценки функционального состояния лимфоцитов определяли функциональную активность ядра (англ. functional activity of the nucleus, FAN).

Результаты. Инкубация лимфоцитов с ФГА приводила к увеличению линейного размера клеток на $22,2 \pm 2,8\%$ мкм, уменьшению фазовой высоты на $46,3 \pm 4,7\%$ нм ($p = 0,019$) и увеличению FAN на $75,9 \pm 9,4\%$ по сравнению с контролем ($p = 0,046$). По данным спектроскопии выделенной ДНК, стимуляция лимфоцитов ФГА сопровождалась увеличением количества ДНК на 55% по сравнению с исходным значением (до $409,8 \pm 22,3$ против $264,3 \pm 25,0$ нг/мкл, $p = 0,049$). Реакция Фельгена выявила, что в контрольной выборке ядра, содержащие ДНК в количестве, превышающем $2n$, составляют 2%, а в выборке активированных ФГА лимфоцитов – 14,8% с разницей между группами 12,8%. Окраска лимфоцитов CFSE с последующей инкубацией проточной цитофлюориметрией культивированных клеток показала повышение процента пролиферирующих клеток с $1,68 \pm 0,9\%$ в контроле до

$55,56 \pm 5,6\%$ ($p = 0,00068$) под влиянием митогена.

Заключение. По сравнению с классическими методами оценки активности лимфоцитов метод модуляционной интерференционной микроскопии не требует пробоподготовки, показывает сопоставимую и даже большую эффективность, при этом позволяет изучать функциональное состояние лимфоцитов в реальном времени в динамике культивирования. Это открывает широкие возможности для оценки клеток иммунной системы в исследовательских и диагностических целях.

Ключевые слова: лимфоциты, пролиферация, модуляционная интерференционная микроскопия, проточная цитофлюориметрия, ДНК-цитометрия, ДНК-спектрофотометрия

Для цитирования: Сустретов АС, Богуш ВВ, Гусева ОС, Ильясов ПВ, Лимарева ЛВ. Сравнение методов модуляционной интерференционной микроскопии, ДНК-спектрометрии, ДНК-цитометрии и проточной цитофлюориметрии при оценке индуцированной фитогемагглютинином активности лимфоцитов крови человека. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):412–418. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-054.

Поступила 31.05.2021; доработана 19.11.2021; принята к публикации 22.11.2021; опубликована онлайн 06.12.2021



Исследование структурных особенностей и функционального состояния клеток иммунной системы имеет большое значение как для фундаментальной, так и для клинической медицины. В настоящее время разработан и клинически валидирован ряд методов оценки иммунного статуса, основанных на анализе популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов с помощью проточной цитофлуориметрии, а также на определении содержания различных молекул иммунной системы в биопробах методами иммуноферментного анализа. При этом методы оценки клеточных иммунных реакций *in vitro* применяют в рутинной диагностике гораздо реже прежде всего из-за технической сложности, длительной пробоподготовки, отсутствия стандартизации и, вследствие этого, довольно значительной вариабельности результатов.

В этой связи остается актуальным поиск быстрых, простых, поддающихся стандартизации инструментов анализа для практического использования в клеточной иммунологии [1–3]. Перспективными в этом плане представляются методы, базирующиеся на применении технологий лазерной интерференционной микроскопии, поскольку с их помощью можно за короткий промежуток времени оценивать фазовые характеристики лимфоцитов [4–7]. Данный вид лазерной микроскопии, совмещая возможности оптической и электронной микроскопии, позволяет работать с биологическими объектами в режиме реального времени. Применение модуляционной интерференционной микроскопии дает ряд преимуществ для медико-биологических исследований, обеспечивая возможность количественной и качественной оценки функциональной морфологии нативных клеток, неинвазивного исследования состояния биологических микрообъектов, мониторинга динамики внутриклеточных процессов, при этом не требует фиксации, окрашивания и других процедур пробоподготовки [8, 9].

Благодаря появлению отечественных лазерных интерференционных микроскопов количество научных публикаций с описанием изменения фазовых параметров клеток крови при различной патологии растет. Однако при анализе литературы нами не были найдены данные сравнения эффективности метода модуляционной интерференционной микроскопии и классических методов оценки пролиферативной активности лимфоцитов *in vitro*.

Цель работы – оценить эффективность использования метода интерференционной микроскопии в сравнении с классическими методами (ДНК-спектрометрия, ДНК-цитометрия и проточная цитофлуориметрия с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE) при оценке индуцированной фитогеммагглютинином (ФГА) пролиферации лимфоцитов крови человека.

Материал и методы

Была проведена оценка ФГА-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов с использованием различных методических подходов.

Постановка реакции бласт-трансформации лимфоцитов. Лимфоциты (мононуклеарные лейкоциты крови) выделяли из гепаринизированной венозной крови 10 взрослых здоровых добровольцев методом градиентного центрифугирования, используя раствор фиколла с плотностью 1,077 г/см³ («ПанЭко», Россия). Подсчет клеток и оценку жизнеспособности проводили в камере Горяева с окраской 0,1% трипановым синим, показатель жизнеспособности > 90% считали удовлетворительным. Затем лимфоциты инкубировали с ФГА производства «Sigma-Aldrich» (США) в концентрации 5 мкг/мл в течение 5 суток в полной питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином, стрептомицином, herpes 20 мг/мл, 10% эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Россия) при 37 °С и 5% CO₂. Посевная доза – 800 тыс./400 мкл. В качестве контроля использовали лимфоциты, инкубированные в полной питательной среде RPMI-1640 без добавления ФГА.

Измерение параметров интерференционного профиля лимфоцитов при помощи модуляционного интерференционного микроскопа МИМ-340 («Швабе», Россия). В основе метода лежит принцип измерения локальных фаз промодулированной объектом световой волны. Источник света – гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм, увеличение в канале регистрации 500×. Суспензию лимфоцитов после активации помещали на зеркальное стекло, покрывали покровным стеклом, затем определяли параметры интерференционного профиля. Проводили измерение 50–100 исследуемых клеток. В качестве критерия оценки функционального состояния лимфоцитов определяли функциональную активность ядра (англ. functional activity of the nucleus, FAN) как величину, обратно пропорциональную фазовой высоте (англ. phase thickness, PT) каждой клетки в выборке, характеризующую конформационное

Сустретов Алексей Сергеевич – науч. сотр. лаборатории иммунологии и молекулярной генетики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3021-2130>

Богущ Ванда Витальевна – науч. сотр. лаборатории иммунологии и молекулярной генетики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7597-449X>

Гусева Ольга Сергеевна – канд. вет. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>

Ильясов Павел Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биохимии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>

Лимарева Лариса Владимировна – д-р биол. наук, доцент, директор¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>
✉ 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 20, Российская Федерация. Тел.: +7 (846) 374 10 04 (доб. 42 07, 42 04). E-mail: l.v.limareva@samsmu.ru

¹ Институт экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России; 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 20, Российская Федерация

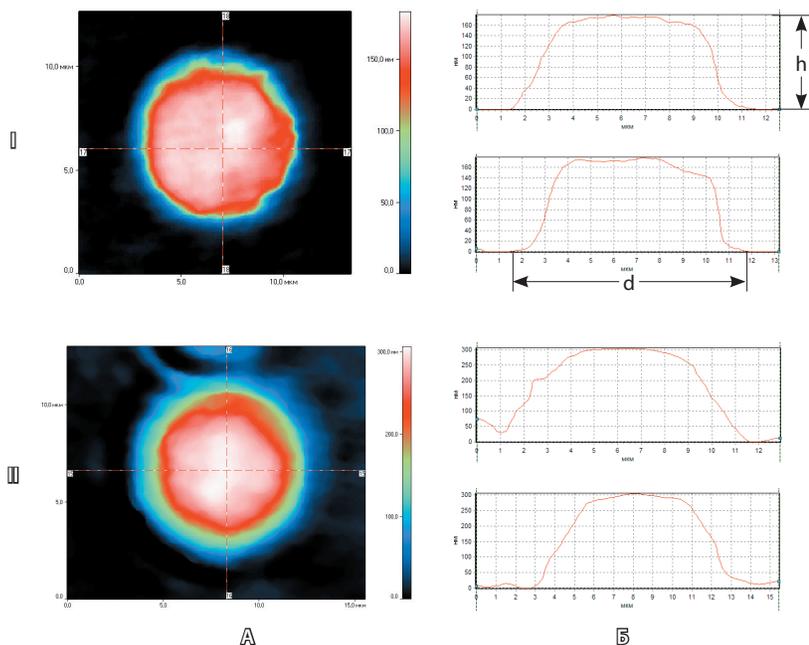


Рис. 1. Топограмма (А) и фазово-интерференционный профиль (Б) лимфоцита. I – индукция фитогемагглютинином в течение 5 суток, II – контроль; d – диаметр клетки, h – фазовая высота

состояние нуклеолярных белков и степень деконденсации хроматина по формуле: $FAN = (3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1 + 0 \times n_0) / n$, где n_3 – количество клеток с $PT \leq 150$ нм; n_2 – с $PT > 150$, но ≤ 200 нм; n_1 – с $PT > 2$, но ≤ 250 нм; n_0 – с $PT > 250$ нм; n – число клеток в выборке [10].

Применяли следующие методы ДНК-метрии.

Спектрофотометрия ДНК. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из суспензии лимфоцитов после инкубации выполняли с использованием набора ДНК-Экспресс Кровь (ООО «Литех», Россия). Далее 2 мкл раствора выделенной ДНК переносили в лунки специализированного планшета Tecan NanoQuant Plate и измеряли

оптическую плотность при длине волны 260 нм на планшет-ридере Infinite 200 Pro с использованием программного обеспечения Tecan i-control, получая на выходе значение концентрации ДНК нг/мкл.

Реакция Фельгена – цитофотометрия с анализом распределения клеток по содержанию ДНК после окраски красителем Фельгена. Реакция основана на свойстве реактива Шиффа (фуксинсернистая кислота) взаимодействовать с альдегидными группами молекулы ДНК, предварительно подвергшейся гидролизу соляной кислотой [11]. Дальнейшую денситометрию ядер проводили при увеличении $\times 100$ с помощью системы визуализации на базе светового микроскопа Olympus BX41, видеокамеры ProgRes CF с использованием программы «Морфология 5.2» («ВидеоТест», Санкт-Петербург, Россия).

Метод проточной цитометрии с использованием интернализированной флуоресцентной метки CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). Окрашивание лимфоцитов CFSE («Sigma», Германия) перед инкубацией проводили, используя концентрацию 2,5 мкг/мл в диметилсульфоксиде. Анализ выполняли на проточном цитометре BD FACS Calibur с помощью программы Cell Quest Pro.

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием пакета Statistica 6.0 (StatSoft, США). Данные представляли как среднее и стандартное отклонение. Для оценки количественных переменных использовали расчет U-критерия Манна – Уитни. Различия при $p \leq 0,05$ считали статистически значимыми.

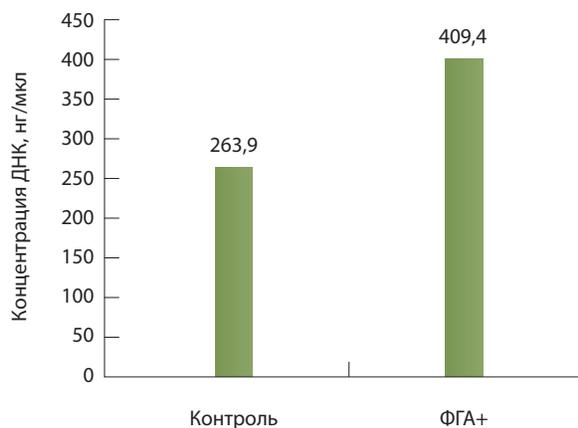
Результаты

Метод модуляционной интерференционной микроскопии

На топограммах контрольных лимфоцитов четко выявлялись ядро, ядрышко с однородной, близкой к кольцевой, структурой и цитоплазма (рис. 1, IА). Фазовая высота любой мононуклеарной клетки зависит в первую очередь от степени упаковки хроматина в ядре и активности процессов белкового синтеза. Таким образом, фазовая высота – объективный количественный параметр, отражающий степень активации лимфоцитов и позволяющий регистрировать процесс в самой ранней фазе. Максимальная фазовая высота у контрольных лимфоцитов достигала 242 нм при среднем диаметре $9 \pm 0,1$ мкм (рис. 1, IБ).

Активация ФГА приводила к изменениям интерференционного профиля лимфоцитов: фазовая высота снижалась минимально до 130–135 нм, а диаметр увеличивался до $11,0 \pm 0,5$ мкм

Рис. 2. Репрезентативная гистограмма содержания ДНК лимфоцитов в ответ на действие митогена фитогемагглютинина (ФГА) (5 мкг/мл); Контроль – полная культуральная среда без ФГА, ФГА+ – лимфоциты с добавлением митогена (коэффициент вариации $\leq 1,899\%$)



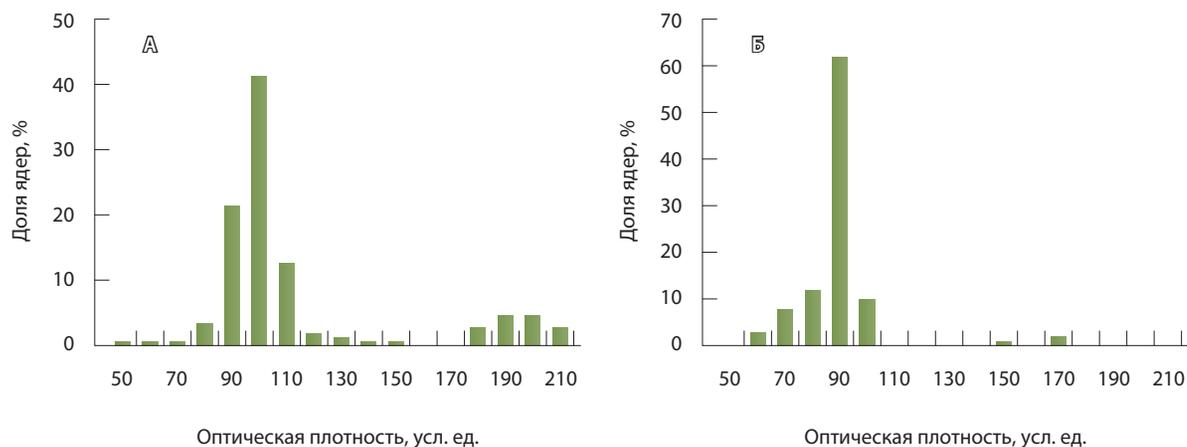


Рис. 3. Репрезентативная гистограмма распределения ядер лимфоцитов по оптической плотности. Окраска по Фельгену. **А** – реакция бласт-трансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином (ФГА, 5 мкг/мл, 5 суток). 14,8% ядер с содержанием ДНК более 150 усл. ед.; **Б** – контроль: среда без ФГА. 2% ядер с содержанием ДНК более 150 усл. ед.

(рис. 1, Б). При этом для топограмм активированных лимфоцитов (рис. 1, А) было характерно увеличение диаметра ядрышек и изменение их структуры. Эти изменения можно объяснить данными по электронной микроскопии лимфоцитов, полученными в работе [7], которые указывают на то, что при активации клетки в ядре происходит перераспределение гетерохроматина к периферии, заметное снижение его электронной плотности, а в ядрышке идентифицируются множественные фибриллярные центры, окруженные плотным фибриллярным и гранулярным компонентом.

Показатель FAN в группе контроля составил $1,53 \pm 0,02$, в опытной группе – $2,05 \pm 0,05$. Инкубация лимфоцитов с ФГА приводила к увеличению линейного размера клеток на $22,2 \pm 2,8\%$ мкм, уменьшению фазовой высоты на $46,3 \pm 4,7\%$ нм ($p=0,019$) и увеличению FAN на $75,9 \pm 9,4\%$ по сравнению с контролем ($p=0,046$), что свидетельствует о более предпочтительном использовании показателя FAN для оценки ФГА-индуцированной пролиферации лимфоцитов.

Методы ДНК-метрии

Измерение выделенной ДНК. На рис. 2 представлены репрезентативные результаты изменения содержания ДНК в лимфоцитах в ответ на действие митогена ФГА. При анализе выборки были получены следующие данные, отражающие пролиферативную активность клеток: стимуляция лимфоцитов ФГА сопровождалась увеличением количества ДНК на 55% – до $409,8 \pm 22,3$ нг/мкл по сравнению с исходным значением $264,3 \pm 25,0$ нг/мкл ($p=0,049$).

Реакция Фельгена. На рис. 3 отражены репрезентативные результаты денситометрии ядер лимфоцитов, окрашенных по Фельгену, после активации ФГА.

При анализе контрольной выборки было получено унимодальное распределение, для активированных ФГА лимфоцитов было характерно бимодальное распределение. Обращает на себя внимание тот факт, что моды в зоне диплоидных клеток не совпадают, мода выборки активированных лимфоцитов смещена относительно контрольных показателей вправо, в сторону больших значений. По-видимому, это происходит вследствие разницы скорости гидролиза ДНК в плотных и очень рыхлых ядрах [12]. Это не мешает сравнению выборок в тех случаях, когда распределения в зоне диплоидных и тетраплоидных ядер не накладываются частично друг на друга, но затрудняет анализ при их перекрытии. В контрольной выборке ядра, содержащие ДНК в количестве, превышающем $2n$ (более 150 усл. ед.), составляют 2%, а в выборке

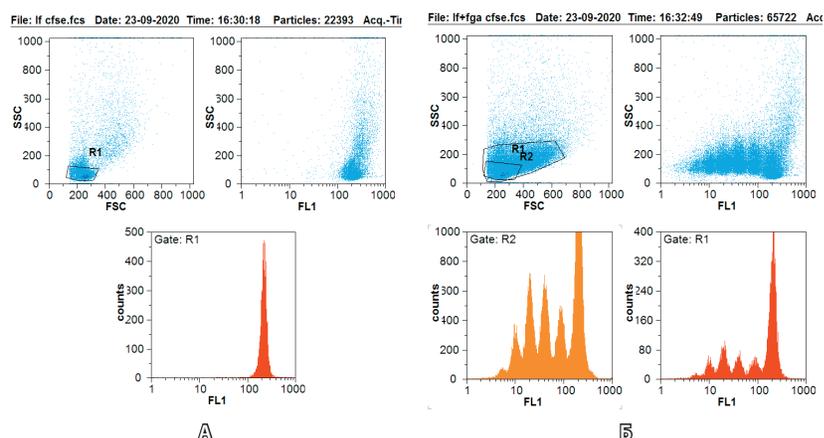


Рис. 4. Репрезентативные гистограммы распределения лимфоцитов по параметрам рассеяния и по интенсивности флуоресценции CFSE. **А** – контрольные лимфоциты, **Б** – фитогемагглютинин (ФГА)-индуцированные. R1 – гейт стандартной по параметрам светорассеяния области лимфоцитов, R2 – гейт по области всех лимфоцитов, включая ФГА-активированные



Интенсивность флуоресценции CFSE в лимфоцитах по пикам, отражающим генерации клеток, %

Лимфоциты	1-й пик (максимальная флуоресценция)	2-й пик	3-й пик	4-й пик	5-й пик	6-й пик (минимальная флуоресценция)
Контроль	98,5 ± 1,9	1,68 ± 0,9	–	–	–	–
ФГА+	36,9 ± 4,8	11,2 ± 1,9	15,3 ± 1,2	18,1 ± 2,0	8,3 ± 0,5	1,6 ± 0,4

ФГА+ – индукция фитогемагглютинином

Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M ± SD)

активированных ФГА лимфоцитов – 14,8%. Разница между группами – 12,8%. При этом распределения диплоидных и тетраплоидных ядер не перекрываются, что делает возможным сравнение их количества. Результаты денситометрии ядер лимфоцитов, окрашенных по Фельгену, позволили оценить степень ФГА-индуцированной активации лимфоцитов, однако для проведения полноценного статистического анализа требовались измерения в нескольких сотнях ядер, что достаточно трудозатратно и неэффективно.

Проточная цитометрия с использованием CFSE. CFSE представляет собой интернализуемую флуоресцентную метку, способную пассивно проникать внутрь клетки. Конъюгат красителя с белками, который формируется в меченых клетках, сохраняется этими клетками в течение всего развития, а также во время мейоза. Метка равномерно передается дочерним клеткам после клеточного деления и никогда не передается соседним клеткам в культуре. При делении концентрация метки в дочерних клетках снижается ровно в 2 раза, и интенсивность флуоресценции, соответственно, тоже, что проявляется дискретным снижением интенсивности флуоресценции первого канала при анализе на проточном цитофлуориметре. К важным достоинствам CFSE следует отнести высокую интенсивность флуоресценции красителя на одну молекулу, устойчивость и способность равномерно распределяться в цитоплазме дочерних клеток при делении [13, 14].

На характерной для спонтанной пролиферации лимфоцитов гистограмме А (контроль), представленной на рис. 4, показано, что практически все лимфоциты (99,1%) характеризуются исходной максимальной интенсивностью свечения в первом пике, в течение 5 суток выявлена лишь одна генерация (0,8% лимфоцитов). На рис. 4Б выявляется облако стимулированных ФГА лимфоцитов с высокими показателями прямого и бокового светорассеяния, а на гистограмме по первому каналу флуоресценции (соответствует CFSE) присутствуют 6 дискретных пиков,

отражающих 5 циклов деления активированных клеток.

В целом при использовании прединкубационной окраски лимфоцитов CFSE с последующей проточной цитофлуориметрией культивированных клеток установлено, что без стимуляции ФГА в среднем пролиферировали лишь 1,68 ± 0,9% лимфоцитов, а при митогенной стимуляции процент поделившихся клеток составил 55,56 ± 5,6% (p = 0,00068) (таблица).

Обсуждение

Наши исследования подтвердили возможность использования метода интерференционной микроскопии для изучения активности лимфоцитов. Данные, полученные разными лабораториями, совпадают [10]. Среди преимуществ метода следует выделить отсутствие специальной пробоподготовки, быструю оценку исследуемого образца, а также изучение нативных образцов в реальном времени с возможностью дальнейших манипуляций и наблюдением в динамике воздействия.

Проведенный анализ различных методических подходов для оценки ФГА-индуцированной активации лимфоцитов показал, что наиболее эффективными, хорошо воспроизводимыми и максимально автоматизированными являются методы проточной цитометрии с использованием флуоресцентных красителей, позволяющие оценивать пролиферационный потенциал клеток. Микроспектрофотометрия выделенной ДНК дает приемлемый результат, но воспроизводимость метода зависит от чистоты выделения ДНК (примеси белка и РНК влияют на показатели). Цитофотометрия с помощью реакции Фельгена дает значительно более низкую повторяемость, позволяет в большей степени проводить качественную оценку, но остается трудозатратным и длительным методом оценки пролиферативной активности. При этом данные методы не подходят для оценки лимфоцитов в динамике наблюдения, так как после пробоподготовки и анализа клетки становятся нежизнеспособными.



Заключение

По сравнению с классическими методами оценки активности лимфоцитов метод модуляционной интерференционной микроскопии не требует пробоподготовки, показывает сопоставимую и даже большую эффективность, при этом

позволяет изучать функциональное состояние лимфоцитов в реальном времени в динамике культивирования. Это открывает широкие возможности для оценки клеток иммунной системы как в исследовательских, так и в диагностических целях. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.С. Сустретов – сбор и обработка материала, проведение лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных данных;

В.В. Богуш – проведение лабораторных исследований, анализ результатов; О.С. Гусева – анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка данных, написание и редактирование текста; П.В. Ильясов и Л.В. Лимарева – концепция и дизайн исследования, редактирование и утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Семикина ЕЛ, Родионова ТВ, Закиров РШ, Филянская ЕГ, Маянский НА. Методические возможности оценки активации лимфоцитов in vitro. *Иммунология*. 2014;35(2):85–88. [Semikina EL, Rodionova TV, Zakirov RS, Filyanskaya EG, Mayanskiy NA. [Methodical possibilities of evaluating the activation of lymphocytes in vitro]. *Immunology*. 2014;35(2):85–88. Russian.]
2. Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*. 2017;47(5):765–779. doi: 10.1002/eji.201646875.
3. Herzig MC, Delavan CP, Jensen KJ, Cantu C, Montgomery RK, Christy BA, Cap AP, Bynum JA. A streamlined proliferation assay using mixed lymphocytes for evaluation of human mesenchymal stem cell immunomodulation activity. *J Immunol Methods*. 2021;488:112915. doi: 10.1016/j.jim.2020.112915.
4. Lee KR, Kyoohyun K, Jung J, Heo J, Cho S, Lee S, Chang G, Jo Y, Park H, Park Y. Quantitative phase imaging techniques for the study of cell pathophysiology: from principles to applications. *Sensors (Basel)*. 2013;13(4):4170–4191. doi: 10.3390/s130404170.
5. Гизингер ОА, Левкова ЕА, Савин СЗ. Использование модуляционной интерференционной микроскопии в задачах прикладной иммунологии. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2020;24(2):168–175. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175. [Gizinger OA, Levkova EA, Savin SZ. [Use of modulation interference microscopy in applied immunology]. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(2):168–175. Russian. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-168-175.]
6. Лопарев АВ, Игнатъев ПС, Индукаев КВ, Осипов ПА, Мазалов ИН, Козырев АВ. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований. *Измерительная техника*. 2009;(11):60–64. [Loparev AV, Ignat'ev PS, Indukaev KV, Osipov PA, Mazalov IN, Kozyrev AV. [Modulation interference microscope with high speed for biomedical research]. *Measurement Techniques*. 2009;(11):60–64. Russian.]
7. Kyselá K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janáček J, Kahle M, Hozák P. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol*. 2005;124(5):347–358. doi: 10.1007/s00418-005-0042-8.
8. Василенко ИА, Метелин ВБ, Игнатъев ПС, Кардашова ЗЗ, Лифенко РА. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. *Альманах клинической медицины*. 2018;46(8):748–757. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757. [Vasilenko IA, Metelin VB, Ignat'ev PS, Kardashova ZZ, Lifenko RA. [A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):748–757. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-748-757.]
9. Habaza M, Kirschbaum M, Guernth-Marschner C, Dardikman G, Barnea I, Korenstein R, Duschl C, Shaked NT. Rapid 3D Refractive-Index Imaging of Live Cells in Suspension without Labeling Using Dielectrophoretic Cell Rotation. *Adv Sci (Weinh)*. 2016;4(2):1600205. doi: 10.1002/adv.201600205.
10. Гаспарян СА, Попова ОС, Василенко ИА, Хрипунова АА, Метелин ВБ. Оценка фенотипа интерфазных ядер лимфоцитов методом количественного фазового имиджинга (QPI) у пациенток с эндометриодными кистами яичников. *Альманах клинической медицины*. 2017;45(2):109–117. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117. [Gasparyan SA, Popova OS, Vasilenko IA, Khripunova AA, Metelin VB. [Evaluation of the lymphocyte interphase nuclei phenotype by quantitative phase imaging (QPI) in patients with endometrial ovarian cysts]. *Almanac of Clinical Medicine*. 2017;45(2):109–117. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-109-117.]
11. Шмаров ДА, Погорелов ВМ, Козинец ГИ. Современные аспекты оценки пролиферации и апоптоза в клинико-лабораторной диагностике (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;(1):36–39. [Shmarov DA, Pogorelov VM, Kozinets GI. [The actual aspects of evaluation of proliferation and apoptosis in clinical laboratory diagnostic: a review]. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2013;(1):36–39. Russian.]
12. Vulkov I. [Ultrastructure of the lymphocytic nucleus under the effect of phytohemagglutinin stimulation]. *Eksp Med Morfol*. 1975;14(2):65–75. Bulgarian.
13. Quah BJC, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp*. 2010;(44):2259. doi: 10.3791/2259.
14. Azarsiz E, Karaca N, Ergun B, Durmuscan M, Kutukculer N, Aksu G. In vitro T lymphocyte proliferation by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester method is helpful in diagnosing and managing primary immunodeficiencies. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(1):e22216. doi: 10.1002/jcla.22216.



Comparison of modulation interference microscopy, DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytofluorimetry in the assessment of phytohemagglutinin-induced activity of human blood lymphocytes

A.S. Sustretov¹ • V.V. Bogush¹ • O.S. Guseva¹ • P.V. Iliasov¹ • L.V. Limareva¹

Rationale: The study of the structural particulars and functional state of immune cells and primarily lymphocytes is of great importance for both fundamental and clinical medicine. It requires the development of simple and reliable analytic methods that would allow for fast and effective real-time assessment of cell activity.

Aim: To evaluate the effectiveness of the interference microscopy compared to DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytometry with an internalized fluorescent label CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) in the assessment of PHA-induced proliferation of human blood lymphocytes.

Materials and methods: Phytohemagglutinin (PHA)-induced proliferative activity of blood lymphocytes from 10 healthy volunteers was studied with various methodological strategies. Blast transformation of lymphocytes was induced by their incubation for 5 days with PHA 5 µg/mL. The cell proliferative activity was assessed as follows: 1) by DNA spectrometry at 260/280 nm using Tecan Infinite 200 Pro with a specialized NanoQuant Plate™; 2) by cytophotometry followed by cell distribution analysis assessing deoxyribonucleic acid (DNA) content after staining with Felgen's dye with an imaging system based on an Olympus BX41 light microscope with a ProgRes CF camera; 3) by flow cytometry using an internalized fluorescent label CFSE; the analysis was performed with a BD FACS Calibur flow cytometer; 4) by measurement of the lymphocyte interference profile with a modulation interference microscope MIM-340 (Schwabe, Russia). The functional activity of the nucleus (FAN) was determined and used as a criterion for assessment of the lymphocyte functional state.

Results: Incubation of lymphocytes with PHA led to an increase in the linear size by $22.2 \pm 2.8\%$, a decrease in phase height by $46.3 \pm 4.7\%$ ($p=0.019$), and an increase in FAN by $75.9 \pm 9.4\%$,

vs control ($p=0.046$). As measured by isolated DNA spectroscopy, PHA stimulation of lymphocytes was associated with an increase in the amount of DNA by 55% vs baseline (409.8 ± 22.3 ng/µL and 264.3 ± 25.0 ng/µL, respectively, $p=0.049$). Felgen's reaction revealed that the proportion of nuclei containing more than 2n DNA was 2% in the control cells and 14.8% in the PHA-activated lymphocytes, with a difference between the groups of 12.8%. CFSE staining with subsequent incubation and assessment by flow cytofluorimetry demonstrated an increase in the percentage of proliferating cells from $1.68 \pm 0.9\%$ in the control to $55.56 \pm 5.6\%$ ($p=0.00068$) in the mitogen-stimulated sample.

Conclusion: Modulation interference microscopy does not require the sample preparation and demonstrated comparable and even higher effectiveness compared to conventional methods for assessment of lymphocyte activity. At the same time, it allows for evaluation of the lymphocyte functional state in real time in the process of cultivation. This opens ample opportunities for evaluation immune cells for research and diagnostic purposes.

Key words: lymphocytes, proliferation, modulation interference microscopy, flow cytofluorimetry, DNA cytophotometry, DNA spectrophotometry

For citation: Sustretov AS, Bogush VV, Guseva OS, Iliasov PV, Limareva LV. Comparison of modulation interference microscopy, DNA spectrometry, DNA cytometry, and flow cytofluorimetry in the assessment of phytohemagglutinin-induced activity of human blood lymphocytes. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):412–418. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-054.

Received 31 May 2021; revised 19 November 2021; accepted 22 November 2021; published online 6 December 2021

Aleksey S. Sustretov – Research Fellow, Laboratory of Immunology and Molecular Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3021-2130>

Vanda V. Bogush – Research Fellow, Laboratory of Immunology and Molecular Genetics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7597-449X>

Olga S. Guseva – PhD (in Vet.), Senior Research Fellow, Laboratory of Biochemistry¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>

Pavel V. Iliasov – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Biochemistry¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>

Larisa V. Limareva – Doctor of Biol. Sci., Associate Professor, Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>

✉ 20 Gagarina ul., Samara, 443079, Russian Federation. Tel.: +7 (846) 374 10 04, ext. 42 07, 42 04. E-mail: l.v.limareva@samsmu.ru

Conflict of interests

The authors declare no obvious and potential conflict of interests associated with the manuscript.

Authors' contribution

A.S. Sustretov, data collection and management, laboratory studies, analysis and interpretation of the results; V.V. Bogush, laboratory studies, analysis of the results; O.S. Guseva, analysis and interpretation of the results, statistical analysis, text writing and editing; P.V. Iliasov and L.V. Limareva, the study concept and design, editing and approval of the final version of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹Institute for Experimental Medicine and Biotechnology of Samara State Medical University; 20 Gagarina ul., Samara, 443079, Russian Federation



Оригинальная статья

Структурно-функциональные нарушения функций клеточных мембран при терминальной стадии хронической болезни почек

Иевлев Е.Н.^{1,2} • Казакова И.А.¹ • Сухенко Е.П.³

Актуальность. Хроническая болезнь почек (ХБП) сопровождается нарушением всех функций систем организма, в том числе изменением внутриклеточных процессов. Исследование электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) у пациентов с ХБП 5-й диализной стадии (С5д) в последнее время приобретает все большую актуальность, так как данный метод позволяет выявить патофизиологическое состояние пациента и предоставляет возможность коррекции лечения.

Цель – выявить особенности ЭФПЭ у пациентов, находящихся на программном гемодиализе, и установить связь с клинико-лабораторными показателями.

Материал и методы. Проведено наблюдательное одномоментное исследование 220 пациентов с установленным диагнозом ХБП С5д. Средний возраст составил $56,5 \pm 1,4$ года (от 26 до 85 лет). Длительность диализной терапии в среднем была $3,7 \pm 0,4$ года. Индекс адекватности Kt/V по мочеvine составил $1,54 \pm 0,08$. В группу контроля включены 60 здоровых доноров крови, сопоставимых по возрасту и полу. ЭФПЭ исследовали при помощи комплекта «Цито-Эксперт» (ОАО «Аксион холдинг», г. Ижевск, 2010) и программы WT-Cell (ООО «Вестрэйд ЛТД», 2019).

Результаты. У пациентов, получающих лечение программным гемодиализом, по сравнению

с группой контроля зарегистрированы более низкие показатели амплитуды колебания эритроцитов ($10,2 \pm 0,5$ против $21,2 \pm 2,1$ мкм, $p < 0,001$), доля подвижных эритроцитов составила $69,5 \pm 1,8$ и $89,7 \pm 9,9\%$ соответственно ($p < 0,001$). Более низкие значения амплитуды колебания эритроцитов отмечены в возрастной группе от 25 до 44 лет ($9,0 \pm 1,0$ мкм, $p < 0,05$). Получена слабая положительная связь возраста и амплитуды колебания эритроцитов ($R = 0,20$, $p < 0,05$). Обнаружены различия показателя амплитуды колебания эритроцитов у пациентов с разной длительностью диализной терапии: от 1 до 2 лет – $11,3 \pm 0,8$ мкм, от 2 до 5 лет – $9,9 \pm 0,7$ мкм, от 6 до 10 лет – $9,4 \pm 1,3$ мкм, более 11 лет – $7,4 \pm 0,9$ мкм ($p < 0,05$). Установлена слабая отрицательная корреляция длительности диализной терапии и амплитуды колебания эритроцитов ($R = -0,24$, $p < 0,01$). Выявлены связи амплитуды колебания эритроцитов с систолическим артериальным давлением до процедуры гемодиализа ($R = 0,34$, $p < 0,05$) и с пульсовым давлением до процедуры гемодиализа ($R = 0,37$, $p < 0,05$); доли подвижных эритроцитов с уровнем паратиреоидного гормона ($R = 0,32$, $p < 0,05$).

Заключение. Показатели ЭФПЭ у пациентов, получающих программный гемодиализ, имеют свои особенности, связанные со значительным

уменьшением амплитуды колебания (пропорциональной эффективному заряду клеток) и доли подвижных эритроцитов, по сравнению с группой здоровых. Амплитуда колебания эритроцитов имеет отрицательную корреляцию с возрастом и длительностью диализной терапии. Имеется связь амплитуды колебания эритроцитов с показателями артериального давления и минерально-костными нарушениями.

Ключевые слова: электрофоретическая подвижность эритроцитов, хроническая болезнь почек, гемодиализ, артериальная гипертензия, антигипертензивная терапия, амплитуда колебания эритроцитов, эффективный заряд клеток

Для цитирования: Иевлев ЕН, Казакова ИА, Сухенко ЕП. Структурно-функциональные нарушения функций клеточных мембран при терминальной стадии хронической болезни почек. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):419–426. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-056.

Поступила 02.11.2021; доработана 15.11.2021; принята к публикации 17.11.2021; опубликована онлайн 06.12.2021

Хроническая болезнь почек (ХБП) остается одной из важнейших проблем медицины, что обусловлено высокой заболеваемостью и смертностью от сердечно-сосудистых причин [1]. Вместе с тем, несмотря на рост числа пациентов с диализной стадией ХБП, наблюдается увеличение выживаемости больных этой группы в результате совершенствования процедуры гемодиализа (ГД) и внедрения современных алгоритмов медикаментозного лечения [2].

Среди множества патофизиологических механизмов, протекающих у диализных пациентов,

особую роль занимает изменение внутриклеточных процессов. Важный компонент полноценного функционирования клетки – состояние клеточной мембраны. Выраженность дестабилизации клеточных мембран отражает особенности повреждений в системах и органах [3–6]. Прижизненное изучение свойств мембран клеток может позволить прямо и косвенно оценить регуляцию биологических процессов в клетках организма [4, 5, 7–9]. В настоящее время своеобразным доступным эталоном для оценки мембрандестабилизирующих процессов в организме признан эритроцит. Имеются работы, показывающие



влияние ишемии тканей, микробного или аутоиммунного воспаления на дестабилизацию мембран эритроцитов. Среди основных физических характеристик эритроцитов выделяют поверхностный электрический заряд мембраны, оцениваемый по электрофоретической подвижности.

Электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) – способность эритроцитов двигаться в электрическом поле с той или иной скоростью в зависимости от величины поверхностного электрического заряда их мембраны. Все клетки организма, в том числе эритроциты, для выполнения функций и поддержания гомеостаза организма должны обладать определенной величиной поверхностного заряда. На величину ЭФПЭ оказывает влияние физико-химическое состояние клеточной мембраны и состав окружающей клетку среды [10]. А.В. Дерюгина и соавт. (2018) при исследовании на животных показали, что ЭФПЭ может быть использована для количественной характеристики степени стрессовой реакции и развития адаптационных процессов, что особенно важно при персонализированном подходе к терапии различных патологических состояний [11]. Снижение ЭФПЭ наблюдается при онкологических заболеваниях, заболеваниях кишечника, острых респираторных инфекциях, пневмонии, сепсисе, системных заболеваниях, а также в условиях стресса [3, 4, 10–17].

При ХБП 5-й диализной стадии (С5д), безусловно, имеются грубые нарушения функционирования клеточных мембран, что вызывает изменения плотности поверхностного электрического заряда эритроцитов, а также, вероятно, и зарядов субклеточных элементов. Прижизненное исследование ЭФПЭ у пациентов с ХБП С5д в последнее время приобретает все большую актуальность, будучи перспективным для оценки патофизиологического состояния пациента и возможности коррекции лечения. Необходимы новые данные, в том числе о связях клинических и метаболических показателей с величиной заряда мембран эритроцитов, для дальнейшего назначения адекватной терапии.

Целью настоящего исследования было выявить особенности ЭФПЭ у пациентов, находящихся на программном ГД, и установить связи с клинико-лабораторными показателями.

Материал и методы

Дизайн исследования

Проведено наблюдательное одномоментное исследование 220 пациентов с установленным диагнозом ХБП С5д (мужчин было 46%, женщин – 54%),

Иевлев Евгений

Николаевич – канд. мед. наук, ассистент кафедры внутренних болезней с курсами лучевых методов диагностики и лечения, военно-полевой терапии¹; врач-терапевт больничного комплекса № 2²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0395-7946>
✉ 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281, Российская Федерация. Тел.: +7 (912) 443 39 00. E-mail: inloja@mail.ru

Казакова Ирина

Александровна, д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней с курсами лучевых методов диагностики и лечения, военно-полевой терапии¹. E-mail: i.a.kazakova@yandex.ru

Сухенко Евгений

Пантелевич – канд. физ.-мат. наук, доцент, заместитель генерального директора³. E-mail: eugens@udm.ru

получавших процедуру программного ГД (рисунк). Средний возраст составил $56,5 \pm 1,4$ года (от 26 до 85 лет). Длительность диализной терапии была в среднем $3,7 \pm 0,4$ года (от 1 до 20 лет). Программный ГД выполнялся на аппаратах Fresenius 4008S (Германия) и Dialog+ компании В. Braun (Германия) по 4–4,5 часа 3 раза в неделю с применением полисульфоновых диализаторов. Во время ГД использовали только бикарбонатный диализирующий раствор. У всех пациентов достигалась приемлемая доза ГД в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями. Для выявления особенностей нарушений клеточных мембран обследована группа контроля, в которую включены 60 практически здоровых доноров крови ГУЗ «Республиканская станция переливания крови МЗ УР». Данные группы были сопоставимы по возрасту и полу. Пациенты были распределены по возрасту (в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения, 2012), полу и длительности диализной терапии.

У группы исследования проводили корреляционный анализ между показателями ЭФПЭ и показателями артериального давления (АД).

Критерии соответствия

Критерии включения в исследование: наличие терминальной стадии ХБП, получение регулярной процедуры ГД (3 раза в неделю) более 1 года, индекс Kt/V более 1,4, получение процедуры программного ГД более 1 года, наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения: онкологические заболевания, экстремальные состояния (кома, инфаркт миокарда, инсульт), перенесенные менее чем за 3 месяца до начала исследования, острые воспалительные заболевания, нестабильная стенокардия, тяжелые нарушения ритма и проводимости, отказ пациента от исследования.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе гемодиализного отделения БУЗ УР ГКБ № 6 МЗ УР, диализного центра ООО «Фрезениус Нефрокеа» (филиал в Ижевске), отделения диализа ООО «Медицинские сервисные решения».

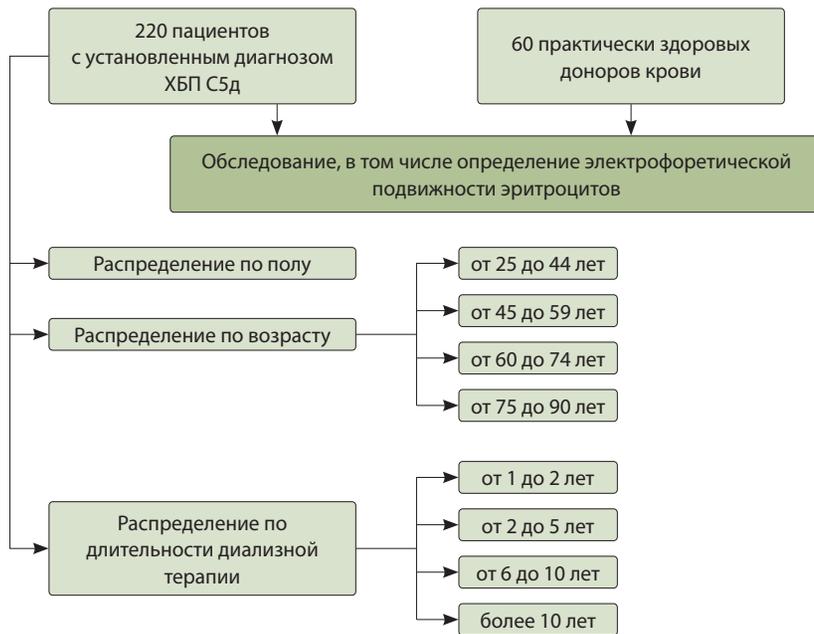
Описание медицинского вмешательства

Программа обследования пациентов предусматривала общеклинические и специальные методы – гемограмму, определение биохимических показателей: мочевины, креатинина, альбумина,

¹ ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России; 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281, Российская Федерация

² БУЗ УР «Городская клиническая больница № 6 Минздрава Удмуртской Республики»; 426009, г. Ижевск, ул. Ленина, 81, Российская Федерация

³ ООО «Вестрэйд ЛТД»; 115201, г. Москва, 1-й Варшавский проезд, 1А–9, Российская Федерация



Дизайн исследования; ХБП С5д – хроническая болезнь почек 5-й диализной стадии

щелочной фосфатазы, Ca^+ , P^+ , Na^+ , K^+ , паратиреоидного гормона.

Всем обследуемым проводили измерение офисного АД до, во время и после процедуры ГД по методу Н.С. Короткова с определением систолического (САД), диастолического (ДАД) и пульсового АД. Выполняли расчет среднемесячных величин АД, с которыми в последующем проводился корреляционный анализ.

С использованием комплекса «Цито-Эксперт» (ОАО «Аксион холдинг», Ижевск, ТУ 9443-137-43674401-2005, 2010 г.) проводили определение ЭФПЭ. При помощи программы WT-Cell (ООО «Весттрэйд ЛТД», 2019) регистрировали и оценивали параметры движения живых клеток под действием знакопеременного электрического поля с заданными характеристиками в световом микроскопе «Биолам». Для исследования забирали не более 0,5 мл венозной крови из фистулы пациента перед процедурой ГД в пробирку РУТН объемом 4 мл с гепарином лития. Для приготовления суспензионной среды использовали изотонический 0,3М раствор сахарозы в дистиллированной воде. В качестве стабилизатора добавляли 0,1М фосфатный буфер до достижения pH 7,4–7,5. Далее в 1 мл среды вносили 0,05 мл нативной крови пациента. В центр рабочей зоны электрофоретической ячейки дозатором помещали 40–50 мкл суспензии эритроцитов. Каплю накрывали покровным стеклом, расположив его симметрично относительно черных графитовых электродов,

после чего на электроды подавалось напряжение в 30 В с частотой смены полярности направления тока на электродах в 0,25 Гц. При этом в рабочей зоне поддерживался ток, равный 0,01 мА. Были изучены показатели ЭФПЭ: средняя амплитуда колебания эритроцитов (пропорциональная эффективному заряду клеток), эллиптичность, индекс их агрегации, процент подвижных эритроцитов (процентное соотношение активных и неактивных эритроцитов по отношению к электрическому полю).

Анализ в подгруппах

Для выявления особенности изменения показателей ЭФПЭ у гемодиализных пациентов было проведено распределение по возрасту, полу, длительности диализной терапии.

Этическая экспертиза

Работа велась на основе информированного согласия больных в соответствии с международными этическими требованиями, предъявляемыми к медицинским исследованиям с участием человека (Всемирная медицинская ассоциация, Женева, 1993). Перед началом исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России № 584 от 27.02.2018.

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Статистическая обработка результатов исследования проведена общепринятыми методиками вариационной статистики с использованием прикладных программ BioStat (Primer of Biostatistics, «Практика», Москва, 2019, версия 7.3.0) и Microsoft Excel 2010 (США). Для проверки нормальности распределения полученных значений применялся критерий Колмогорова – Смирнова. В случае параметрического распределения признака данные описывали в виде средних и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для определения статистической значимости различий использовали критерий Манна – Уитни (U). Применяли ранговый критерий Краскела – Уоллиса (H) для оценки разностей нескольких выборок. Корреляционные отношения оценивали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена (R). Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

При сопоставлении результатов исследования группы получающих программный ГД и группы

**Таблица 1.** Показатели электрофоретической подвижности эритроцитов у пациентов, получающих программный гемодиализ

Показатель, М ± SD	Больные на ГД (N = 220)	Здоровые доноры (N = 60)	Значение <i>p</i>
Площадь, мкм	55,3 ± 1,8	56,9 ± 5,5	> 0,05
Эллиптичность	70,2 ± 0,3	68,6 ± 0,7	> 0,05
Амплитуда колебания, мкм	10,2 ± 0,5	21,2 ± 2,1	< 0,0001
Индекс агрегации, %	24,8 ± 1,6	20,9 ± 2,8	> 0,05
Доля подвижных эритроцитов, %	69,5 ± 1,8	89,7 ± 9,9	< 0,0001

ГД – гемодиализ

Таблица 2. Показатели электрофоретической подвижности эритроцитов в зависимости от гендерных групп

Показатель, М ± SD	Мужчины	Женщины	Значение <i>p</i>
Площадь, мкм	54,7 ± 2,6	55,9 ± 2,6	> 0,05
Эллиптичность	70,3 ± 0,4	70,0 ± 0,4	> 0,05
Амплитуда колебания, мкм	10,3 ± 0,6	10,1 ± 0,7	> 0,05
Индекс агрегации, %	24,5 ± 2,1	25,1 ± 2,4	> 0,05
Доля подвижных эритроцитов, %	70,2 ± 2,2	68,7 ± 3,1	> 0,05

здоровых доноров крови получены различия по показателю амплитуды колебания эритроцитов и доли подвижных эритроцитов ($p < 0,0001$, табл. 1). Существенных различий показателей площади эритроцитов, их эллиптичности, индекса агрегации у пациентов на программном ГД и группы контроля не выявлено.

Исходя из данных отчета Российского регистра заместительной почечной терапии [18, 19], наблюдается высокая летальность у пациентов 1-го года диализной терапии. В связи с этим нами проведен

Таблица 3. Показатели электрофоретической подвижности эритроцитов в зависимости от возраста

Показатель, М ± SD	Возраст, годы				Значение <i>p</i>
	25–44	45–59	60–74	75–90	
Площадь, мкм	61,6 ± 4,2	55,3 ± 3,8	51,4 ± 2,5	55,9 ± 5,8	> 0,05
Эллиптичность	70,4 ± 0,6	69,8 ± 0,5	69,9 ± 0,4	73,3 ± 1,3	> 0,05
Амплитуда колебания, мкм	9,0 ± 1,0	10,1 ± 0,8	10,8 ± 0,7	11,7 ± 0,7	< 0,05
Индекс агрегации, %	22,2 ± 3,4	23,5 ± 3,6	26,7 ± 2,6	25,5 ± 9,2	> 0,05
Доля подвижных эритроцитов, %	65,5 ± 4,2	74,5 ± 2,8	68,6 ± 3,1	73,4 ± 6,1	> 0,05

анализ показателей ЭФПЭ по полу, возрасту, стажу диализа в указанных группах. Как видно из данных табл. 2, различий исследуемых показателей по полу не получено. У пациентов в возрасте 25–44 лет амплитуда колебания составила $9,0 \pm 1,0$ мкм, в группе 45–60 лет – $10,1 \pm 0,8$ мкм, в группе 60–74 лет – $10,8 \pm 0,7$ мкм, в группе 75–90 лет – $11,7 \pm 0,7$ мкм ($p < 0,05$, табл. 3). Получена слабая положительная связь возраста и амплитуды колебания эритроцитов ($R = 0,20$, $p < 0,05$). По другим исследуемым величинам значимых различий не обнаружено.

Выявлены различия показателя амплитуды колебания эритроцитов у пациентов с разным диализным стажем ($p < 0,05$, табл. 4). Наблюдалось снижение данного показателя с увеличением длительности диализной терапии, что подтвердилось слабой отрицательной корреляцией ($R = -0,24$, $p < 0,01$).

При увеличении стажа диализной терапии имеется тенденция увеличения показателя индекса агрегации и снижения доли подвижных эритроцитов. Показатели эллиптичности и площади эритроцитов при различном диализном стаже значимо не изменялись.

Средние показатели красной крови и большинство показателей кальций-фосфорного обмена не превышали целевые параметры для данной когорты (табл. 5). Все пациенты получали стандартную терапию минерально-костных нарушений и анемии, включающую фосфатбиндеры, кальцимитетики, метаболиты витамина D, препараты железа и эритропоэтина.

При проведении корреляционного анализа установлены связи амплитуды колебания эритроцитов с САД до процедуры ГД ($R = 0,34$, $p < 0,05$) и с пульсовым давлением до процедуры ГД ($R = 0,37$, $p < 0,05$). Выявлена корреляция доли подвижных эритроцитов с уровнем паратиреоидного гормона ($R = 0,32$, $p < 0,05$). С другими

**Таблица 4.** Показатели электрофоретической подвижности эритроцитов в зависимости от длительности диализной терапии

Показатель, М ± SD	Длительность терапии, годы				Значение p
	1–2	2–5	6–10	более 10	
Площадь, мкм	59,4 ± 2,8	52,8 ± 3,2	51,3 ± 3,8	56,5 ± 6,7	> 0,05
Эллиптичность	70,6 ± 0,6	70,0 ± 0,4	69,6 ± 0,5	70,8 ± 1,5	> 0,05
Амплитуда колебания, мкм	11,3 ± 0,8	9,9 ± 0,7	9,4 ± 1,3	7,4 ± 0,9	< 0,05
Индекс агрегации, %	26,8 ± 2,7	21,6 ± 2,7	25,5 ± 2,6	30,6 ± 5,2	> 0,05
Доля подвижных эритроцитов, %	72,5 ± 2,9	69,8 ± 2,7	66,2 ± 5,5	59,8 ± 7,0	> 0,05

параметрами кальций-фосфорного обмена достоверной корреляции не выявлено.

Обсуждение

ХБП – тяжелая патология, влияющая на прогноз заболевания, длительность и качество жизни пациентов. При терминальной стадии ХБП наблюдаются преимущественно единые морфологические изменения в почках и патофизиологические процессы в организме – вне зависимости от этиологии. Несмотря на новые стратегии в ведении диализных пациентов, терапевтическая оценка

эффективности лечения остается трудной проблемой для клинициста. Одним из перспективных направлений видится исследование показателей клеточных мембран, в особенности ЭФПЭ. Рядом авторов показано значительное снижение заряда мембраны эритроцитов при воспалительных заболеваниях, стрессе, онкологических заболеваниях [2, 3, 11–17]. При помощи исследования ЭФПЭ оценивается эффективность проводимого лечения [16, 20, 21].

В нашем исследовании выявлено значительное снижение амплитуды колебания и доли подвижных эритроцитов у пациентов, получающих лечение программным ГД ($p < 0,0001$). Полученные данные можно объяснить состоянием хронической уремии, минерально-костными нарушениями, механическим повреждением эритроцитов при прохождении диализатора, регулярными инъекциями препаратов эритропоэтина и антикоагулянтов. Существенных различий других показателей (площадь, эллиптичность, индекс агрегации) не выявлено.

Был проведен анализ демографических факторов, влияющих на ЭФПЭ. Выявлены более низкие значения амплитуды колебания эритроцитов у пациентов молодого возраста ($p < 0,05$). Установлена положительная корреляция возраста и амплитуды колебания эритроцитов ($R = 0,20$, $p < 0,05$). Можно предположить, что молодые пациенты, достигшие диализной стадии ХБП, имеют более выраженные патофизиологические сдвиги, чем пациенты пожилого возраста, которые постепенно приспосабливаются к измененному гомеостазу при ХБП.

Получены данные о влиянии длительности диализной терапии на ЭФПЭ. При увеличении диализного стажа происходит снижение заряда мембраны эритроцита ($p < 0,05$), что свидетельствует о возможном влиянии на ЭФПЭ прогрессирования минерально-костных нарушений,

Таблица 5. Лабораторно-инструментальные показатели пациентов, включенных в исследование

Показатель, М ± SD	Значение
Средняя прибавка в весе, г	2463,7 ± 123,7
САД до ГД, мм рт. ст.	143,5 ± 5,8
ДАД до ГД, мм рт. ст.	80,1 ± 1,6
Пульсовое давление до ГД, мм рт. ст.	63,5 ± 5,2
САД после ГД, мм рт. ст.	132,3 ± 2,7
ДАД после ГД, мм рт. ст.	77,9 ± 1,5
Пульсовое давление после ГД, мм рт. ст.	54,5 ± 1,5
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,58 ± 0,08
Гемоглобин, г/л	113,3 ± 4,9
Кальций ионизированный, ммоль/л	1,17 ± 0,02
Кальций, ммоль/л	2,27 ± 0,04
Фосфор, ммоль/л	1,73 ± 0,07
Паратиреоидный гормон, пг/мл	439,3 ± 67,8

ГД – гемодиализ, ДАД – диастолическое артериальное давление, САД – систолическое артериальное давление



анемии, воспаления, эндотелиальной дисфункции, артериальной гипертензии и пр. Нами не получено данных о влиянии на ЭФПЭ гендерного фактора.

Артериальная гипертензия – ведущая причина инвалидизации и смерти пациентов, получающих лечение программным ГД. Патогенетические механизмы артериальной гипертензии характеризуются нарушением структуры и функции клеточных мембран, в частности, наблюдается большая скорость облегченного переноса ионов через клеточную мембрану (скорость $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ -противотранспорта в мембране эритроцита) [22]. R. Воого и соавт. измерили активность натрий-калиевой АТФазы эритроцитов у диализных пациентов и отметили более низкую активность помпы у больных с артериальной гипертензией в отличие от пациентов с нормальным АД [23]. Вследствие ингибирования натрий-калиевой АТФазы происходит возрастание внутриклеточного натрия параллельно с увеличением цитозольного кальция, что приводит к повышению базального тонуса сосудов и усилению реакции сосудов на сосудосуживающие вещества [23, 24]. В нашем исследовании подтверждается связь мембранных нарушений с артериальной гипертензией наличием связи амплитуды колебания эритроцитов с показателями АД до процедуры ГД – САД ($p < 0,05$) и пульсовым давлением ($p < 0,05$). Более выраженное нарушение клеточных мембран сопровождается более высоким АД. Кроме того, определена связь доли подвижных эритроцитов с уровнем

паратиреоидного гормона ($p < 0,05$), что показывает влияние нарушений кальций-фосфорного обмена на стабильность клеточного заряда. Следовательно, необходимо дальнейшее изучение связи показателей ЭФПЭ и показателей гемодинамики – новые данные позволят использовать ЭФПЭ для оценки эффективности мембраностабилизирующего, органопротективного лечения при артериальной гипертензии.

Ограничения исследования. Исследование являлось одномоментным, по его результатам можно установить статистические, но не причинно-следственные связи. Использовался только один метод исследования мембран клеток.

Заключение

Показатели ЭФПЭ у пациентов, получающих программный ГД, имеют свои особенности, связанные со значительным уменьшением амплитуды колебания и доли подвижных эритроцитов, по сравнению с группой здоровых доноров. Амплитуда колебания эритроцитов имеет отрицательную корреляцию с возрастом и длительностью диализной терапии. Установлена связь амплитуды колебания эритроцитов с показателями АД и минерально-костными нарушениями. Применение исследования ЭФПЭ у диализных пациентов способствует более полной оценке клинико-лабораторного статуса, что может иметь большое значение для своевременной коррекции применяемой терапии с целью улучшения ближайшего и отдаленного прогноза. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Все авторы внесли равный вклад в написание статьи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Батюшин ММ. Хроническая болезнь почек: современное состояние проблемы. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2020;16(6):938–947. doi: 10.20996/1819-6446-2020-11-06. [Batiushin MM. [Chronic kidney disease: current state of the problem]. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2020;16(6): 938–947. Russian. doi: 10.20996/1819-6446-2020-11-06.]
2. Андрусев АМ, Томилина НА, Перегудова НГ, Шинкарев МБ. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации 2014–2018 гг. Отчет по данным общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества. Нефрология и диализ. 2020;22(S1):1–71. doi: 10.28996/2618-9801-2020-1suppl-1-71. [Andrushev AM, Tomilina NA, Peregudova NG, Shinkarev MB. [Renal replacement therapy for end stage renal disease in Russian Federation, 2014–2018. Russian National Renal Replacement Therapy registry report of Russian Public Organization of Nephrologists "Russian Dialysis Society"]. Nephrology and Dialysis. 2020;22(S1):1–71. Russian. doi: 10.28996/2618-9801-2020-1suppl-1-71.]
3. Василькова ЕВ, Тетелютину ФК, Ребро НА, Хазиева ФС. Микроэлектрофоретическая подвижность живых клеток у курящих женщин с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза. Проблемы репродукции. 2011;17(S):130. [Vasil'kova EV, Tetelyutina FK, Rebro NA, Khazieva FS. [Microelectrophoretic mobility of viable cells from female smokers with chronic inflammatory pelvic disease]. Russian Journal of Human Reproduction. 2011;17(S):130. Russian.]
4. Дерюгина АВ, Мартусевич АА, Хламова ЮН, Куваева СС, Мартусевич АК, Румянцева ТВ.



- Электрофоретическая подвижность эритроцитов при воспалении. Вятский медицинский вестник. 2016;4(52):57–60. [Deryugina AV, Martusevich AA, Khlamova YuN, Kuvaeva SS, Martusevich AK, Rummyantseva TV. [Electrophoretic motility of erythrocytes in inflammation]. Medical Newsletter of Vyatka. 2016;4(52):57–60. Russian.]
5. Сигитова ОН, Архипов ЕВ. Структурно-функциональные нарушения клеточных мембран нефроцитов при хронических заболеваниях почек. Казанский медицинский журнал. 2011;92(6):887–890. [Sigitova ON, Arkhipov EV. [Structural and functional disorders of nephrocyte cell membranes in chronic kidney disease]. Kazan Medical Journal. 2011;92(6):887–890. Russian.]
 6. Дерюгина АВ, Иващенко МН, Игнатьев ПС, Самоделкин АГ, Золотова МВ, Шабалин МА, Грачева ЕА. Диагностические возможности электрофоретической подвижности эритроцитов и клеток буккального эпителия при стрессе. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2019;63(1):106–111. doi: 10.25557/0031-2991.2019.01.106-111. [Deryugina AV, Ivashchenko MN, Ignatyev PS, Samodelkin AG, Zolotova MV, Shabalin MA, Gracheva EA. [Diagnostic capabilities of the electrophoretic mobility of red blood cells and buccal cells in stress]. Pathological Physiology and Experimental Therapy. 2019;63(1):106–111. Russian. doi: 10.25557/0031-2991.2019.01.106-111.]
 7. Omasu F, Nakano Y, Ichiki T. Measurement of the electrophoretic mobility of sheep erythrocytes using microcapillary chips. Electrophoresis. 2005;26(6):1163–1167. doi: 10.1002/elps.200410182.
 8. Aki A, Nihei Y, Asai H, Ukai T, Morimoto H, Nakajima Y, Hanajiri T, Maekawa T. Detection of surface immunoreactions on individual cells by electrophoretic mobility measurement in a micro-channel. Sensors and Actuators B: Chemical. 2008;131(1):285–289. doi: 10.1016/j.snb.2007.11.046.
 9. Gunson NH, Betts JJ, Nicholson JT. The electrophoretic mobility of Tn polyagglutinable erythrocytes. Vox Sanguinis. 1971;21(5):455–461. doi: 10.1111/j.1423-0410.1971.tb04803.x.
 10. Дерюгина АВ, Грачева ЕА. Эффективность цитофлавина при экспериментальной артериальной гипертензии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020;83(2): 8–11. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-8-11. [Deryugina AV, Gracheva EA. [Efficacy of cytoflavin administration in rats with experimental arterial hypertension]. Experimental and Clinical Pharmacology. 2020;83(2):8–11. Russian. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-8-11.]
 11. Дерюгина АВ, Иващенко МН, Игнатьев ПС, Самоделкин АГ. Трансляционные исследования электрофоретической подвижности и фазового портрета эритроцитов с учетом развития стрессовой реакции в условиях патологического процесса. Альманах клинической медицины. 2018;46(8): 765–771. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-765-771. [Deryugina AV, Ivashchenko MN, Ignatyev PS, Samodelkin AG. [Translational studies of electrophoretic mobility and phase picture of erythrocytes with consideration of development of stress response during a pathological process]. Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(8):765–771. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-765-771.]
 12. Крылов ВН, Дерюгина АВ. Изменение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов при действии стресс-факторов. Гематология и трансфузиология. 2011;56(5):18–21. [Krylov VN, Deryugina AV. [Effects of stress factors on electrophoretic mobility of isolated erythrocytes]. Russian Journal of Hematology and Transfusiology. 2011;56(5):18–21. Russian.]
 13. Рахов ДА, Юданова ЛС, Рубин ВИ. Функциональные свойства мембран эритроцитов у больных хроническим гломерулонефритом. Урология и нефрология. 1992;(4–6): 31–33. [Rakhov DA, Yudanova LS, Rubin VI. [Functional properties of erythrocyte membranes from patients with chronic glomerulonephritis]. Urologiya i Nefrologiya [Urology and Nephrology]. 1992;(4–6):31–33. Russian.]
 14. Аладашвили НЗ, Попова ОВ, Сарычева ТГ, Чернов ВМ, Козинец ГИ. Электрофоретическая подвижность эритроцитов периферической крови у детей с неспецифическими воспалительными заболеваниями. Клиническая лабораторная диагностика. 2005;(10):52b. [Aladashvili NZ, Popova OV, Sarycheva TG, Chernov VM, Kozinets GI. [Electrophoretic mobility of peripheral red blood cells in children with nonspecific inflammatory diseases]. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2005;(10):52b. Russian.]
 15. Еровиченков АА, Садовская ГВ, Пак СГ, Козинец ГИ, Попова ОВ. Электрофоретическая подвижность эритроцитов у пациентов с различными формами рожи в динамике болезни. Терапевтический архив. 2001;73(11):73–75. [Erovichenkov AA, Sadovskaya GV, Pak SG, Kozinets GI, Popova OV. [Electrophoretic mobility of erythrocytes from patients with various forms of erysipelas during the course of the disease]. Therapeutic Archive. 2001;73(11):73–75. Russian.]
 16. Кирковский ВВ, Левин ВИ, Митьковская НР, Луц ЛС. Электрофоретическая подвижность эритроцитов больных с ревматоидным артритом в процессе проведения экстракорпоральной аутогемотерапии. Здравоохранение. 2002;(1):12–18. [Kirkovskiy VV, Levin VI, Mit'kovskaya NP, Luts LS. [Electrophoretic mobility of erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis under extra corporeal autohaemomagnetic therapy]. Zdravookhraneniye [Health Care]. 2002;(1):12–18. Russian.]
 17. Макарова МН, Грачева ИД, Новикова РА, Колчина АТ. Использование электрокинетических характеристик эритроцитов при диагностике онкологических заболеваний. Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2017;5(3): 361–369. doi: 10.23888/HMJ20173361-369. [Makarova MN, Gracheva ID, Novikova RA, Kolchina AT. [Use of electrokinetic characteristics of red blood cells in cancer diagnostics]. Science of the Young (Eruditio Juvenium). 2017;5(3):361–369. Russian. doi: 10.23888/HMJ20173361-369.]
 18. Бикбов БТ, Томила НА. Состав больных и показатели качества лечения на заместительной терапии терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 1998–2013 гг. Нефрология и диализ. 2016;18(2):98–164. [Bikbov BT, Tomilina NA. [The contingent and treatment quality indicators in patients on replacement therapy of end stage renal disease in the Russian Federation in 1998-2013 years]. Nephrology and Dialysis. 2016;18(2):98–164. Russian.]
 19. Кичигин ВА, Козлов ДО, Ких ОВ, Волкова ТА. Выживаемость пациентов, получающих программный гемодиализ (обзор). Acta Medica Eurasica (Медицинский вестник Евразии). 2018;(1):22–35. [Kichigin V, Kozlov D, Kikh O, Volkova T. [Survival rate of patients receiving maintenance long term hemodialysis (review)]. Acta Medica Eurasica (Medical Bulletin of Eurasia). 2018;(1):22–35. Russian.]
 20. Буланова ОИ. Влияние динамической электронейростимуляции на изменение электрофоретической подвижности эритроцитов в условиях иммобилизационного стресса. Проблемы биологии и медицины. 2020;1-1(117):390–391. [Bulanova OI. [The effects of dynamic electro-neurostimulation on changes in electrophoretic mobility of erythrocytes in immobilization-induced stress]. Problems of Biology and Medicine. 2020;1-1(117):390–391. Russian.]
 21. Казакова ИА, Иевлев ЕН. Особенности влияния моксонидина (физиотенза) на качество жизни и состояние сердечно-сосудистой системы у пациентов с хронической болезнью почек диализной стадии. Профилактическая медицина. 2020;23(6):91–98. doi: 10.17116/profmed20202306291. [Kazakova IA, Ievlev EN. [Features of moxonidine (physiotens) effect on dialysis stage patients' with chronic kidney disease cardiovascular system and life quality]. Profilakticheskaya Meditsina [Preventive Medicine]. 2020;23(6):91–98. Russian. doi: 10.17116/profmed20202306291.]
 22. Постнов ЮВ, Орлов СН. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран.



М.: Медицина; 1987. 192 с. [Postnov YuV, Orlov SN. [Primary hypertension as a cell membrane pathology]. Moscow: Meditsina; 1987. 192 p. Russian.]

23. Boero R, Guarena C, Deabate MC, Rolando B, Rosati C, Quarello F, Piccoli G. Erythrocyte Na⁺, K⁺ pump inhibition after saline infusion in essentially hypertensive subjects: effects of canrenone administration. *Int J Cardiol.*

1989;25 Suppl 1:S47–S52. doi: 10.1016/0167-5273(89)90092-2.

24. Зелтынь-Абрамов ЕМ, Земченков АЮ. Артериальная гипертензия при ХБП: от начальных до продвинутых стадий. Диагностические и терапевтические стратегии. Часть 2. Заместительная почечная терапия (программный гемодиализ). *Нефрология и диализ.* 2020;22(2):237–251. doi: 10.28996/2618-

9801-2020-2-237-251. [Zeltyń-Abramov EM, Zemchenkov AYU. [Hypertension and chronic kidney disease: from initial to advanced stages. Diagnostic and therapeutic strategies. Part 2. Renal replacement therapy (maintenance hemodialysis)]. *Nephrology and Dialysis.* 2020;22(2):237–251. Russian. doi: 10.28996/2618-9801-2020-2-237-251.]

Structural and functional abnormalities of cell membranes in the end-stage chronic kidney disease

E.N. Ievlev^{1,2} • I.A. Kazakova¹ • E.P. Sukhenko³

Background: Chronic kidney disease (CKD) is associated with abnormalities in all functions of the body systems including changes in intracellular processes. Assessment of erythrocyte electrophoretic mobility (EEM) in patients with CKD stage 5 on dialysis (5d) has becoming increasingly relevant, since this method characterizes the pathophysiological state of the patient and gives the possibility to modify treatment.

Aim: To identify EEM characteristics in patients on programmed hemodialysis and their association with clinical and laboratory parameters.

Materials and methods: We performed a cross-sectional observational study in 220 patients with confirmed CKD 5d. The average age of the patients was 56.5±1.4 years (26 to 85 years) and the duration of dialysis therapy was 3.7±0.4 years. The Kt/V urea adequacy index was 1.54±0.08. The control group included 60 healthy blood donors, comparable for their age and sex. EEM was assessed with Cyto-Expert kit (Axion Holding, Izhevsk, 2010) and the WT-Cell program (LLC Westtrade LTD, 2019). Statistical analysis was performed with BioStat 2019 software.

Results: The patients on the programmed hemodialysis had lower values of oscillation amplitude (10.2±0.5 μm and 21.2±2.1 μm, p<0.001) and lower proportion of mobile red blood cells (69.5±1.8%, 89.7±9.9%, p<0.001), compared to the control group. Lower values of the oscillation amplitude were found in the age group of 25 to 44 years (9.0±1.0 μm, p<0.05). There was a weak positive correlation between age and amplitude of erythrocyte oscillation (R=0.20, p<0.05). There were differences in the oscillation amplitude values in the patients with various dialysis experience: 1 to

2 years, 11.3±0.8 μm, 2 to 5 years, 9.9±0.7 μm, 6 to 10 years, 9.4±1.3 μm, and over 11 years, 7.4±0.9 μm (p<0.05). The duration of dialysis therapy demonstrated a weak negative correlation with the amplitude of erythrocyte oscillation (R=-0.24, p<0.01). The erythrocyte oscillation amplitude was associated with systolic blood pressure before hemodialysis procedure (R=0.34, p<0.05) and with pulse pressure before hemodialysis (R=0.37, p<0.05). The proportion of mobile erythrocytes correlated with parathyroid hormone level (R=0.32, p<0.05). **Conclusion:** EEM in the patients receiving programmed hemodialysis have their specific characteristics related to a significant decrease in the oscillation amplitude proportional to the effective cell charge and lower proportions of mobile erythrocytes compared to those in the healthy control. The erythrocyte oscillation amplitude is negatively correlated with age and duration of dialysis therapy and is associated with blood pressure parameters and mineral bone indices.

Key words: electrophoretic mobility shift assay, chronic kidney disease, renal dialysis, arterial hypertension, antihypertensive therapy, erythrocyte oscillation amplitude, effective cell charge

For citation: Ievlev EN, Kazakova IA, Sukhenko EP. Structural and functional abnormalities of cell membranes in the end-stage chronic kidney disease. *Almanac of Clinical Medicine.* 2021;49(6):419–426. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-056.

Received 2 November 2021; revised 15 November 2021; accepted 17 November 2021; published online 6 December 2021

Evgeniy N. Ievlev – MD, PhD, Assistant, Chair of Internal Diseases with Courses of Radiological Methods for Diagnostics and Treatment, Military Field Therapy¹; Therapist, Hospital Complex No. 2²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0395-7946>
✉ 281 Kommunarov ul., Izhevsk, 426034, Russian Federation. Tel.: +7 (912) 443 39 00.
E-mail: inloja@mail.ru

Irina A. Kazakova – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Internal Diseases with Courses of Radiological Methods for Diagnostics and Treatment, Military Field Therapy¹.
E-mail: i.a.kazakova@yandex.ru

Evgeniy P. Sukhenko – PhD (in Phys. and Math.), Associate Professor, Deputy Director General³.
E-mail: eugens@udm.ru

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

All the authors have equally contributed to the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹ Izhevsk State Medical Academy; 281 Kommunarov ul., Izhevsk, 426034, Russian Federation

² City Hospital No. 6 (Udmurt Republic); 81 Lenina ul., Izhevsk, 426009, Russian Federation

³ LLC Westtrade LTD; 1A–9 1-y Varshavskiy proezd, Moscow, 115201, Russian Federation



Оригинальная статья

Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов

Шерстюкова Е.А.^{1,2} • Иноземцев В.А.¹ • Козлов А.П.² • Гудкова О.Е.¹ • Сергунова В.А.¹

Шерстюкова Екатерина Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>
✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25–2, Российская Федерация. Тел.: +7 (985) 965 78 17.
E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Иноземцев Владимир Александрович – науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>. E-mail: va.inozemcev@physics.msu.ru

Козлов Александр Павлович – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Гудкова Ольга Евгеньевна – ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Сергунова Виктория Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., заведующая лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>. E-mail: vika_23s82@mail.ru

¹ Научно-исследовательский институт общей реиатологии имени В.А. Неговского ФНЦ РР; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

Обоснование. Механические свойства мембран клеток и их структурная организация считаются одними из наиболее важных биологических параметров, влияющих на функциональное состояние клетки. При воздействии патогенных факторов различной природы мембраны эритроцитов теряют эластичность. Как при этом изменяются их биомеханические характеристики – вопрос важный, но малоизученный. Представляется интересным изучить деформацию нативных эритроцитов на глубину, соизмеримую с их деформацией в кровотоке.

Цель – исследовать закономерности глубокой деформации и особенности структурной организации мембран нативных эритроцитов до и после воздействия физико-химических агентов *in vitro*.

Материал и методы. Морфологию клеток, особенности наноструктуры и деформации мембран нативных эритроцитов в растворе гемоконсерванта CPD/SAGM исследовали с использованием атомно-силового микроскопа NTEGRA Prima. В качестве модификаторов применяли гемин, ионы цинка (Zn^{2+}) и ультрафиолетовое излучение (УФ). Для характеристики жесткости мембраны измеряли силовые кривые $F(h)$, $h_{1/2}$ – глубину, до которой процесс погружения зонда описывается взаимодействием с однородной средой, а также оценивали величину модуля Юнга мембраны эритроцитов.

Результаты. Установлено, что воздействие гемина, Zn^{2+} и УФ приводило к трансформации формы клеток, возникновению топологических дефектов и изменению механических характеристик мембран эритроцитов. При воздействии

гемина модуль Юнга увеличился с 10 ± 4 до $27,2 \pm 8,6$ кПа ($p < 0,001$), под влиянием Zn^{2+} – до $21,4 \pm 8,7$ кПа ($p = 0,002$), УФ – до $18,8 \pm 5,6$ кПа ($p = 0,001$). Величина $h_{1/2}$ составила 815 ± 210 нм для контрольного образца и уменьшалась после действия гемина до 420 ± 80 нм ($p < 0,001$), Zn^{2+} – до 370 ± 90 нм ($p < 0,001$), УФ – 614 ± 120 нм ($p = 0,001$).

Заключение. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов взаимодействия поверхностей мембран нативных эритроцитов со стенками мелких сосудов и могут быть полезны в клинической медицине как дополнительные характеристики при оценке качества эритроцитов, а также послужить основой для биофизических исследований механизма действия окислительных процессов различного происхождения.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, деформируемость мембраны, эритроциты, гемин, ионы цинка, ультрафиолетовое излучение, дефекты мембран

Для цитирования: Шерстюкова ЕА, Иноземцев ВА, Козлов АП, Гудкова ОЕ, Сергунова ВА. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):427–434. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-059.

Поступила 12.11.2021; доработана 25.11.2021; принята к публикации 29.11.2021; опубликована онлайн 06.12.2021

Механические свойства мембран клеток и их структурная организация считаются одними из наиболее важных биологических параметров, влияющих на функциональное состояние клетки, поскольку могут служить пусковым механизмом развития патологических процессов. В этой связи ведутся исследования наноструктуры

и механических свойств мембран клеток в разных условиях: воздействия физико-химических факторов, протекания воспалительных процессов в организме, при различных заболеваниях, под действием ионизирующего излучения, гемотрансфузии и др.

Эритроциты обладают уникальной способностью подвергаться клеточной деформации

и проходить через капилляры, размер которых меньше их диаметра, и выполнять свою роль в качестве переносчиков газа между кровью и тканями [1, 2]. Известно, что при микрососудистых заболеваниях, таких как диабетические осложнения, при серповидноклеточной анемии [3], гипергликемии [4], во время хранения донорской крови [5–7], при воздействии окислителей [1, 8–14], ионизирующего излучения [15, 16] и других факторов изменяются биомеханические характеристики, структура и упруго-эластичные свойства мембран эритроцитов, что в дальнейшем может привести к снижению скорости капиллярного кровотока и развитию застойных явлений в микроциркуляции.

Механические свойства эритроцитов во многом определяются жесткостью их мембран и состоянием цитоскелета, выстилающего внутреннюю сторону клетки [17]. Их оценка – технически и методически весьма сложная задача, которая может быть решена только путем измерения свойств нативных клеточных мембран [7, 18], исключая применение мембранных фиксаторов [19, 20]. Только в этом случае результат будет максимально приближен к характеристикам живого биологического объекта. Однако остается неясным, сохраняют ли эритроциты способность претерпевать значительные деформации, соизмеримые с деформацией в капиллярном русле. Для решения данной задачи наиболее перспективным представляется метод атомно-силовой спектроскопии.

Цель – исследовать закономерности глубокой деформации и особенности структурной организации мембран нативных эритроцитов до и после воздействия патогенных факторов *in vitro*.

Материал и методы

На рис. 1 дана схема эксперимента. Все эксперименты проводили *in vitro*. На первом этапе эксперимента удаляли остатки консервирующего раствора путем трехкратного центрифугирования 200 мкл эритроцитной взвеси (ЭВ) при 1500 об/5 минут в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 (MP Biomedicals, Франция). На втором этапе к эритроцитам добавляли различные модификаторы или воздействовали ультрафиолетовым излучением (УФ).

Для экспериментов использовали ЭВ в герметичных контейнерах с антикоагулянтом CPD и ресуспендирующим раствором SAGM. ЭВ получали в центрах переливания крови г. Москвы и хранили при 4 °С. Для экспериментов применяли ЭВ 2–5 суток хранения.

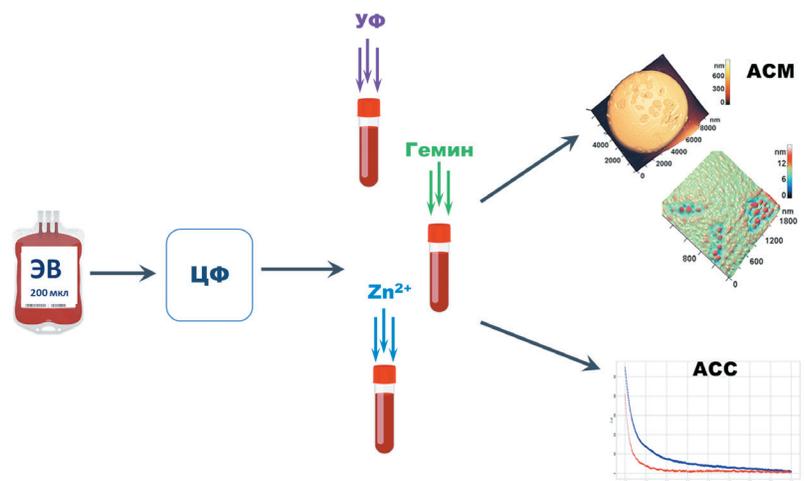


Рис. 1. Схема эксперимента; АСМ – атомно-силовая микроскопия, АСС – атомно-силовая спектроскопия, УФ – ультрафиолетовое излучение, ЦФ – центрифуга, ЭВ – эритроцитная взвесь

На мембраны эритроцитов воздействовали различными физико-химическими агентами: гемин (природный окислитель), ионами тяжелых металлов (Zn^{2+}) и УФ.

В первой серии экспериментов использовали сухой гемин (Sigma, США). Для приготовления рабочего раствора А растворяли 200 мг NaOH в 10 мл дистиллированной воды. Затем приготавливали раствор В. Для этого 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл раствора А и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Раствор В вводили в объеме 50 мкл в пробирку с ЭВ. Время воздействия составило 15 минут.

Во второй серии экспериментов использовали Zn^{2+} . Для приготовления модификатора растворили 180 мг $ZnSO_4$ (Sigma, США) в 10 мл фосфатного буфера pH 7,4. Затем 10 мкл полученного раствора добавили в 100 мкл эритроцитов. Концентрация ионов Zn^{2+} составляла 4 мМ. Время воздействия – 15 минут.

В третьей серии экспериментов в качестве источника УФ использовался ультрафиолетовый бактерицидный облучатель (ОРУБп-3-3 фирмы «КРОНТ», Россия). Длина волны излучения $\lambda = 254$ нм, энергия фотона $E = 4,8$ эВ. Площадь облучаемой поверхности суспензии в кювете $S = 12,6$ см². Для обеспечения однородности облучения 150 мкл ЭВ разбавляли в 50 мл PBS pH 7,4. Облучали 20 мл суспензии в течение 30 минут.

Для получения монослоя клеток использовали устройство V-Sampler (Vision, Австрия).

Для исследования механических свойств мембран приготавливали суспензию эритроцитов.



Для этого 50 мкл эритроцитов добавляли в 10 мл PBS. Затем 200 мкл полученной суспензии наносили на покровные стекла, предварительно покрытые раствором полилизина (MP Biomedicals, Франция), и оставляли на 30 минут для осаждения клеток. Полученный образец промывали в PBS в течение 10 секунд, после чего измеряли силовые кривые.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ) NTEGRA Prima (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия) использовался для получения изображения клеток, их наноструктуры, а также для измерения жесткости мембран нативных эритроцитов. Изображения получали с помощью кантилеверов NSG01 с золотым отражающим покрытием, радиусом зонда 10 нм и коэффициентом жесткости 5 Н/м (TipsNano, Эстония). В полуконтактном режиме сканировали поля размером от 50×50 до 2×2 мкм². Для каждого изображения устанавливалось количество точек от 512 до 1024. Для измерения механических свойств мембран эритроцитов использовали кантилеверы SD-R150-T3L450B-10 (Nanosensors, Швейцария) с радиусом зонда 150 нм и коэффициентом жесткости 1 Н/м.

Поверхность мембраны эритроцитов представляет собой сложную неоднородную структуру. С помощью пространственного преобразования Фурье сложное изображение наноповерхности мембран эритроцитов, полученное на АСМ, раскладывалось на поверхности двух порядков. При этом спектральное окно с низкими пространственными частотами ($0,002$ – $0,001$ нм⁻¹) давало возможность получить изображения мембранных структур с большим пространственным периодом, а спектральное окно с высокими частотами ($0,02$ – $0,003$ нм⁻¹) – изображения мембранных структур с небольшим пространственным периодом. Параметры пространственных масштабов подбирались в соответствии с природными структурами мембран эритроцитов.

Разложение наноповерхности осуществляли в несколько этапов. На первом этапе с помощью АСМ было получено изображение наноповерхности мембран клеток размером от 2×2 мкм². Полученное изображение обозначали как Π_0 . На втором этапе производилось разложение исходной поверхности Π_0 на сумму поверхностей двух пространственных масштабов ($\Pi_1 + \Pi_2$). Каждая из полученных поверхностей соответствует физиологическим структурам мембран эритроцитов – зонам фликкеринга эритроцита (Π_1), цитоскелету (Π_2). Далее пространственные масштабы Π_1 и Π_2 были названы как порядок. Для получения поверхности первого порядка Π_1

выполняли сглаживание изображения исходной поверхности Π_0 в программе FemtoScan Online. Для мембран клеток использовали сглаживающий фильтр с маской 9 точек. Затем из изображения Π_0 вычитали Π_1 и получали изображение Π_2 , которое сглаживали фильтром с маской 3 точек. Таким образом получалось изображение второго порядка Π_2 .

Более подробное разложение исходной поверхности на сумму поверхностей трех пространственных периодов описано в работе [21]. На каждом полученном изображении поверхности первого и второго порядков были измерены типовые параметры топологических наноструктур: средняя высота h впадины до максимумов и пространственный период L между максимумами структуры.

Механические свойства мембран эритроцитов определяли по силовым кривым, полученным в результате прогиба мембраны внутрь клетки под действием приложенной силы. Модуль Юнга E (кПа) использовался для оценки жесткости мембран эритроцитов на основе модели Герца [22], описывающей упругую деформацию двух контактирующих тел [19, 23–25]:

$$F = \frac{4}{3}ER^{0.5}h^{1.5}, \quad (1)$$

где E – модуль Юнга материала, R – радиус зонда, h – глубина прогиба мембраны. При этом делается предположение, что эритроцит является однородным материалом при малых глубинах прогиба по сравнению с толщиной всей клетки, а зонд не деформируется, и нет никаких дополнительных взаимодействий между зондом и образцом (мембраной эритроцитов). Следовательно, если степень при h не равна 1,5, то взаимодействие происходит с неоднородным материалом. Именно поэтому экспериментальные силовые кривые $F(h)$ также аппроксимировали функцией вида:

$$F(h) = ah^b, \quad (2)$$

где a – некоторый коэффициент, h – глубина прогиба мембраны, b – показатель степени функции. Степень b определяли пошагово для различных глубин прогиба мембраны h_i с шагом $\Delta h = 5$ нм. Вычисление b производили от глубины h_{\max} до глубины h_i , на которой показатель степени функции (2) совпадает с показателем в формуле Герца, то есть $b = 1,50$. Эту глубину прогиба будем называть h_{Hz} .

Другими словами, глубина h_{Hz} – это наибольшая глубина погружения зонда в мембрану

эритроцита, где мембрану можно рассматривать как однородную линейную упругую среду. На глубине h_{Hz} экспериментальная кривая $F(h)$ подчиняется модели Герца.

Для каждого образца было приготовлено по 3 мазка с монослоями эритроцитов. На каждом мазке было просканировано по 5 АСМ-изображений размером 50×50 мкм². Для анализа наноструктуры мембран эритроцитов сканировался участок размером 2×2 мкм² на 30 клетках для каждого образца. Всего было проанализировано 360 участков мембран.

В режиме атомно-силовой спектроскопии действовали на клетки с заданной силой F и получали силовые кривые. На каждом образце измеряли по 100 нативных клеток. Для каждой эмпирической кривой $I(Z)$ делали переход к зависимости $F(h)$ для расчета модуля Юнга мембран эритроцитов [19, 26]. Всего в исследовании было проанализировано 400 нативных клеток.

Этическая экспертиза. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФНКЦ РР (протокол № 2/20 от 10.06.2020).

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью программы OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, США). Статистические данные представлены как среднее со стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Непрерывные переменные предварительно анализировали на нормальность распределения при помощи теста Шапиро – Уилка. Для проверки значимости различия между средними в разных группах использовали программу ANOVA и критерий Краскела – Уоллиса с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для каждой измеренной в эксперименте силовой кривой были определены модуль Юнга E и глубина h_{Hz} .

В контрольном образце наблюдались двояковогнутые дискоциты. Размер клеток был $8,5 \pm 0,7$ мкм. Пространственный период L наноповерхности мембраны, показанный на рис. 2Б, составлял $74,8 \pm 12,1$ нм, а высота ее шероховатости h не превышала 2 ± 1 нм.

При этом по 100 измеренным силовым кривым жесткость мембран контрольных эритроцитов составила 10 ± 4 кПа, а глубина однородной деформации h_{Hz} – 815 ± 210 нм (рис. 3).

После воздействия на мембраны эритроцитов геминном, ионами Zn^{2+} , УФ-излучением наблюдали изменения собственных параметров мембран.

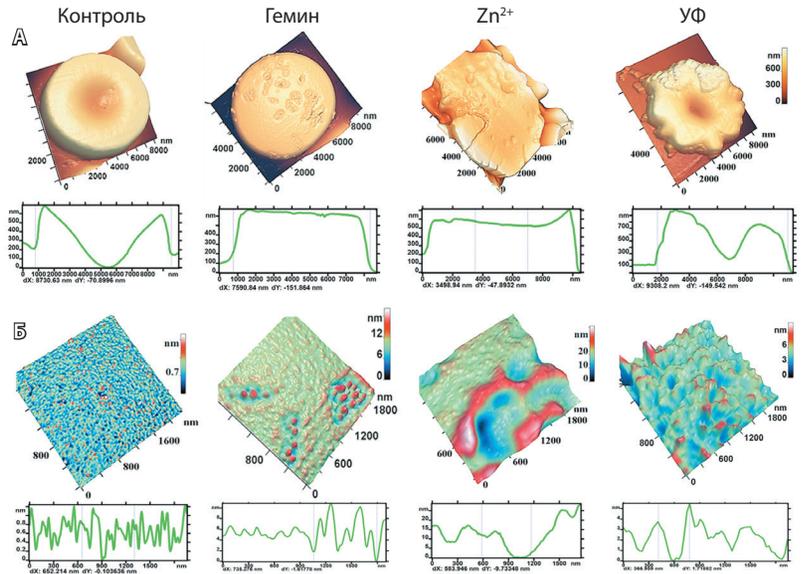


Рис. 2. Эритроциты после воздействия гемина, Zn^{2+} и ультрафиолетового излучения (УФ): **А** – атомно-силовая микроскопия (АСМ): 3D-изображения типовых форм клеток (сверху) и их профиль (снизу); **Б** – АСМ-изображение второго порядка P_2 и соответствующие профили. Приведены цветовые шкалы, соответствующие разным высотам

Выбранные агенты имели различную физико-химическую природу и разные механизмы действия. На рис. 2 показаны характерные формы клеток, параметры наноструктуры и их профили соответственно.

Гемин – окислитель биологических структур, в частности, изменяющий морфологию эритроцитов. Гемин влияет на конформацию спектрина, белковой полосы 4.1 и ослабляет связи между ними [27, 28]. В результате воздействия гемина дискоциты превращались в планоциты с дефектами на мембране. На рис. 2А показана типовая клетка после действия гемина и ее профиль. Гемин приводил к формированию зерен на поверхности мембраны. Типичный размер зерна был 160 ± 40 нм. Высота каждого зерна составляла 12 ± 5 нм. Топологические зерна были организованы на клеточной мембране в виде отдельных доменов. Размеры доменов варьировались от 300 до 1500 нм.

Воздействие гемина вызывало рост модуля Юнга E по сравнению с контролем до $27,2 \pm 8,6$ кПа ($p < 0,001$), а глубина прогиба мембраны уменьшилась до $h_{Hz} = 420 \pm 80$ нм ($p < 0,001$) (см. рис. 3).

Ионы Zn^{2+} вызывают изменение вторичных белковых структур и приводят к их агрегации [29, 30]. АСМ-изображение характерной клетки и ее профиль после действия Zn^{2+} представлены на рис. 2А. Характерные высоты $h = 17 \pm 5$ нм и пространственные периоды $L = 240 \pm 60$ нм

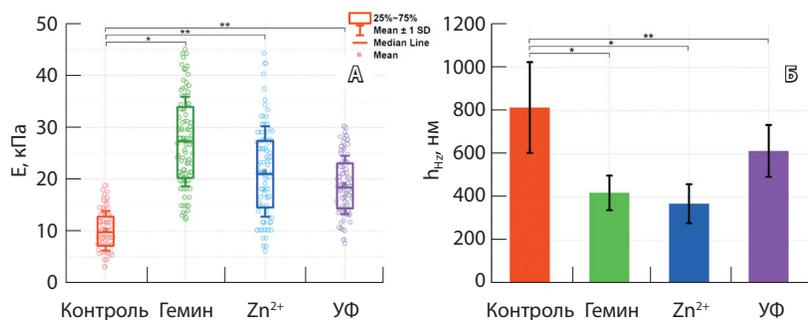


Рис. 3. Изменение модуля Юнга E (А) и глубины h_{Hz} (Б) эритроцитов после воздействия гемина, Zn^{2+} и ультрафиолетовым излучением (УФ): А – данные в прямоугольниках представлены от 25- до 75-го перцентилей со стандартным отклонением, горизонтальная линия показывает медианное значение, экспериментальные данные показаны точками; Б – экспериментальные данные изменения глубины h_{Hz} : по оси абсцисс – экспериментальные образцы, по оси ординат – глубины h_{Hz} (нм); * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольным образцом

наноструктуры указывали на то, что воздействие ионов цинка не только вызывает изменение формы клеток, но и повреждает мембранную структуру (см. рис. 2Б). Воздействие цинка увеличивало фликкеринг мембраны, нарушало структуру цитоскелета и вызывало агрегацию белков. При этом на АСМ-изображениях наблюдались дефекты в виде провалов и пор глубиной до 40–60 нм и диаметром 500–700 нм.

Величина модуля Юнга при действии цинка составила $21,4 \pm 8,7$ кПа ($p = 0,002$). Кроме того, воздействие ионов Zn^{2+} вызвало уменьшение глубины прогиба h_{Hz} до 370 ± 90 нм ($p < 0,001$) (см. рис. 3Б).

Воздействие УФ-излучения приводит к активации активных форм кислорода в крови и тем самым к развитию окислительных процессов [31, 32]. В результате воздействия УФ на кровь возникал полиморфизм клеток, появлялись дефекты на мембране эритроцитов (см. рис. 2А). Дискациты трансформировались в стоматоциты, эхиоциты, сферозхиоциты, сфероциты, тени. На рис. 2 показан типичный эхиоцит размером 9,3 мкм, высота которого 900 нм. А жесткость мембран эритроцитов увеличивалась в 1,8 раза до $18,8 \pm 5,6$ кПа ($p = 0,001$), при этом глубина h_{Hz} составила 614 ± 120 нм ($p = 0,001$).

Обсуждение

Механические свойства мембран эритроцитов, наряду с морфологией клеток и наноструктурой их мембран, в большой степени определяют реологические свойства крови в целом. В частности, от деформируемости эритроцитов зависит их способность проникать в русло капилляров и осуществлять газообмен [2].

В настоящем исследовании мы оценивали жесткость мембран эритроцитов, способность мембраны прогибаться внутрь клетки, а также изменение морфологии и наноструктуры после воздействия различных физико-химических факторов. Эндогенные и экзогенные факторы могут влиять на форму эритроцитов и превращать их из дискоцитов в другие формы клеток за счет изменения белковых структур мембраны [3, 5, 15, 30]. Мембрана эритроцитов более чем на 50% состоит из белков, играющих ключевую роль во многих процессах жизнедеятельности клетки. К основным компонентам белкового цитоскелета эритроцитов относятся спектрин, белковые комплексы актина, белок 4.1R, анкирин, а также связанные с ними тропомиозин, тропомодулин, аддуцин и дематин. Нарушение связей между этими компонентами может вызвать образование дефектов, провалов на мембране или агрегацию ее белковых структур, которые в конечном счете приведут к изменению формы клетки.

Другими авторами было показано, что форма клеток и их деформационная способность изменяются. Так, у больных сахарным диабетом отмечалось снижение деформационной способности эритроцитов, а форма клеток становилась более вытянутой и сильно отличалась от контрольной группы [5, 33]. В работе [34] установлено, что у пациентов, находящихся в критических состояниях, происходили патологические изменения морфологии и наноструктуры эритроцитов, при этом механические свойства не оценивались. При исследовании влияния рентгеновского излучения на эритроциты оказалось, что жесткость клеток увеличивается в несколько раз [15, 16]. Согласно результатам ряда исследований, изучавших длительное хранение эритроцитной взвеси, было установлено, что по мере хранения эритроциты трансформировались преимущественно в эхиоциты и сферозхиоциты и одновременно наблюдалось увеличение жесткости мембран эритроцитов [6, 7].

При анализе механических свойств мембран эритроцитов необходимо иметь в виду, что мембрана представляет собой сложную структуру. Следовательно, при погружении зонда в клетку слои мембраны будут обладать разными механическими свойствами, и только на определенной глубине (на глубине h_{Hz}) мембрана будет деформироваться однородно и описываться моделью Герца. Именно поэтому в нашей работе была проведена оценка глубины h_{Hz} для каждого образца. Данный параметр имеет важное значение для реологии крови. При прохождении через капилляр диаметром около 5 мкм эритроциту необходимо изогнуться



с каждой стороны примерно на 600–1000 нм. В этой связи важно было не только понять, как воздействие различных физико-химических агентов влияет на мембрану, но и узнать, какое действие они оказывают на деформационную способность клеток. В результате было установлено, что мембраны контрольных эритроцитов ведут себя как однородные упругие структуры вплоть до 1000 нм, что соизмеримо с деформациями в капиллярном русле, а воздействие УФ-излучения и мембранных модификаторов приводило к уменьшению глубины однородной деформации.

Отметим, что в опубликованных к настоящему времени работах показано влияние различных патогенных факторов на форму клеток и структуру их мембраны, есть отдельные исследования упруго-эластичных свойств мембран эритроцитов, однако комплексного исследования проведено не было. Кроме того, в имеющихся работах модуль Юнга оценивают на глубинах до 200 нм. Преимуществом нашей работы является тот факт, что мы проводим оценку жесткости мембраны на глубине, которая соизмерима с деформацией в капилляре.

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 0427-2021-0003.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Е.А. Шерстюкова – концепция и дизайн исследования, участие в эксперименте, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; В.А. Иноземцев – выполнение экспериментального исследования, измерение и обработка силовых кривых,

Заключение

С помощью атомно-силовой микроскопии мы показали, что воздействие гемина, ионов Zn^{2+} и УФ-излучения приводило к изменению формы клеток и наноструктуры их мембран с образованием топологических локальных дефектов. Методом атомно-силовой спектроскопии было установлено увеличение жесткости мембран эритроцитов для всех опытных образцов, при этом глубина однородной деформации становилась меньше. Таким образом, действие различных физико-химических агентов на эритроциты может не только вызвать изменения формы клеток и их мембран, но и существенно изменить их механические свойства. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов взаимодействия поверхностей мембран нативных эритроцитов со стенками мелких сосудов и могут быть полезны в клинической медицине как дополнительные характеристики при оценке качества эритроцитов, а также послужить основой для биофизических исследований механизма действия окислительных процессов различного происхождения. ☺

расчет глубины $h_{из}$, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; А.П. Козлов – выполнение экспериментального исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; О.Е. Гудкова – выполнение экспериментального исследования, редактирование рукописи; В.А. Сергунова – выполнение экспериментального исследования, получение изображений с помощью атомно-силового микроскопа и их обработка, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014;8(5):051501. doi: 10.1063/1.4895755.
2. Александрова НП, Карандашов ВИ, Кудлай ДА. Особенности механизма нарушения деформируемости эритроцитов при различных заболеваниях. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2021;(1):74–80. doi: 10.25555/THR.2021.1.0965. [Alexandrova NP, Karandashov VI, Kudlay DA. [Specificities in mechanism of erythrocyte deformability disorders in various diseases]. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*. 2021;(1):74–80. Russian. doi: 10.25555/THR.2021.1.0965.]
3. Gutierrez M, Shamoun M, Seu KG, Tanski T, Kalfa TA, Eniola-Adefeso O. Characterizing bulk rigidity of rigid red blood cell populations in sickle-cell disease patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):7909. doi: 10.1038/s41598-021-86582-8.
4. Shin S, Ku Y. Hemorheology and clinical application: Association of impairment of red blood cell deformability with diabetic nephropathy. *Korea Aust Rheol J*. 2005;17(3):117–123.
5. Buys AV, Van Rooy MJ, Soma P, Van Papendorp D, Lipinski B, Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:25. doi: 10.1186/1475-2840-12-25.
6. Xu Z, Zheng Y, Wang X, Shehata N, Wang C, Sun Y. Stiffness increase of red blood cells during storage. *Microsystems Nanotech*. 2018;4:17103. doi: 10.1038/micronano.2017.103.
7. Манченко ЕА, Козлова ЕК, Сергунова ВА, Черныш АМ. Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении. *Общая реаниматология*. 2019;15(5):4–10. doi: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10. [Manchenko EA, Kozlova EK, Sergunova VA, Chernysh AM. [Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage]. *General Reanimatology*. 2019;15(5):4–10. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10.]



8. Li M, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, Xiao X, Zhang W. Atomic force microscopy imaging and mechanical properties measurement of red blood cells and aggressive cancer cells. *Sci China Life Sci.* 2012;55(11):968–973. doi: 10.1007/s11427-012-4399-3.
9. Dulińska I, Targosz M, Strojny W, Lekka M, Czubka P, Balwierz W, Szymoński M. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J Biochem Biophys Methods.* 2006;66(1–3):1–11. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.11.003.
10. Sisqueña X, Nebl T, Thompson JK, Whitehead L, Malpede BM, Salinas ND, Rogers K, Tolia NH, Fleig A, O'Neill J, Tham WH, Horgen FD, Cowman AF. Plasmodium falciparum ligand binding to erythrocytes induce alterations in deformability essential for invasion. *Elife.* 2017;6:e21083. doi: 10.7554/eLife.21083.
11. Vayá A, Rivera L, de la Espriella R, Sanchez F, Suescun M, Hernandez JL, Fácila L. Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;59(2):107–114. doi: 10.3233/CH-131751.
12. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sick cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:345–367. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105339.
13. Fornal M, Lekka M, Pyka-Fościk G, Lebed K, Grodzicki T, Wizner B, Styczeń J. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1–2):273–276.
14. Papi M, Ciasca G, Palmieri V, Maulucci G, Rossi C, Minelli E, De Spirito M. Nano-Mechanical Response of Red Blood Cells. Chapter 2. In: Korach CS, Tekalur SA, Zavattieri P, editors. *Mechanics of Biological Systems and Materials.* Vol. 6. Springer International Publishing; 2017. p. 11–16.
15. Zhang B, Liu B, Zhang H, Wang J. Erythrocyte stiffness during morphological remodeling induced by carbon ion radiation. *PLoS One.* 2014;9(11):e112624. doi: 10.1371/journal.pone.0112624.
16. Челнокова ИА, Шкляркова АН, Цуканова ЕВ, Никитина ИА, Стародубцева МН. Влияние рентгеновского излучения на наномеханические свойства поверхности эритроцитов крыс при гиперхолестеринемической диете. *Проблемы здоровья и экологии.* 2021;(3):105–115. doi: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-13. [Chelnokova IA, Shklyarova NM, Tsukanova AU, Nikitina IA, Starodubtseva MN. [Effect of X-ray radiation on the nanomechanical properties of the erythrocyte surface of rats on a high-cholesterol diet]. *Health and Ecology Issues.* 2021;(3):105–115. Russian. doi: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-13.]
17. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993;30(3):171–192.
18. Lekka M, Fornal M, Pyka-Fościk G, Lebed K, Wizner B, Grodzicki T, Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology.* 2005;42(4):307–317.
19. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron.* 2007;38(8):824–833. doi: 10.1016/j.micron.2007.06.011.
20. Сергунова ВА, Козлова ЕК, Мягкова ЕА, Черныш АМ. Измерение упруго-эластичных свойств мембраны нативных эритроцитов in vitro. *Общая реаниматология.* 2015;11(3):39–44. doi: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44. [Sergunova VA, Kozlova EK, Myagkova EA, Chernysh AM. [In Vitro Measurement of the Elastic Properties of the Native Red Blood Cell Membrane]. *General Reanimatology.* 2015;11(3):39–44. doi: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44.]
21. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013;44:218–227. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
22. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik.* 1882;1882(92):156–171. German. doi: 10.1515/crll.1882.92.156.
23. Thomas B, Burnham NA, Camesano TA, Wen Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J Vis Exp.* 2013;(76):50497. doi: 10.3791/50497.
24. Codan B, Martinelli V, Mestroni L, Sbaizero O. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(6):3303–3308. doi: 10.1016/j.msec.2013.04.009.
25. Li M, Liu L, Xu X, Xing X, Dang D, Xi N, Wang Y. Nanoscale characterization of dynamic cellular viscoelasticity by atomic force microscopy with varying measurement parameters. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;82:193–201. doi: 10.1016/j.jmbm.2018.03.036.
26. Kozlova E, Chernysh A, Manchenko E, Sergunova V, Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning.* 2018;2018:1810585. doi: 10.1155/2018/1810585.
27. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep.* 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
28. Космачевская ОВ, Насыбуллина ЭИ, Блиндарь ВН, Топунов АФ. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019;55(2):107–123. doi: 10.1134/S0555109919020090. [Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Topunov AF, Blindar VN. [Binding of erythrocyte hemoglobin to the membrane to realize signal-regulatory function (review) *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 2019;55(2):107–123. Russian. doi: 10.1134/S0555109919020090.]
29. Turrini F, Mannu F, Arese P, Yuan J, Low PS. Characterization of the autologous antibodies that opsonize erythrocytes with clustered integral membrane proteins. *Blood.* 1993;81(11):3146–3152. doi: 10.1182/blood.V81.11.3146.3146.
30. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV, Sergunova VA, Gudkova OYe, Fedorova MS. Reversible zinc-induced injuries to erythrocyte membrane nanostructure. *Bull Exp Biol Med.* 2012;154(1):84–88. doi: 10.1007/s10517-012-1881-7.
31. Misra RB, Ray RS, Hans RK. Effect of UVB radiation on human erythrocytes in vitro. *Toxicol Vitro.* 2005;19(3):433–438. doi: 10.1016/j.tiv.2004.12.004.
32. Kozlova E, Chernysh A, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E, Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J Mol Recognit.* 2018;31(10):e2724. doi: 10.1002/jmr.2724.
33. Шаповалова ОО, Шамрова ЕА, Федосеев ЕН. Исследование деформируемости мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом. *Территория инноваций.* 2019;1(29):80–86. [Shapovalova OO, Shamrova EA, Fedoseev EN. [Erythrocyte membrane deformability study in diabetics]. *Territoriya innovatsiy* [Territory of Innovations]. 2019;1(29):80–86. Russian.]
34. Гречко АВ, Молчанов ИВ, Сергунова ВА, Козлова ЕК, Черныш АМ. Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование). *Общая реаниматология.* 2019;15(6):11–20. doi: 10.15360/1813-9779-2019-6-11-20. [Grechko AV, Molchanov IV, Sergunova VA, Kozlova EK, Chernysh AM. [Defects of Red Blood Cell Membranes in Patients with Brain Dysfunction (Pilot Study)]. *General Reanimatology.* 2019;15(6):11–20. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2019-6-11-20.]



Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents

E.A. Sherstyukova^{1,2} • V.A. Inozemtsev¹ • A.P. Kozlov² •
O.E. Gudkova¹ • V.A. Sergunova¹

Background: Mechanical properties of cell membranes and their structural organization are considered among the most important biological parameters affecting the functional state of the cell. Under the influence of various pathogenic factors, erythrocyte membranes lose their elasticity. The resulting changes in their biomechanical characteristics is an important, but poorly studied topic. It is of interest to study the deformation of native erythrocytes to a depth compatible with their deformation in the bloodstream.

Aim: To investigate the patterns of deep deformation and the particulars of structural organization of native erythrocyte membranes before and after their exposure to physicochemical agents *in vitro*.

Materials and methods: Cell morphology, nanostructure characteristics, and membrane deformation of native erythrocytes in a solution of hemoconservative CPD/SAGM were studied with atomic force microscope NTEGRA Prima. Hemin, zinc ions (Zn^{2+}), and ultraviolet (UV) radiation were used as modifiers. To characterize the membrane stiffness, we measured the force curves $F(h)$, h_{Hz} (the depth to which the probe immersion is described by interaction with a homogeneous medium), and the Young's modulus values of the erythrocyte membrane.

Results: Exposure to hemin, Zn^{2+} and UV radiation led to transformation of the cell shape, appearance of topological defects and changes in mechanical characteristics of erythrocyte membranes. Under exposure to hemin, Young's modulus increased

from 10 ± 4 kPa to 27.2 ± 8.6 kPa ($p < 0.001$), exposure to Zn^{2+} , to 21.4 ± 8.7 kPa ($p = 0.002$), and UV, to 18.8 ± 5.6 kPa ($p = 0.001$). The h_{Hz} value was 815 ± 210 nm for the control image and decreased under exposure to hemin to 420 ± 80 nm ($p < 0.001$), Zn^{2+} , to 370 ± 90 nm ($p < 0.001$), and UV, to 614 ± 120 nm ($p = 0.001$).

Conclusion: The results obtained contribute to a deeper understanding of interaction between membrane surfaces of native erythrocytes and small vessel walls. They can be useful in clinical medicine as additional characteristics for assessment of the quality of packed red blood cells, as well as serve as a basis for biophysical studies into the mechanisms of action of oxidative processes of various origins.

Key words: atomic force microscopy, membrane deformability, erythrocytes, hemin, zinc ions, ultraviolet radiation, membrane defects

For citation: Sherstyukova EA, Inozemtsev VA, Kozlov AP, Gudkova OE, Sergunova VA. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. Almanac of Clinical Medicine. 2021;49(6):427–434. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-059.

Received 12 November 2021; revised 25 November 2021; accepted 29 November 2021; published online 6 December 2021

Ekaterina A. Sherstyukova – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; Assistant Professor, Chair of Medical and Biological Physics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>

✉ 25–2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 965 78 17. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Vladimir A. Inozemtsev – Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>. E-mail: va.inozemtcev@physics.msu.ru

Aleksandr P. Kozlov – PhD (in Phys. and Math.), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Olga E. Gudkova – Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Viktoriya A. Sergunova – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Head of Laboratory of Biophysics of Cell Membranes in Critical States¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>. E-mail: vika_23s82@mail.ru

Funding

The study was performed as a part of the State task from the Ministry of Health of the Russian Federation # 0427-2021-0003.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests related to the study.

Authors' contributions

E.A. Sherstyukova, the study concept and design, participation in the experiment, data analysis, text writing, editing of the manuscript; V.A. Inozemtsev, the experimental part of the study, measurement and processing of the force curve, calculation of h_{Hz} depth, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; A.P. Kozlov, the experimental part of the study, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; O.E. Gudkova, the experimental part of the study, editing of the manuscript; V.A. Sergunova, the experimental part of the study, image acquisition with the atomic force microscope and their processing, statistical analysis, text writing, editing of the manuscript. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

¹V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation



Клиническое наблюдение

Визуальная и акустическая обратная связь по опорной реакции для нижних и верхних конечностей на примере пациентки после инсульта

Исакова Е.В.¹ • Егорова Ю.В.¹

Исакова Елена Валентиновна – д-р мед. наук, науч. сотр. отделения неврологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0804-11128>
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (916) 904 85 52;
+7 (495) 631 74 32.
E-mail: isakovael@mail.ru

Егорова Юлия Владимировна – очный аспирант кафедры неврологии факультета усовершенствования врачей¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3504-046X>. E-mail: pjv90@mail.ru

Инсульт – основная причина инвалидности взрослого населения в мире. Последствия инсульта могут включать в себя различные нарушения – двигательные, когнитивные, эмоционально-поведенческие расстройства, что ведет к снижению активности больного в повседневной жизни, нарушению способности к самообслуживанию, а также негативно влияет на качество жизни. В настоящей статье дано описание клинического случая применения новой комплексной программы нейрореабилитационного лечения у пациентки в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта со спастическим гемипарезом, умеренными когнитивными и аффективными расстройствами. Программа нейрореабилитации основана на использовании биологической обратной связи по опорной реакции с применением слухового и зрительного каналов, где последовательно применяются классические статические и динамические стабилметрические тренировки в положении больного стоя на платформе, а также занятия с использованием силового джойстика для верхней конечности в положении больного сидя. Кроме того, комплексная программа включала в себя занятия с логопедом-нейропсихологом и занятия лечебной физкультурой. В результате лечения отмечено улучшение общего

состояния пациентки, восстановление функции движения верхней конечности, нормализация когнитивных функций, регресс аффективных расстройств. Полученный в ходе лечения эффект был стойким, при оценке неврологического статуса в динамике через 3 месяца прогрессирования неврологической симптоматики не выявлено. Таким образом, комплексное восстановительное лечение, основанное на комбинации повышенной физической активности с сенсорной стимуляцией, задачами для когнитивных функций, может способствовать хорошему восстановлению после инсульта.

Ключевые слова: инсульт, нейрореабилитация, постинсультные нарушения, биологическая обратная связь по опорной реакции, стабилметрия, силовой джойстик для верхней конечности

Для цитирования: Исакова ЕВ, Егорова ЮВ. Визуальная и акустическая обратная связь по опорной реакции для нижних и верхних конечностей на примере пациентки после инсульта. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):435–442. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-016.

Поступила 10.03.2021; доработана 31.03.2021; принята к публикации 05.04.2021; опубликована онлайн 06.04.2021

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

Инсульт выступает одной из ведущих причин смертности и инвалидности в мире, в настоящее время масштаб проблемы оценивается специалистами как всемирная неинфекционная эпидемия [1, 2]. Медико-социальные последствия инсульта

колоссальны: 31% больных, перенесших инсульт, нуждается в посторонней помощи, 20% не могут самостоятельно ходить, у больных развиваются когнитивные (40–70%) и аффективные (29–36%) расстройства, только 8% выживших способны вернуться к прежней работе [3, 4].

Установлено, что одна из наиболее частых причин стойкой утраты трудоспособности – нарушение движений в руке. Полное восстановление моторной функции верхней конечности после инсульта отмечается не более чем у 20%, при этом ее сохранность, наряду с адекватной когнитивной деятельностью и стабильным эмоциональным состоянием, служит важным предиктором повышения функциональной активности, расширения возможностей эффективной медицинской реабилитации и процесса ресоциализации больного [5]. Нарушение нормального функционирования верхней конечности, утрата ее базовых функций, включая снижение способности достичь цель «объект», проводить с объектом манипуляции, осуществлять содружественные координированные движения обеих рук, затрудняют выполнение самых простых привычных бытовых навыков, таких как прием пищи, переодевание, поддержание личной гигиены и др., что, безусловно, негативно влияет на состояние больного, ухудшая качество его жизни [6, 7].

Эффективное восстановление функции верхней конечности неразрывно связано с компенсацией когнитивного дефицита и коррекцией эмоционального статуса. Исследования последних десятилетий, обосновывая важность когнитивной обработки любого движения и сопровождающей его эмоциональной окраски, убедительно демонстрируют координирующую роль высших психических функций в моделировании этапов функционального восстановления [8, 9], что определяет построение оптимальной программы нейрореабилитации после инсульта, основываясь не исключительно на контексте двигательной парадигмы, но и на компонентах мультимодального эффекта, формируя взаимодействие с контрольными сенсомоторными сигналами, объединяющими планирование движения, его осознание, тренируя память, внимание, повышая мотивацию [10].

Перспективным представляется использование комплексных подходов, обосновывающих применение различных по физической природе стимуляций как составной части компьютерных технологий в целях максимального вовлечения всех анализаторных систем в реабилитационный процесс. При этом значительно расширяются возможности воздействия на сенсорные системы при использовании биологической обратной связи (БОС). БОС по опорной реакции активно внедряется в реабилитационный процесс, позволяя выполнять

разноплановые задачи, начиная от выработки устойчивости при поддержании вертикальной позы, уменьшения выраженности головокружения, аффективных и невротических реакций, повышения стабильности вегетативного обеспечения и заканчивая когнитивной стимуляцией и коррекцией речевой функции [11, 12]. В ходе выполнения тренировок включаются различные каналы – и зрительный, и слуховой, обеспечивающие БОС в доступной игровой форме. Разрабатываются новые более универсальные мобильные установки, расширяющие возможности применения силовых платформ, например, с использованием силового джойстика для восстановления двигательных функций верхней конечности [13, 14].

Учитывая вышеизложенное, представляется интересным опыт применения в комплексной программе нейрореабилитации тренировок с БОС по опорной реакции в стандартном положении пациента стоя на стабилметрической платформе, которые реализуются в стандартной 2D-виртуальной среде, а также в совокупности с применением легкого, более мобильного варианта платформы с силовым джойстиком для верхней конечности. Комплексная программа также включает в себя занятия с логопедом-нейропсихологом и лечебную физкультуру, что позволяет добиться мультимодального воздействия, стимулирующего процессы восстановления в головном мозге после перенесенного церебрального инсульта [15, 16].

Клиническое наблюдение

Пациентка Д. 59 лет находилась на стационарном лечении в неврологическом отделении МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского со следующим диагнозом: «Последствия перенесенного ишемического инсульта в вертебрально-базиллярном бассейне на фоне гипертонической болезни, атеросклероза, ишемической болезни сердца, сахарного диабета 2-го типа. Атеротромботический подтип по TOAST. Левосторонний спастический гемипарез с умеренным нарушением функции движения. Дизартрия. Оценка состояния по шкале Рэнкина – 3 балла».

При поступлении пациентка предъявляла жалобы на слабость и онемение в левых конечностях, снижение памяти, повышение артериального давления, головокружение, неустойчивость, шаткость при ходьбе, смазанную, нечеткую речь.

Анамнез заболевания. При внезапном развитии слабости в левых конечностях, нарушении речи, системном головокружении, шаткости,



на фоне повышения артериального давления до 170/100 мм рт. ст. пациентка бригадой скорой медицинской помощи была госпитализирована в отделение для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения лечебно-профилактического учреждения по месту жительства, где проходила лечение с диагнозом «ишемический инсульт в вертебрально-базилярном бассейне. Центральный гемипарез слева с выраженным нарушением функции движения». По данным компьютерной томографии головного мозга отмечены признаки острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу в области правых отделов моста на фоне единичных мелкоочаговых изменений вещества головного мозга сосудистого генеза, а также умеренные явления перивентрикулярного лейкоареоза. По данным дуплексного сканирования магистральных артерий головы: облитерирующий атеросклероз брахиоцефальных артерий. Изгиб позвоночных артерий в первом сегменте с обеих сторон. Стеноз общей сонной артерии в области бифуркации справа 20%. Стеноз внутренней сонной артерии справа 20%. По окончании острого периода пациентка была переведена в неврологическое отделение МОНКИ им. М.Ф. Владимирского для проведения реабилитационного лечения.

Анамнез жизни: росла и развивалась в соответствии с возрастом. Перенесенные заболевания и операции: ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь 3-й стадии, 3-й степени, сахарный диабет 2-го типа, экзогенное ожирение 2-й степени. Образование высшее, работала инженером. В настоящее время не работает, на пенсии, инвалид 3-й группы. Замужем, имеет двух детей – дочь 38 лет и сына 34 лет. Вредные привычки отрицает.

Состояние пациентки при поступлении было удовлетворительным: артериальное давление 130/80 мм рт. ст., частота сердечных сокращений 70 ударов в минуту. Сознание ясное (15 баллов по шкале комы Глазго), пациентка активна. Органы и системы – без существенных отклонений. *Неврологический статус:* общемозговых и менингеальных симптомов нет. Черепно-мозговые нервы: глазные щели $d = s$, движения глазных яблок в полном объеме. Нистагма нет. Фотореакции $d = s$, живые. Реакция на конвергенцию и аккомодацию сохранена. Лицо симметричное. Язык по средней линии, движение языка не ограничено. Речь дизартрична. Объем пассивных движений полный. Сила мышц в верхних конечностях D – 5 баллов, S – 3 балла; в нижних конечностях D – 5 баллов, S – 3,5 балла. Тонус в левых конечностях повышен по спастическому типу. Оценка уровня спастичности по шкале мышечной спастичности Эшворта – 3 балла. Двигательная

функция руки по шкале Фугл-Мейера – 46 баллов. Верхняя и нижняя проба Барре – положительная слева. Периаральные и сухожильные рефлексы $d < s$, средней живости. Патологические стопные знаки отсутствуют. Координаторные пробы (пальценосовую, пяточкоколенную) выполняет справа удовлетворительно, слева с мимопаданием. В позе Ромберга неустойчива (падает в стороны, больше влево). Походка атактическая. Самостоятельно передвигается с опорой, при ходьбе по улице использует палочку, по отделению ходит, опираясь рукой о стену. Чувствительные нарушения: левосторонняя болевая гемигипестезия. Тазовые функции контролирует.

Оценка нейропсихологического статуса: пациентка доступна вербальному контакту. В месте, времени и собственной личности ориентирована, критична, обращенную речь понимает полностью, собственная речь замедленная, смазанная, пытается подбирать слова, удобные для произнесения, делает паузу, чтобы правильно сказать. Со слов родственников, обслуживать себя в полной мере не может, старается помогать родным по дому, но получается плохо из-за наличия гемипареза, быстрой утомляемости. Оценка по IQCODE (Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly – Опросник родственника о когнитивном снижении у пожилого человека) – 81 балл, что свидетельствовало о развитии когнитивных нарушений после инсульта. Оценка по шкале MMSE (Mini-Mental State Examination – Краткая шкала оценки психического статуса) – 25 баллов, по шкале MoCA (Montreal Cognitive Assessment – Монреальская когнитивная шкала) – 23 балла (умеренное снижение когнитивных функций). Оценка по тесту Шульте – среднее время, затраченное на попытку, составило 79 секунд; тест «Повторение цифр в прямом и обратном порядке» (субтест VI теста Векслера) – в прямом порядке может повторить цепочку из 4 цифр, в обратном – из 3; тест на фонетическую и семантическую речевую активность – 9 и 13 слов соответственно; тест «Символы и цифры» – 30 символов за 90 секунд; тест «Заучивание 10 слов» по Лурия: после 1-го повторения – 2 слова, после 2-го – 3 слова, после 3-го – 4 слова, после 4-го – 5 слов, после 5–6-го – 6 слов, после 7-го – 7 слов, после 8-го – 8 слов, после 9-го – 9 слов, после 10 повторений – 10 слов, через 1 час – 4 слова; тест Струпа: 1-я картинка (чтение названий цветов, черно-белая) – 55 секунд, 2-я картинка (названия цветов у цветных фигур) – 70 секунд (2 ошибки), 3-я картинка (название цвета, которым написано слово (цветные слова)) – 130 секунд, 8 ошибок; тест «Кубики Коса» – 28 баллов.

Фон настроения снижен, раздражительна, слезлива, эмоционально лабильна, фиксирована на своем состоянии. Субклинически выражена тревога

и депрессия по шкале HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale – Госпитальная шкала тревоги и депрессии): уровень тревоги – 10 баллов, уровень депрессии – 9 баллов; по шкале Бека – легкая депрессия (15 баллов), легкая тревога (7 баллов). Оценка по шкале Рэнкина – 3 балла. Индекс повседневной активности Бартела – 90 баллов. Оценка качества жизни по опроснику SF-36: физическое функционирование – 60 баллов, ролевое функционирование – 25, боль – 74, общее здоровье – 65, жизнеспособность – 75, социальное функционирование – 50, эмоциональное функционирование – 66,7, психологическое здоровье – 52 балла.

Курс нейрореабилитационного лечения включал проведение тренинга с применением силового джойстика для верхней конечности на базе статической стабилметрической платформы с БОС по опорной реакции с использованием в процессе тренинга зрительных и слуховых каналов. Затем проводилось занятие в положении стоя на стабилметрической платформе с БОС по опорной реакции с использованием в процессе тренинга зрительных и слуховых каналов [16, 17]. Программа завершалась выполнением общеукрепляющих упражнений лечебной физкультуры, занятием с логопедом-нейропсихологом. Пациентка получала стандартную фармакотерапию с применением антиагрегантных, гипотензивных, гиплипидемических препаратов.

При выписке отмечалось улучшение самочувствия, настроения, улучшилась память, концентрация внимания, уменьшилась общая слабость, сохранялась шаткость, но уверенность при движении немного возросла – увеличилась сила в левых конечностях, пациентка стала реже использовать средства дополнительной опоры при ходьбе, старалась обходиться без них, уменьшился уровень спастичности (2 балла по шкале мышечной спастичности Эшворта), увеличился объем и улучшились функции движения в левой руке, при оценке по шкале Фугл-Мейера (оценка двигательной функции руки) наблюдалось увеличение показателя до 53 баллов.

При проведении нейропсихологического тестирования после лечения отмечена положительная динамика: оценка по шкале МоСА составила 26 баллов, по тесту Шульте среднее время, затраченное на попытку, составляло 70 секунд; тест «Повторение цифр в прямом и обратном порядке» (субтест VI теста Векслера) – в прямом порядке может повторить цепочку из 5 цифр, в обратном – из 4; тест на фонетическую и семантическую речевую активность – 12 и 18 слов соответственно; тест «Символы и цифры» – 36 символов за 90 секунд; тест «Заучивание 10 слов» по Лурия: после 1-го повторения – 3 слова, после 2-го – 4 слова, после 3-го – 5 слов, после

4-го – 6 слов, после 5-го – 8 слов, после 6–8-го – 9 слов, после 9–10 повторений – 10 слов, через 1 час – 5 слов; тест Струпа: 1-я картинка (чтение названий цветов, черно-белая) – 45 секунд, 2-я картинка (названия цветов у цветных фигур) – 70 секунд (1 ошибка), 3-я картинка (название цвета, которым написано слово (цветные слова)) – 100 секунд (2 ошибки); тест «Кубики Коса» – 32 балла. При оценке по шкале HADS у пациентки отмечалось уменьшение показателей уровня депрессии (7 баллов), уровня тревоги (5 баллов). По шкале Бека для оценки депрессии и по шкале тревоги Бека отмечено снижение показателей (10 и 4 балла соответственно). Оценка по шкале Рэнкина составила 3 балла. Индекс повседневной активности Бартела увеличился до 95 баллов.

Через 3 месяца на визите пациентки в клинику была проведена оценка динамики состояния. Со слов больной, отметила значительное улучшение общего самочувствия, повышение настроения, уменьшилось ощущение слабости, отсутствия сил, улучшилась память и концентрация внимания, появилась уверенность при ходьбе, уменьшилась шаткость, выросла сила в левых конечностях. Со слов родственников, пациентка стала более собранной, уменьшились жалобы на неспособность сосредоточиться, рассеянность, пациентка стала более оптимистична, активна, более самостоятельна, требует меньше помощи для себя. Речь стала четкой, слова произносит уверенно. При оценке неврологического статуса отмечена положительная динамика в виде регресса атактических нарушений, уменьшение левостороннего гемипареза, сила увеличилась до 4 баллов в руке и 5 баллов в ноге, при оценке уровня спастичности отмечена нормализация мышечного тонуса, по шкале мышечной спастичности Эшворта показатель уменьшился до 1 балла. Оценка по шкале Фугл-Мейера (оценка двигательной функции руки) составила 60 баллов, пациентка стала более устойчивой в позе Ромберга, более уверенно выполняет координаторные пробы, периодически отмечается миоподпадание, чаще при волнении. Походка улучшилась. Ходит без палочки на улице и по дому, но медленно, старается не торопиться, еще сохраняется страх падения.

При проведении повторного нейропсихологического тестирования также отмечена положительная динамика: оценка по шкале МоСА составила 27 баллов; по тесту Шульте среднее время, затраченное на попытку, было равно 62 секундам; тест «Повторение цифр в прямом и обратном порядке» (субтест VI теста Векслера) – в прямом порядке может повторить цепочку из 5 цифр, в обратном – из 4; тест на фонетическую и семантическую речевую активность – 12 и 19 слов соответственно; тест «Символы и цифры» – 40 символов за 90 секунд; тест «Заучивание



10 слов» по Лурия: после 1-го повторения – 3 слова, после 2-го – 4 слова, после 3-го – 5 слов, после 4-го – 6 слов, после 5-го – 8 слов, после 6–8-го – 9 слов, после 9–10 повторений – 10 слов, через 1 час – 5 слов; тест Струпа: 1-я картинка (чтение названий цветов, черно-белая) – 45 секунд, 2-я картинка (название цветов у цветных фигур) – 65 секунд (1 ошибка), 3-я картинка (название цвета, которым написано слово (цветные слова)) – 95 секунд (1 ошибка); тест «Кубики Коса» – 36 баллов. При оценке по шкале HADS показатель уровня депрессии составил 2 балла, уровня тревоги – также 2 балла, что говорит об отсутствии у пациентки тревоги и депрессии. При оценке по шкале Бека уровень депрессии составил 1 балл, показатель тревоги – 2 балла. Оценка по шкале Рэнкина – 2 балла. Индекс повседневной активности Бартела увеличился до 95 баллов. Оценка по опроснику SF-36: физическое функционирование – 75 баллов, ролевое функционирование – 50, боль – 100, общее здоровье – 67, жизнеспособность – 80, социальное функционирование – 75, эмоциональное функционирование – 67, психологическое здоровье – 72.

Реабилитационный диагноз, согласно Международной классификации функционирования, ограничений жизнедеятельности и здоровья, используемой в процессе медицинской реабилитации, представлен в таблице. Отражена динамика доменов до лечения, после лечения и через 3 месяца наблюдения.

Обсуждение

Представлен клинический случай, демонстрирующий эффективность комплексной программы нейрореабилитации после инсульта, основой которого стало использование тренингов с БОС по опорной реакции. В ходе лечебного процесса применялся как новый оптимизированный подход с силовым джойстиком для верхней конечности на базе статической стабилометрической платформы, так и классический тренинг в положении пациентки стоя на стабилометрической платформе с БОС по опорной реакции с использованием в процессе тренинга зрительных и слуховых каналов [15]. Проведение тренингов с использованием БОС по опорной реакции осуществлялось с постановкой большой определенной двигательной-когнитивной задачи, уровень сложности которой менялся в ходе выполнения процедур и повышался по мере адаптации к условиям и нагрузке. Помимо «статических» тренингов, при выполнении которых нужно было удерживать постоянную, максимально стабильную позу, перед пациенткой ставилась задача выполнения «динамических» тренингов. Для

Диагноз по Международной классификации функционирования, ограничений жизнедеятельности и здоровья

Показатель	Домен	До лечения	После лечения	Через 3 месяца наблюдения
Функции организма				
интеллектуальные функции	b117	b117.1	b117.1	b117.1
функция памяти	b144	b144.2	b144.1	b144.1
функция эмоций	b152	b152.2	b152.1	b152.1
функции мышления	b160	b160.2	b160.1	b160.1
вестибулярные функции	b235	b235.2	b235.2	b235.1
функции артикуляции	b320	b320.2	b320.1	b320.0
функция артериального давления	b420	b420.2	b420.1	b420.1
функции мышечной силы	b730	b730.3	b730.2	b730.1
функции мышечного тонуса	b735	b735.2	b735.2	b735.1
моторно-рефлекторные функции	b750	b750.2	b750.2	b750.1
контроль произвольных двигательных функций	b760	b760.2	b760.2	b760.1
функции стереотипа походки	b770	b770.2	b770.2	b770.1
Структуры организма				
структура головного мозга	s110	s110.2	s110.2	s110.2
Активность и участие				
речь	d330	d330.2	d330.2	d330.1
разговор	d350	d350.2	d350.2	d350.1
изменение позы тела	d410	d410.2	d410.1	d410.1
поддержание положения тела	d415	d415.2	d415.1	d415.1
перемещение тела	d420	d420.2	d420.2	d420.1
поднятие и перенос объектов	d430	d430.3	d430.2	d430.1
использование точных движений кисти	d440	d440.3	d440.2	d440.1
использование кисти и руки	d445	d445.3	d445.2	d445.1
ходьба	d450	d450.2	d450.2	d450.1
передвижение с использованием технических средств	d465	d465.2	d465.1	d465.0
одевание	d540	d540.1	d540.1	d540.0
выполнение работы по дому	d640	d640.3	d640.2	d640.2

этого требовалась значительная концентрация внимания, консолидация слуховой и зрительной памяти, в том числе хорошая зрительная реакция, диктующая необходимость адекватной перемены позы для сохранения устойчивости и равновесия при быстро изменяющихся условиях 2D-среды.

При проведении занятия мы активно задействовали аудио- и зрительные сенсорные входы, пациентке давались звуковые сигналы поощрения при отличном выполнении задания и, соответственно, сигналы поражения. Кроме того, использовали панель сложных комбинированных тренировок управления центром давления в простой виртуальной среде, таких как «Мелодия», где звуковое сопровождение было важной составляющей тренинга. Пациентка должна была зрительно запомнить условия виртуальной среды, консолидировать слуховую память для процесса запоминания и воспроизведения аудиальной информации, при этом постоянно контролируя движение паретичной верхней конечностью или сохраняя устойчивость вертикальной позы [16].

В ряде ранее проведенных работ К. Yasuda и соавт. с использованием силовой платформы у пожилых людей была показана эффективность метода для улучшения баланса и предотвращения риска падений на основе двойной задачи, в частности увеличения соматосенсорной информации за счет тактильных ощущений и использования когнитивной нагрузки [17]. Значимость включения в процесс тренировки именно слухового канала сенсорной БОС подчеркнута в исследовании N. Hasegawa и соавт. По мнению авторов, она в большей степени по сравнению со зрительной способствует улучшению моторного обучения динамическому контролю позы, в первую очередь за счет усиления интеграции проприоцептивных стимулов [18, 19]. Эффективность использования технологий мультимодального сенсорного усиления для повышения устойчивости во время выполнения статических задач и для улучшения баланса во время динамических задач отмечена в одном из недавних обзоров К.Н. Sienko и соавт. [20]. Положительные результаты при коррекции постинсультных вестибуло-атактических нарушений в случае использования БОС по опорной реакции были отмечены и нами и представлены в ранее опубликованных работах [16]. В настоящем наблюдении нами показано комплексное применение БОС как при тренировке в положении больного стоя на стабилометрической

платформе с опорой на нижние конечности, так и при использовании опорной функции руки.

Механизм, с помощью которого информация о сенсорном увеличении обрабатывается и используется структурами центральной нервной системы (ЦНС), в настоящее время активно обсуждается. Доминирующая гипотеза говорит о наличии сенсорной перенастройки, в частности о том, что обратная связь движения тела обеспечивает ЦНС коррелятом с сигналами, поступающими от ее неповрежденных сенсорных входов (например, зрение, слух, проприоцепция). В связи с этим пациенты, получающие сенсорное увеличение (аугментацию) за счет других сохраненных информационных каналов, учатся все больше опираться на эти неповрежденные системы. Другие возможные структуры наблюдаемого положительного эффекта включают: механизмы когнитивной обработки (обработка информации сенсорного увеличения является исключительно когнитивной, без выборочной регуляции сенсорных входов ЦНС); механизм так называемого шестого чувства (ЦНС интерпретирует информацию сенсорного увеличения как новый отдельный сенсорный канал); контекстно-зависимую адаптацию (новая сенсомоторная программа используется в ходе многократного взаимодействия с определенным адаптированным устройством и доступна только при применении этого устройства).

В представленном нами клиническом случае у пациентки после инсульта было отмечено улучшение ряда функций, включая движение верхней конечности, нейропсихологический статус в результате проведенного лечения, что позволяет констатировать: тренировки, основанные на движении с БОС по опорной реакции с использованием зрительного и слухового каналов, ведут не только к реорганизации сенсомоторного анализатора, но и к восстановлению интегративной деятельности мозга. Несомненно, важным представляется тот факт, что достигнутый в ходе лечения положительный эффект отличался стойкостью, при проведении обследования в динамике через 3 месяца нами не было отмечено нарастания неврологического дефицита, что свидетельствовало о продолженном действии запущенного на основе БОС по опорной реакции механизма нейропластичности, способствующего активации восстановительных процессов ЦНС.

Заключение

Комплексная реабилитационная программа, включавшая тренировки на основе БОС по



опорной реакции с использованием слухового и зрительного каналов, где последовательно применялись классические статические и динамические стабилметрические тренировки в положении больного стоя на платформе, а также занятия с использованием силового джойстика

для верхней конечности в положении больного сидя, дала хорошие результаты. Комбинация повышенной физической активности с сенсорной стимуляцией, задачами для когнитивных функций может способствовать хорошему восстановлению после инсульта. ☺

Дополнительная информация

Согласие пациента

Пациентка добровольно подписала информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме в журнале «Альманах клинической медицины».

Финансирование

Работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

Участие авторов

Оба автора внесли равный вклад в написание статьи. Оба автора прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Литература / References

1. Frias I, Starrs F, Gisiger T, Minuk J, Thiel A, Paquette C. Interhemispheric connectivity of primary sensory cortex is associated with motor impairment after stroke. *Sci Rep*. 2018;8(1): 12601. doi: 10.1038/s41598-018-29751-6.
2. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017;120(3):439–448. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308413.
3. 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. *Lancet*. 2018;392(10159):1789–1858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7. Erratum in: *Lancet*. 2019;393(10190):e44.
4. Villa RF, Ferrari F, Moretti A. Post-stroke depression: Mechanisms and pharmacological treatment. *Pharmacol Ther*. 2018;184:131–144. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.005.
5. Edwards LL, King EM, Bueteftisch CM, Borich MR. Putting the "Sensory" Into Sensorimotor Control: The Role of Sensorimotor Integration in Goal-Directed Hand Movements After Stroke. *Front Integr Neurosci*. 2019;13:16. doi: 10.3389/fnint.2019.00016.
6. De Bruyn N, Saenen L, Thijs L, Van Gils A, Ceulemans E, Essers B, Lafosse C, Michielsens M, Beyens H, Schillebeeckx F, Alaerts K, Verheyden G. Sensorimotor vs. Motor Upper Limb Therapy for Patients With Motor and Somatosensory Deficits: A Randomized Controlled Trial in the Early Rehabilitation Phase After Stroke. *Front Neurol*. 2020;11:597666. doi: 10.3389/fneur.2020.597666.
7. Клочков АС, Хижникова АЕ, Назарова МА, Черникова ЛА. Патологические синергии в руке у пациентов с постинсультными гемипарезами. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2017;67(3): 273–287. doi: 10.7868/S0044467717030066. [Klochkov AS, Khizhnikova AE, Nazarova MA, Chernikova LA. [Pathological upper limb synergies of poststroke patients]. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2017;67(3):273–287. Russian. doi: 10.7868/S0044467717030066.]
8. Котов СВ, Исакова ЕВ, Слюнькова ЕВ. Применение технологии нейроинтерфейс «мозг – компьютер» + экзоскелет в составе комплексной мультимодальной стимуляции при реабилитации пациентов с инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(12-2): 37–42. doi: 10.17116/jnevro201911912237. [Kotov SV, Isakova EV, Slyun'kova EV. [Usage of brain – computer interface + exoskeleton technology as a part of complex multimodal stimulation in the rehabilitation of patients with stroke]. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2019;119(12-2):37–42. Russian. doi: 10.17116/jnevro201911912237.]
9. Frey J, Najib U, Lilly C, Adcock A. Novel TMS for Stroke and Depression (NoTSAD): Accelerated Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation as a Safe and Effective Treatment for Post-stroke Depression. *Front Neurol*. 2020;11:788. doi: 10.3389/fneur.2020.00788.
10. De Luca R, Manuli A, De Domenico C, Lo Voi E, Buda A, Maresca G, Bramanti A, Calabrò RS. Improving neuropsychiatric symptoms following stroke using virtual reality: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(19):e15236. doi: 10.1097/MD.00000000000015236.
11. Genthe K, Schenck C, Eicholtz S, Zajac-Cox L, Wolf S, Kesar TM. Effects of real-time gait biofeedback on paretic propulsion and gait biomechanics in individuals post-stroke. *Top Stroke Rehabil*. 2018;25(3):186–193. doi: 10.1080/10749357.2018.1436384.
12. Stanton R, Ada L, Dean CM, Preston E. Biofeedback improves performance in lower limb activities more than usual therapy in people following stroke: a systematic review. *J Physiother*. 2017;63(1):11–16. doi: 10.1016/j.jphys.2016.11.006.
13. Гимазов РМ. Обоснование методики коррекции свойств двигательных способностей человека с использованием биологической обратной связи по опорной реакции. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2019;96(3): 41–49. doi: 10.17116/kurort20199603141. [Gimazov RM. [Substantiation of a procedure for correction of the properties of human motor abilities via biofeedback for support reaction]. *Problems of Balneology, Physiotherapy and Exercise Therapy*. 2019;96(3):41–49. Russian. doi: 10.17116/kurort20199603141.]
14. Gordt K, Gerhardy T, Najafi B, Schwenk M. Effects of Wearable Sensor-Based Balance and Gait Training on Balance, Gait, and Functional Performance in Healthy and Patient Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Gerontology*. 2018;64(1):74–89. doi: 10.1159/000481454.
15. Кубряк ОВ, Гроховский СС, Исакова ЕВ, Котов СВ. Биологическая обратная связь по опорной реакции: методология и терапевтические аспекты. М.: ИПЦ «Маска»; 2015.



128 с. [Kubryak OV, Grokhovskiy SS, Isakova EV, Kotov SV. [Biofeedback for support reaction methodology and therapeutic aspects]. Moscow: Maska; 2015. 128 p. Russian.]

16. Кубряк ОВ, Исакова ЕВ, Котов СВ, Романова МВ, Гроховский СС. Повышение вертикальной устойчивости пациентов в остром периоде ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014;114(12-2):61–65. doi: 10.17116/jnevro201411412261-65. [Kubriak OV, Isakova EV, Kotov SV, Romanova MV, Grokhovskii SS. [Increase in patient vertical stability in acute period

of ischemic stroke]. S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. 2014;114(12-2):61–65. Russian. doi: 10.17116/jnevro201411412261-65.]

17. Yasuda K, Saichi K, Iwata H. Haptic-Based Perception-Empathy Biofeedback Enhances Postural Motor Learning During High-Cognitive Load Task in Healthy Older Adults. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:149. doi: 10.3389/fmed.2018.00149.

18. Hasegawa N, Takeda K, Sakuma M, Mani H, Maejima H, Asaka T. Learning effects of dynamic postural control by auditory biofeedback versus visual biofeedback training. *Gait*

Posture. 2017;58:188–193. doi: 10.1016/j.gaitpost.2017.08.001.

19. Hasegawa N, Takeda K, Mancini M, King LA, Horak FB, Asaka T. Differential effects of visual versus auditory biofeedback training for voluntary postural sway. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244583. doi: 10.1371/journal.pone.0244583.

20. Sienko KH, Seidler RD, Carender WJ, Goodworth AD, Whitney SL, Peterka RJ. Potential Mechanisms of Sensory Augmentation Systems on Human Balance Control. *Front Neurol*. 2018;9:944. doi: 10.3389/fneur.2018.00944.

Visual and acoustic feedback on the support reaction for upper and lower extremities: a case study of a female patient after a stroke

E.V. Isakova¹ • Yu.V. Egorova¹

Stroke is the leading cause of adult disability worldwide. The consequences of a stroke can include various disorders, namely, motor, cognitive, emotional, and behavioral disorders, which, in their turn, lead to a decreased daily life activities and self-care ability, and affect quality of life of the patients. This article describes a clinical case of the implementation of a new comprehensive program for neurorehabilitation treatment in a female patient in the early recovery period from ischemic stroke with spastic hemiparesis, moderate cognitive impairment and affective disorders. The neurorehabilitation program is based on the use support reaction biofeedback through auditory and visual channels. Classical static and dynamic stabilometric trainings were sequentially used in the patient standing on the platform, as well as exercises with a force joystick for the upper limb in the sitting position. The multifaceted program also included classes with a speech therapist/neuropsychologist, as well as physical therapy with an instructor. The treatment resulted in an improvement in the patient's general condition, restoration of the upper limb movement function,

normalization of cognitive functions, and regression of affective disorders. The treatment-related effects were persistent, and the assessment of the neurological status at 3 months' follow-up showed no deterioration of neurological symptoms. Thus, the multifaceted rehabilitation treatment based on the combination of increased physical activity and sensory stimulation, as well as cognitive tasks, may facilitate good recovery after a stroke.

Key words: stroke, neurorehabilitation, post-stroke disorders, support reaction biofeedback, stabilometry, power joystick for the upper limb

For citation: Isakova EV, Egorova YuV. Visual and acoustic feedback on the support reaction for upper and lower extremities: a case study of a female patient after a stroke. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):435–442. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-016.

Received 10 March 2021; revised 31 March 2021; accepted 5 April 2021; published online 6 April 2021

Elena V. Isakova – MD, PhD, Research Fellow, Department of Neurology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0804-1128>

✉ 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 904 85 52; +7 (495) 631 74 32. E-mail: isakovael@mail.ru

Yulia V. Egorova – Postgraduate Student, Chair of Neurology, Postgraduate Training Faculty¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3504-046X>. E-mail: pjv90@mail.ru

Informed consent statement

The patient has voluntarily signed her informed consent to the publication of personal medical information in an anonymized form in the *Almanac of Clinical Medicine* journal.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

Both authors have equally contributed to the manuscript. Both authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

