



Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет)

СЕЧЕНОВСКИЙ *SECHENOV MEDICAL JOURNAL* ВЕСТНИК

Том/Volume 15
№ 2, 2024

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

ТУТОРИАЛ ПО СТАТИСТИКЕ:

Базовые аспекты мета-анализа. Часть 2

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ:

Кора головного мозга
в условиях генной терапии
после экспериментального
инсульта

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ:

Жирно-кислотный состав
крови при стеатогепатите
с нормальной АЛТ и стеатозе

СЕЧЕНОВСКИЙ ВЕСТНИК

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ
Sechenovskii vestnik



СЕЧЕНОВСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
НАУК О ЖИЗНИ

Цели и задачи

К основным целям журнала относятся представление актуальных научных достижений российских и зарубежных ученых в области медико-биологических наук, фундаментальной и клинической медицины, увеличение значимости и авторитета российской медицинской науки за счет повышения качества научных публикаций.

Научно-практический медицинский журнал «Сеченовский вестник» публикует статьи по актуальным вопросам медико-биологических наук, клинической медицины. Издание предназначено для профессионалов в области здравоохранения.

Главный редактор

П.В. Глыбочко – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, ректор Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-5541-2251>, Scopus Author ID: 26435273000

Заместитель главного редактора

Т.А. Демура – д-р. мед. наук, проф., начальник управления по научному развитию и клиническим исследованиям Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-6946-6146>, Scopus Author ID: 25936132400

Научные редакторы

М.Ю. Надинская – канд. мед. наук, доц., руководитель Издательского центра Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-1210-2528>, Scopus Author ID: 6507949442

Н.В. Эберле – научный редактор Издательского центра Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0009-0006-6165-8983>

Ответственный секретарь

С.С. Кардашева – канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-5116-2144>, Scopus Author ID: 57212196771

Редакционный совет

• **Е. Айкава** – канд. мед. наук, доц. медицинской школы Гарвардского университета (Бостон, США); <https://orcid.org/0000-0001-7835-2135>, Scopus Author ID: 55303859000 • **Г.Б. Белаякович** – д-р мед. наук, проф. Нишского университета (Ниш, Сербия); <https://orcid.org/0000-0002-3796-9945>, Scopus Author ID: 34567603700 • **Э. Грандоне** – д-р мед. наук, проф. госпиталя Casa Sollievo della Sofferenza (Сан-Джованни-Ротондо, Италия); <https://orcid.org/0000-0002-9890-9783>, Scopus Author ID: 7006391091 • **М.Ю. Капитанова** – д-р мед. наук, проф. кафедры фундаментальных медицинских наук факультета Медицины и Здравоохранения Университета Малайзии Sarawak (Unimas) (Кота Самарахан, Малайзия); <https://orcid.org/0000-0001-6055-3123>, Scopus Author ID: 8854275100 • **О.Д. Мяделец** – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета (Витебск, Беларусь); <https://orcid.org/0000-0001-8796-052X>, Scopus Author ID: 55790984400 • **С. Петанидис** – канд. мед. наук, науч. сотрудник Университета имени Аристотеля в Салониках (Салоники, Греция); <https://orcid.org/0000-0001-7482-6559>, Scopus Author ID: 55362289600 • **Д. Риццо** – MD, профессор, Университет Рома Тор Вергата, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, Центральная поликлиника Тор Вергата (Рим, Италия); <https://orcid.org/0000-0002-5525-4353>, Scopus Author ID: 7102724281 • **Х.Э. Санер** – д-р мед. наук, проф. Бернского университета (Берн, Швейцария); <https://orcid.org/0000-0002-8025-7433>, Scopus Author ID: 55835032800 • **А.А. Свиустов** – д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, первый проректор Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); Scopus Author ID: 55578030700 • **А. Спаллоне** – д-р мед. наук, проф., директор отделения клинических нейронаук нейробиологии Латинского университета (Рим, Италия); <https://orcid.org/0000-0002-7017-1513>, Scopus Author ID: 7005531516 • **В. Яковлевич** – д-р мед. наук, проф., декан факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац (Крагуевац, Сербия); <https://orcid.org/0000-0002-0071-8376>, Scopus Author ID: 56425747600

История издания журнала: издается с 2010 г.

Периодичность: выходит 4 раза в год.

Префикс DOI: 10.47093

Свидетельство о регистрации средства массовой информации: ПИ № ФС77-78884 от 28 августа 2020 года выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Условия распространения материалов: контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.

Учредитель, издатель, редакция: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

Телефон редакции: +7 (905) 517-27-99

Сайт: <https://www.sechenovmedj.com/jour>

E-mail: sechenovmedj@staff.sechenov.ru

Редакционная коллегия

• **В.Б. Аникин** – канд. мед. наук, проф. The Royal Brompton & Harefield NHS Foundation Trust (Лондон, Великобритания); Scopus Author ID: 7005592092 • **О.Б. Блюсс** – канд. физ.-мат. наук, науч. сотрудник Лондонского университета королевы Марии (Лондон, Великобритания); <https://orcid.org/0000-0002-0194-6389>, Scopus Author ID: 56020531500 • **С.Б. Болевич** – д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологии человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-1574-477X>, Scopus Author ID: 6603144931 • **М.Ю. Бровко** – д-р. мед. наук, проф., проректор по международной деятельности Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0003-0023-2701>, Scopus Author ID: 56525278100 • **Д.В. Бугнару** – д-р. мед. наук, гл. врач Университетской клинической больницы №1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0003-2173-0566>, Scopus Author ID: 15758889100 • **А.А. Заикин** – канд. физ.-мат. наук, проф. системной медицины Университетского колледжа Лондона (Лондон, Великобритания); <https://orcid.org/0000-0001-7540-1130>, Scopus Author ID: 7103103296 • **А.В. Зорькина** – д-р мед. наук, проф., зав. каф. амбулаторно-поликлинической терапии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (Саранск, Россия); <https://orcid.org/0000-0003-1122-9532>, Scopus Author ID: 6508247780 • **В.Т. Ивашкин** – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. каф. пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-6815-6015>, Scopus Author ID: 57201595785 • **А.М. Казарян** – д-р мед. наук, проф. Университета Осло (Осло, Норвегия); <https://orcid.org/0000-0001-9960-0820>, Scopus Author ID: 7003922201 • **С.Л. Кузнецов** – д-р мед. наук, член-корр. РАН, проф. кафедры анатомии и гистологии человека Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-0704-1660>, Scopus Author ID: 27267733100 • **А.Д. Макацария** – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. каф. акушерства и гинекологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0001-7415-4633>, Scopus Author ID: 6602363216 • **Д. Макфарланд** – доц., Автономный Мадридский университет (Мадрид, Испания); <https://orcid.org/0000-0003-3994-4570>, Scopus Author ID: 57203783686 • **Л. Матронарди** – руководитель отделения нейрохирургии, больница Сан-Филиппо Нери (Рим, Италия); <https://orcid.org/0000-0003-0105-5786>, Scopus Author ID: 56228961100 • **Д.Б. Мунблит** – канд. мед. наук, проф. Imperial College London (Лондон, Великобритания); <https://orcid.org/0000-0001-9652-6856>, Scopus Author ID: 55233686800 • **Д.А. Напалков** – д-р мед. наук, проф. каф. факультетской терапии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0001-6241-2711>, Scopus Author ID: 7801384884 • **Ч.С. Павлов** – д-р мед. наук, проф., зав. каф. терапии, руководитель Центра доказательной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0001-5031-9798>, Scopus Author ID: 57196355076 • **С.В. Пирожков** – д-р мед. наук, проф. каф. патофизиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-7116-3398>, Scopus Author ID: 7004383734 • **И.В. Решетов** – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. каф. онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-0909-6278>, Scopus Author ID: 6701353127 • **М.И. Секачева** – д-р мед. наук, проф., директор Института персонализированной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0003-0015-7094>, Scopus Author ID: 24342526600 • **А.Н. Стрижаков** – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. каф. акушерства, гинекологии и перинатологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0001-7718-7465>, Scopus Author ID: 7005104683 • **А.А. Суфианов** – д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, главный врач Федерального центра нейрохирургии (Тюмень, Россия); <https://orcid.org/0000-0001-7580-0385>, Scopus Author ID: 6603558501 • **Г.Т. Сухих** – д-р мед. наук, проф., акад. РАН, директор НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова (Москва, Россия); <https://orcid.org/0000-0003-0214-1213>, Scopus Author ID: 7005776727 • **А.С. Шершвер** – д-р мед. наук, проф. Свердловского областного онкологического диспансера (Екатеринбург, Россия); <https://orcid.org/0000-0002-8515-6017>, Scopus Author ID: 7006207122

Выход в свет: 15.07.2024

Копирайт: © Сеченовский вестник, 2024

Индексирование: журнал входит в перечень изданий, рекомендованных ВАК, и библиографическую базу данных РИНЦ.

Журнал представлен в Федеральной электронной медицинской библиотеке:

<http://www.femb.ru>

Подписной индекс: в каталоге агентства «Пресса России» – 29124

Цена: свободная

Заведующая редакцией: А.В. Седова

Редакторы-корректоры: И.С. Пигулевская, Л.А. Зелескзон

Верстка: О.А. Юнина

Отпечатано: ООО «БЕАН»

Адрес: 603003, г. Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1

Формат 60х90 1/8.

Печать офсетная. Тираж 1000 экз.

SECHENOV MEDICAL
JOURNAL

SCIENTIFIC AND PRACTICAL MEDICAL JOURNAL

SECHENOV
UNIVERSITY
LIFE SCIENCES

Focus and Scope

The Sechenov Medical Journal is committed to presenting important scientific achievements in the field of biomedical sciences, fundamental and clinical medicine, increasing the authority of the Russian medical science by improving the quality of scientific publications.

The academic and clinical Sechenov Medical Journal publishes articles related to the issues of medical and biological sciences, clinical medicine. The information contained in Sechenov Medical Journal is intended for healthcare professionals only.

Editor-in-Chief

Peter V. Glybochko – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Rector of Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-5541-2251>, Scopus Author ID: 26435273000

Deputy Editor-in-Chief

Tatiana A. Demura – MD, PhD, DMSc, Professor, Head of Department for Scientific Development and Clinical Research, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-6946-6146>, Scopus Author ID: 25936132400

Scientific Editors

Maria Yu. Nadinskaia – MD, PhD, Associate Professor, Head of Publishing Center, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-1210-2528>, Scopus Author ID: 6507949442

Nataliya V. Eberle – MD, Scientific Editor of Publishing Center, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0009-0006-6165-8983>

Executive Secretary

Svetlana S. Kardasheva – MD, PhD, Associate Professor, Department of Internal Medicine Propaedeutics, Gastroenterology and Hepatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-5116-2144>, Scopus Author ID: 57212196771

Editorial Council

• **Elena Aikawa** – MD, PhD, Associate Professor of Medicine Harvard Medical School (Boston, USA); <https://orcid.org/0000-0001-7835-2135>, Scopus Author ID: 55303859000 • **Goran B. Bjelaković** – MD, DMSc, Professor, University of Nis (Nis, Serbia); <https://orcid.org/0000-0002-3796-9945>, Scopus Author ID: 34567603700 • **Elvira Grandone** – MD, PhD, Professor, Hospital Casa Sollievo della Sofferenza (San Giovanni Rotondo, Italy); <https://orcid.org/0000-0002-8980-9783>, Scopus Author ID: 7006391091 • **Marina Yu. Kapitonova** – MD, PhD, DMSc, Professor, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University Malaysia Sarawak (Kota Samarahan, Malaysia); <https://orcid.org/0000-0001-6055-3123>, Scopus Author ID: 8854275100 • **Oleg D. Myadelets** – MD, PhD, DMSc, Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Vitebsk State Order of Friendship of Peoples Medical University (Vitebsk, Belarus); <https://orcid.org/0000-0001-8796-052X>, Scopus Author ID: 55790984400 • **Savvas Petanidis** – PhD, Research Assistant, Aristotle University of Thessaloniki (Thessaloniki, Greece); <https://orcid.org/0000-0001-7482-6559>, Scopus Author ID: 55362289600 • **Giuseppe Rizzo** – MD, Professor and Chairman, University of Rome Tor Vergata, Department of Obstetrics and Gynecology, Fondazione Policlinico Tor Vergata (Rome, Italy); <https://orcid.org/0000-0002-5525-4353>, Scopus Author ID: 7102724281 • **Hugo E. Saner** – MD, DMSc, Professor, University of Bern (Bern, Switzerland); <https://orcid.org/0000-0002-8025-7433>, Scopus Author ID: 55835032800 • **Andrey A. Svistunov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Corresponding Member of RAS, First Vice-rector, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-7835-2135>, Scopus Author ID: 5578030700 • **Aldo Spallone** – MD, PhD, Professor of Neurosurgery, Department Director, Neurological Centre of Latium NCL (Rome, Italy); <https://orcid.org/0000-0002-7017-1513>, Scopus Author ID: 7005531516 • **Vladimir Jakovljevic** – MD, PhD, DMSc, Professor, Dean of the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac (Serbia); <https://orcid.org/0000-0002-0071-8376>, Scopus Author ID: 56425747600

Editorial Board

• **Vladimir B. Anikin** – MD, PhD, Professor of Thoracic Surgery and Consultant Thoracic Surgeon, The Royal Brompton & Harefield NHS Foundation Trust, Harefield Hospital (London, UK); Scopus Author ID: 7005592092 • **Oleg B. Blyuss** – PhD, Research Associate, Queen Mary University of London (London, UK); <https://orcid.org/0000-0002-0194-6389>, Scopus Author ID: 56020531500 • **Sergey B. Bolevich** – MD, PhD, DMSc, Professor, Head of Pathology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-1574-477X>, Scopus Author ID: 6603144931 • **Michail Yu. Brovko** – MD, PhD, DMSc, Professor, Vice-Rector for International Affairs, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0003-0023-2701>, Scopus Author ID: 56525278100 • **Denis V. Butnaru** – MD, PhD, DMSc, Head of University Clinical Hospital No. 1, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0003-2173-0566>, Scopus Author ID: 15758889100 • **Alexey A. Zaikin** – PhD, Professor of Systems Medicine and Applied Mathematics, University College London (London, UK); <https://orcid.org/0000-0001-7540-1130>, Scopus Author ID: 7103103296 • **Angelina V. Zorkina** – MD, PhD, DMSc, Professor, Head of Department of Outpatient Polyclinic Therapy, National Research Mordovia State University (Saransk, Russia); <https://orcid.org/0000-0003-1122-9532>, Scopus Author ID: 6508247780 • **Vladimir T. Ivashkin** – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Head of Department of Internal Medicine Propaedeutics, Gastroenterology and Hepatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-6815-6015>, Scopus Author ID: 57201595785 • **Airazat M. Kazaryan** – MD, PhD, Professor of Surgery, Oslo University Hospital (Oslo, Norway); <https://orcid.org/0000-0001-9960-0820>, Scopus Author ID: 7003922201 • **Sergey L. Kuznetsov** – MD, PhD, DMSc, Corresponding member of the RAS, Professor, Human Anatomy and Histology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-0704-1660>, Scopus Author ID: 27267733100 • **Alexander D. Makatsariya** – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Head of Obstetrics and Gynaecology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-7415-4633>, Scopus Author ID: 6602363216 • **J. McFarland** – Associate Professor, Autonomous University of Madrid (Madrid, Spain); <https://orcid.org/0000-0003-3994-4570>, Scopus Author ID: 57203783686 • **L. Mastronardi** – Head of the Division of Neurosurgery, San Filippo Neri Hospital (Roma, Italy); <https://orcid.org/0000-0003-0105-5786>, Scopus Author ID: 56228961100 • **Daniel B. Munblit** – MD, MSc, PhD, Honorary Senior Lecturer, Imperial College London (London, UK); <https://orcid.org/0000-0001-9652-6856>, Scopus Author ID: 55233686800 • **Dmitrii A. Napalkov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Faculty Therapy Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-6241-2711>, Scopus Author ID: 7801384884 • **Chavdar S. Pavlov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Head of Therapy Department, Head of Center for Evidence-Based Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-5031-9798>, Scopus Author ID: 57196355076 • **Sergey V. Pirozhkov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Pathophysiology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-7116-3398>, Scopus Author ID: 7004383734 • **Igor V. Reshetov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Head of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-0909-6278>, Scopus Author ID: 6701353127 • **Marina I. Sekacheva** – MD, PhD, DMSc, Professor, Director of the Institute of Personalized Medicine of Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0003-0015-7094>, Scopus Author ID: 24342526600 • **Alexander N. Strizhakov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Head of Obstetrics, Gynaecology and Perinatology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-7718-7465>, Scopus Author ID: 7005104683 • **Albert A. Sufianov** – MD, PhD, DMSc, Professor, Corresponding member of RAS, Head of Federal Center of Neurosurgery (Tyumen, Russia); <https://orcid.org/0000-0001-7580-0385>, Scopus Author ID: 6603558501 • **Gennadiy T. Sukhikh** – MD, PhD, DMSc, Professor, Academician of RAS, Director of Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Moscow, Russia); <https://orcid.org/0000-0003-0214-1213>, Scopus Author ID: 7005776727 • **Alexander S. Shershever** – MD, PhD, DMSc, Professor, Sverdlovsk Regional Oncology Dispensary (Yekaterinburg, Russia); <https://orcid.org/0000-0002-8515-6017>, Scopus Author ID: 7006207122

Founded: the journal has been published since 2010.

Frequency: quarterly

DOI Prefix: 10.47093

Mass Media Registration Certificate: PI No FS77-78884 as of 28 August 2020 issued by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor).

Distribution: content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Founder, Publisher, Editorial Office: Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

Address: 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991

Editorial office phone number: +7 (905) 517-27-99

Website: <https://www.sechenovmedj.com/jour>

E-mail: sechenovmedj@staff.sechenov.ru

Published: 15.07.2024

Copyright: © Sechenov Medical Journal, 2024

Indexation: the Journal is included in the index of periodical publications recommended by the State Commission for Academic Degrees and Titles, and in the Russian Science Citation Index database

The Journal is available in the Federal Electronic Medical Library: <http://www.femb.ru>

Subscription index in the Russian Press Agency catalog – 29124.

Price: flexible

Managing Editor: Alla V. Sedova

Editors-proofreaders: Irina S. Pigulevskaya, Lev A. Zelexon

Page layout: Olga A. Yunina

Printed by LLC BEAN

Address: 1, Barrikad str., Nizhny Novgorod, 603003

Format 60x90 1/8. Off set print. Print run 1000 copies.

СОДЕРЖАНИЕ

РУКОВОДСТВО ПО БИМЕДИЦИНСКОЙ СТАТИСТИКЕ

БАЗОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕТА-АНАЛИЗА. ЧАСТЬ 2
*Е.А. Тао, М.Ю. Надинская, А.Ю. Суворов,
Н.М. Буланов, В.И. Шоломова, П.П. Потанов,
М.С. Тараткин, М.Ю. Бровко*

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МИНИ-СВИНЬИ
В УСЛОВИЯХ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПОСЛЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА
*З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, В.А. Маркосян,
А.Е. Хомяков, Н.В. Бойчук, М.В. Нигметзянова,
А.Р. Сираева, С.С. Таргачев, В.В. Валиуллин,
Р.Р. Исламов, В.И. Поспелов*

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

МОДЕЛЬ СМЕРТИ МОЗГА
С ПОСТЕПЕННОЙ ИНДУКЦИЕЙ КАК ОСНОВА
ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ДОНОРСКИХ ОРГАНОВ
*П.А. Ермолаев, Т.П. Храмых, А.С. Вяльцин,
Л.О. Барская*

ОНКОЛОГИЯ

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ
АКТИВНОСТЬ АНТИ-CA125
CAR-T-ЛИМФОЦИТОВ В ОТНОШЕНИИ
CA125-ПОЗИТИВНЫХ И CA125-НЕГАТИВНЫХ
КЛЕТОК
*Т.М. Кулинич, Я.Ю. Киселева, А.М. Шишкин,
Е.А. Кудинова, О.Б. Князева, Р. Ранджит,
В.К. Боженко, В.А. Солодкий*

ВНУТРЕННИЕ БОЛЕЗНИ

ЖИРНО-КИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТКИ
КРОВИ И МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У МУЖЧИН
СО СТЕАТОЗОМ И СТЕАТОГЕПАТИТОМ
С НОРМАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ
ТРАНСАМИНАЗ
*М.В. Кручинина, М.Ф. Осипенко, А.А. Шестов,
М.В. Паруликова*

CONTENT

BIOMEDICAL STATISTICS TUTORIAL

- 4 BASIC ASPECTS OF META-ANALYSIS. PART 2
Ekaterina A. Tao, Maria Yu. Nadinskaia, Alexander Yu. Suvorov, Nikolay M. Bulanov, Victoria I. Sholomova, Pavel P. Potapov, Mark S. Taratkin, Mikhail Yu. Brovko

CELL BIOLOGY, CITOTOLOGY, HISTOLOGY

- 13 MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF THE CEREBRAL CORTEX OF A MINI-PIG
UNDER CONDITIONS OF GENE THERAPY
AFTER EXPERIMENTAL STROKE
Zufar Z. Safiullov, Andrey A. Izmailov, Vage A. Markosyan, Alexander E. Khomyakov, Nataliya V. Boychuk, Maria V. Nigmatzyanova, Alina R. Siraeva, Sultan S. Targachev, Victor V. Valiullin, Rustem R. Islamov, Vadim I. Pospelov

PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY

- 28 A BRAIN DEATH MODEL WITH SLOW
INDUCTION FOR EXPERIMENTAL STUDIES
OF ORGAN DONATION
Pavel A. Ermolaev, Tatyana P. Khramykh, Alexey S. Vyaltzin, Lyubov O. Barskaya

ONCOLOGY

- 36 SPECIFIC ANTITUMOR ACTIVITY
OF ANTI-CA125 CAR-T LYMPHOCYTES
AGAINST CA125-POSITIVE
AND CA125-NEGATIVE CELLS
Tatyana M. Kulinich, Yana Yu. Kiseleva, Alexander M. Shishkin, Elena A. Kudinova, Oksana B. Knyazeva, Rajesh Ranjit, Vladimir K. Bozhenko, Vladimir A. Solodky

INTERNAL DISEASES

- 48 FATTY ACID COMPOSITION OF BLOOD SERUM
AND ERYTHROCYTE MEMBRANES IN MEN
WITH STEATOSIS AND STEATOHEPATITIS
WITH NORMAL TRANSAMINASE ACTIVITY
Margarita V. Kruchinina, Marina F. Osipenko, Alexander A. Shestov, Marina V. Parulikova



Базовые аспекты мета-анализа. Часть 2

Е.А. Тао✉, М.Ю. Надинская, А.Ю. Суворов, Н.М. Буланов, В.И. Шоломова,
П.П. Потапов, М.С. Тараткин, М.Ю. Бровко

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119048, Россия

Аннотация

Мета-анализ объединяет результаты нескольких научных исследований для получения обобщенной количественной оценки величины эффекта, для сравнения результатов нескольких исследований, выявления в них закономерностей и возможных источников разногласий. Поскольку оригинальные научные исследования проводятся разными коллективами авторов, с разными пациентами, в разные временные промежутки, по разным протоколам и клиническим рекомендациям, все перечисленные факторы могут оказывать влияние на результаты отдельно взятого исследования, обуславливая статистическую гетерогенность. Мета-анализы занимают высшую степень достоверности в концепции доказательной медицины, так как позволяют учитывать влияние множества вмешивающихся факторов и публикационных смещений на истинный размер эффекта. Понимание возможных источников ошибочных заключений в исследованиях позволит научным сотрудникам критически относиться к интерпретации результатов и корректно планировать собственные эксперименты. В настоящей статье читатель познакомится с методами выявления и количественной оценки скрытой гетерогенности, такими как анализ подгрупп и метарегрессионный анализ. Кроме того, читатель научится производить расчет размера эффекта в исследованиях, математически и графически оценивать публикационные смещения, а также учитывать эту оценку при проведении мета-анализа в общей усредненной оценке размера эффекта.

Ключевые слова: размер эффекта; разница средних; анализ подгрупп; метарегрессионный анализ; гетерогенность; публикационное смещение

Рубрики MeSH:

МЕТА-АНАЛИЗ КАК ТЕМА

Для цитирования: Тао Е.А., Надинская М.Ю., Суворов А.Ю., Буланов Н.М., Шоломова В.И., Потапов П.П., Тараткин М.С., Бровко М.Ю. Базовые аспекты мета-анализа. Часть 2. Сеченовский вестник. 2024; 15(2): 4–12. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.4-12>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Тао Екатерина Александровна, канд. мед. наук, ассистент кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Адрес: ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119048, Россия

E-mail: tao_e_a@staff.sechenov.ru

Конфликт интересов. М.Ю. Бровко – член редакционной коллегии, М.Ю. Надинская – научный редактор журнала: оба не принимали участия в редакционном рассмотрении и принятии решений по данной статье.

Финансирование. Статья подготовлена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Поступила: 06.06.2024

Принята: 11.06.2024

Дата печати: 15.07.2024

Basic aspects of meta-analysis. Part 2

Ekaterina A. Tao[✉], Maria Yu. Nadinskaia, Alexander Yu. Suvorov, Nikolay M. Bulanov, Victoria I. Sholomova, Pavel P. Potapov, Mark S. Taratkin, Mikhail Yu. Brovko

Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119048, Russia

Abstract

Meta-analysis combines the results of several scientific studies to obtain a summary quantitative estimation of effect size in order to compare the results of several studies and to identify patterns among them and possible sources of biases. Since the research teams, patients, research protocol, clinical guidelines and time intervals are often different between original scientific studies all these sources of difference can influence the results of each study, causing statistical heterogeneity. Meta-analyses are the highest level of credibility within evidence-based medicine, as they allow us to take into account the influence of many confounding factors and publication biases on the true effect size. Understanding the possible sources of erroneous conclusions in papers will allow researchers to analyze the results of such studies correctly and properly plan their own experiments. In this article the reader will be introduced to methods for identifying and quantifying hidden heterogeneity, such as subgroup analysis and meta-regression. In addition, the reader will learn how to calculate effect size in studies, estimate publication bias mathematically and graphically, and incorporate this estimate into the overall average effect size estimate in meta-analyses.

Keywords: effect size; mean difference; subgroup analysis; meta-regression analysis; heterogeneity; publication bias

MeSH terms:

META-ANALYSIS AS TOPIC

For citation: Tao E.A., Nadinskaia M.Yu., Suvorov A.Yu., Bulanov N.M., Sholomova V.I., Potapov P.P., Taratkin M.S., Brovko M.Yu. Basic aspects of meta-analysis. Part 2. Sechenov Medical Journal. 2024; 15(2): 4–12. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.4-12>

CONTACT INFORMATION:

Ekaterina A. Tao, Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

Address: 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119048, Russia

E-mail: tao_e_a@staff.sechenov.ru

Conflict of interests. Mikhail Yu. Brovko is an editorial board member and Maria Yu. Nadinskaia is a scientific editor of the journal: both had no role in the editorial review and decision making for this article.

Financial support. This article was supported by the Academic leadership program Priority 2030 proposed by Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

Received: 06.06.2024

Accepted: 11.06.2024

Date of publication: 15.07.2024

В первой части цикла статей, посвященных базовым аспектам мета-анализа, рассмотрено само понятие мета-анализа и представлены основные рекомендации, которыми необходимо руководствоваться при его проведении [1]. Мы узнали, как применять графики риска смещений для оценки наличия смещений в исследованиях; выяснили, чем может быть обусловлена гетерогенность исследований, и рассмотрели способы ее вычисления. Также мы детально обсудили различные типы моделей, позволяющие обобщить результаты исследований, и способы расчета весов исследования в общей усредненной

оценке размера эффекта. Кроме того, мы затронули аналитический метод анализа чувствительности – метод leave-one-out и продемонстрировали графическое представление такой оценки, а также представили основную диаграмму для отображения результатов мета-анализа – форест-диаграмму (forest plot).

Включенные в мета-анализ оригинальные исследования могут различаться, поскольку проводились разными коллективами, с разными пациентами, в разные временные промежутки. С целью учета подобных различий между клиническими исследованиями введено понятие гетерогенности,

оценка и учет которой важны для объективного количественного обобщения результатов. Разнообразие характеристик пациентов, медицинских вмешательств и исходов считают клинической гетерогенностью. Вариабельность дизайна исследований, методик оценки исходов и различных единиц измерения обозначают методологической гетерогенностью. Оба вышеуказанных вида гетерогенности приводят к появлению статистической гетерогенности, связанной с различиями в оценке размера эффекта. При дальнейшем рассмотрении гетерогенности в текущей статье мы будем считать, что методологическая и клиническая гетерогенность сведены к минимуму, а имеющаяся статистическая гетерогенность или просто *гетерогенность* связана со скрытыми вмешивающимися факторами.

В данной публикации мы глубже затронем методы выявления скрытой гетерогенности и оценки публикационных смещений, а также приведем способы расчета наиболее частых статистик, используемых для оценки размера эффекта в мета-анализе.

АНАЛИЗ ПОДГРУПП

К методам, позволяющим выявить скрытые вмешивающиеся факторы (конфаундеры или модераторы), относят анализ подгрупп и метарегрессионный анализ. Оба метода имеют свои преимущества и недостатки.

При реализации анализа подгрупп исследуемую выборку разделяют по заданному признаку на подгруппы для проведения между ними сравнительного анализа. Так, при оценке распространенности сердечно-сосудистых заболеваний модераторами являются пол и возраст пациентов. В связи с этим для корректной оценки необходимо рассчитывать распространенность сердечно-сосудистых заболеваний отдельно в подгруппах пациентов, выделенных по полу и возрасту (например, по десятилетиям жизни). Кроме того, анализ подгрупп может использоваться для ответа на специфичные исследовательские вопросы о конкретных группах интереса. Например, в исследовании, в котором принимали участие пациенты с сахарным диабетом, было обнаружено положительное влияние экспериментального воздействия на уровень протеинурии. В связи с этим при апостериорном анализе исследователи выделили подгруппу пациентов с хронической болезнью почек для более детального изучения влияния экспериментального препарата на функцию почек. Однако подобное разделение на подгруппы возможно провести только при наличии исходных данных пациентов. В опубликованных исследованиях клинические данные, как правило, представлены в обобщенном виде, что затрудняет применение анализа подгрупп в явном виде при проведении мета-анализа.

Тем не менее, имея обобщенные результаты опубликованных клинических исследований, применить

метод анализа подгрупп в мета-анализе для получения усредненной оценки размера эффекта можно следующим образом. На первом этапе необходимо оценить внутригрупповой размер эффекта, на втором этапе – межгрупповой размер эффекта [2].

Внутригрупповой анализ

Предположим, что нам необходимо оценить различия в размере эффекта между двумя экспериментальными препаратами (препарат А и препарат В). Мы можем разделить отобранные для мета-анализа клинические исследования на необходимое количество групп (в нашем случае две) в зависимости от типа используемого медицинского препарата. Затем мы рассчитаем средний размер эффекта в каждой подгруппе, используя модели с фиксированными или случайными эффектами. Методику применения вышеуказанных моделей и расчета взвешенного размера эффекта по нескольким исследованиям мы подробно обсуждали в нашей предыдущей публикации [1].

Модель с фиксированными эффектами корректно применять, если мы считаем, что исследования в подгруппах похожи друг на друга по дизайну, методологии и другим характеристикам. Примером корректного использования модели с фиксированными эффектами может быть следующая гипотетическая ситуация. Фармакологическая компания провела несколько сходных исследований по изучению экспериментального препарата А в сравнении с плацебо и также несколько сходных исследований по изучению экспериментального препарата В в сравнении с плацебо. Наша цель заключается в обобщении размера эффекта отдельно для препарата А и препарата В. В реальной жизни подобная ситуация редка. Если мы имеем несколько клинических исследований, выполненных разными коллективами авторов, в разных странах, по разным протоколам и клиническим рекомендациям, то мы ожидаем наличие различий между этими исследованиями в истинном размере эффекта. В таком случае корректно применять модель со случайными эффектами, позволяющую учесть влияние множества случайных факторов на истинный размер эффекта.

Межгрупповой анализ

На втором этапе анализа подгрупп необходимо провести сравнение полученных средних размеров эффектов между группами и рассчитать стандартную ошибку для разницы средних [2]. Разница средних между группами рассчитывается так же, как и разность средних для исследований, включенных в мета-анализ (формула 5).

Для модели с фиксированными эффектами дисперсия для разницы средних размеров эффектов оценивается как сумма дисперсий каждой группы:

$$V_{Diff} = V_A + V_B, \quad (1)$$

где V_{Diff} – дисперсия разницы средних;
 V_A – дисперсия для группы A;
 V_B – дисперсия для группы B.

Для модели со случайными эффектами при расчете дисперсии для разницы средних размеров эффектов дополнительно учитывается межгрупповая дисперсия:

$$V_{Diff} = V_A + V_B + \frac{\tau_{Group}^2}{m}, \quad (2)$$

где τ_{Group}^2 – межгрупповая дисперсия;
 m – количество подгрупп.

Нельзя оставить без внимания слабые стороны анализа подгрупп. Так, разделение выборки на подгруппы нарушает принцип рандомизации, потому повышает вероятность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Выводы, полученные при анализе подгрупп, не следует трактовать однозначно. Поскольку разделение на подгруппы проводится, как правило, после завершения клинических испытаний, существует риск выявления случайных, при этом статистически значимых различий, в связи с чем результаты анализа подгрупп необходимо подвергать критическому обсуждению. Более того, необходимо отметить, что даже при выявлении статистически значимых различий при количественной оценке эффекта раздельно в подгруппах мы не можем полностью объяснить имеющуюся гетерогенность различиями по признаку, по которому мы разделили выборку на подгруппы. Это связано с тем, что подгруппы с высокой вероятностью будут отличаться не только по «разделяющему», но и по другим признакам. Таким образом, между выделенными нами подгруппами всегда будет присутствовать неучтенная гетерогенность, связанная с наличием скрытых модераторов.

МЕТАРЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ

Метарегрессия – это углубленный анализ подгрупп, позволяющий одновременно учитывать различные скрытые модераторы, как числовые, так и категориальные. Метарегрессионный анализ подразумевает построение регрессионной модели, где в качестве переменной исхода выступает оценка размера эффекта, а в качестве параметров модели – характеристики включенных в анализ исследований – модераторы, как качественные, так и количественные (3). Коэффициенты метарегрессионной модели показывают величину и направление влияния каждого модератора на размер эффекта в исследовании.

$$\theta_k = \alpha X_k + \epsilon_k, \quad (3)$$

где θ_k – наблюдаемый эффект исследования k ;
 X_k – вектор, содержащий модераторы исследования k ;

α – вектор коэффициентов регрессионной модели;
 ϵ_k – отклонение наблюдаемого в исследовании эффекта от истинного эффекта.

Однако даже при применении метарегрессионного анализа присутствует остаточная гетерогенность, так как часть модераторов может быть не учтенной. Поэтому введено понятие метарегрессии со случайными эффектами, где учитывается случайная гетерогенность по аналогии с мета-анализом со случайными эффектами [3]. Реализация метарегрессионного анализа доступна с помощью пакета metafor¹ языка программирования R.

Результаты метарегрессионного анализа можно представить графически в виде пузырьковой диаграммы (рис. 1). Данные для построения графика по эффективности вакцины против туберкулеза находятся в открытом доступе и сопровождают библиотеку metafor языка программирования R. На графике представлена однофакторная модель зависимости размера эффекта (относительный риск) от модератора (градус широты) со случайными эффектами. Каждая точка на графике обозначает размер эффекта в конкретном исследовании. Размер каждой точки пропорционален значимости исследования в оценке общего размера эффекта. Прямая толстая линия – линия регрессии, дугообразные линии с закрашенной серой областью представляют 95% доверительный интервал для регрессионной оценки. Исследование, расположенное на графике ближе к экватору (точка 8), имело относительный риск, равный 1, что означало отсутствие эффекта вакцины в данном исследовании. По мере отдаления от экватора прослеживается увеличение размера эффекта в исследованиях. В исследованиях, расположенных на графике дальше от экватора (точки 4, 2), ожидаемый размер эффекта был наибольшим,

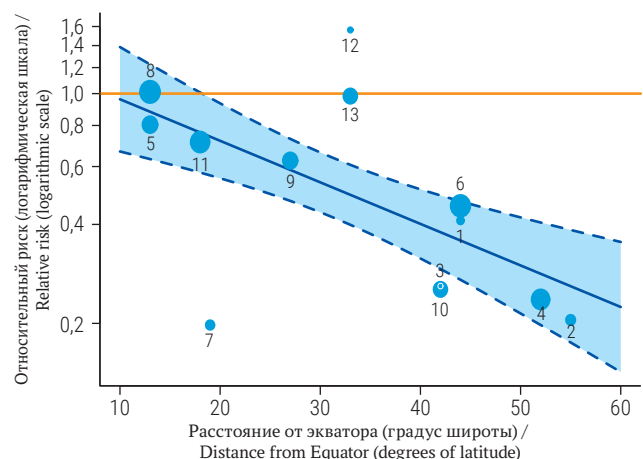


РИС. 1. Зависимость отношения рисков от градуса широты, полученная при метарегрессионном анализе 13 клинических исследований, адаптировано из C. Berkey и соавт. [3].
FIG. 1. Risk ratio versus latitude from a meta-regression based on 13 clinical studies, adapted from C. Berkey et al. [3]

¹ <https://metafor-project.org/doku.php/metafor> (access date 04.06.2024).

при этом относительный риск менее 1 можно интерпретировать как более высокую эффективность вакцинации в этих исследованиях. В исследованиях 12 и 13 применение вакцины оказалось неэффективным, однако нужно учесть, что в этих исследованиях было много методологических неточностей, поэтому на графике они оказались в виде выбросов.

Проведение метарегрессионного анализа требует соблюдения определенных условий.

1. Количество исследований. В общем случае применение метарегрессии возможно, если в мета-анализ включено, как минимум, 10 исследований. Однако при большом количестве модераторов и их неравномерном распределении между включенными исследованиями для получения значимых результатов требуется увеличение выборки.

2. Предварительный выбор потенциальных модераторов. Составление протокола исследования с перечислением модераторов, которые планируется включить в метарегрессионный анализ, позволит как ограничить количество анализируемых подгрупп, так и избежать ложных результатов в связи со случайно обнаруженным в ходе исследования модератором. Конечно, при выявлении в процессе проведения анализа результатов новых сильных модераторов исследователь может провести дополнительные сравнения, однако такой анализ корректно обозначать как апостериорный (post hoc).

3. Ограничение количества модераторов. С увеличением количества анализируемых вмешивающихся факторов растет вероятность получения ложных результатов, поскольку при множественных сравнениях проводится коррекция статистически значимого уровня, достигнуть которого становится сложнее.

4. Рациональный выбор модераторов. Для получения интерпретируемых результатов выбор анализируемых модераторов должен быть научно и клинически обоснован. Кроме того, нужно четко различать прогностические факторы, которые непосредственно влияют на исход заболевания, и модераторы, которые влияют на само вмешательство и модифицируют эффект этого вмешательства на исход. Для анализа подгрупп и построения метарегрессионной модели некорректно использовать прогностические факторы. Например, при оценке смертности от онкологических заболеваний курение может выступать в качестве прогностического фактора, так как непосредственно влияет на смертность, поэтому этот фактор корректнее включать в модель, прогнозирующую исход заболевания. А возраст, условия проведения эксперимента, доза исследуемого препарата и дизайн исследования являются модераторами, которые можно включать в качестве параметров в метарегрессионную модель, оценивающую влияние модераторов на размер эффекта. Необходимо отметить, что отношение фактора к прогностическому или к модератору зависит от целей конкретного исследования.

5. Влияние модератора может быть выявлено не всегда. Например, в несколько клинических исследований включали участников от 18 до 60 лет. В каждом отдельном исследовании может присутствовать взаимосвязь между возрастом и наблюдаемым эффектом. Однако если средний возраст между разными клиническими исследованиями сопоставим, то на уровне метарегрессионного анализа возраст окажется незначимым модератором. Подобный феномен получил название систематической ошибки агрегирования или экологического смещения.

6. Мультиколлинеарность модераторов. Мультиколлинеарными или взаимосвязанными считают модераторы, эффект которых на вмешательство нельзя разделить. Например, в исследованиях, где применяли более высокие дозы глюкокортикостероидов, участвовали пациенты с более тяжелым течением заболевания. В такой ситуации невозможно однозначно определить, что оказало больший эффект на результат лечения (доза препарата или тяжесть течения заболевания). Проверить модераторы на мультиколлинеарность можно с помощью корреляции. Выявление высокой корреляции свидетельствует о взаимосвязи модераторов, в таком случае для метарегрессионного анализа нужно выбрать лишь один из них.

СМЕЩЕНИЯ В ПУБЛИКАЦИЯХ

Мы выяснили, как выявить и количественно оценить влияние модераторов на размер эффекта в исследовании. В нашей предыдущей статье мы узнали, как визуально оценить риск наличия публикационных смещений в исследовании и как в общем случае рассчитать веса исследований в усредненной оценке размера эффекта [1]. Поиск и оценка смещений в публикациях играют важную роль, поскольку смещения влияют на корректность выводов, полученных при проведении мета-анализа. Далее мы подробнее остановимся на том, как математически оценить публикационные смещения и учесть их оценку в общей усредненной оценке размера эффекта при проведении мета-анализа.

Существуют два основных подхода к оценке публикационных смещений: аналитический и графический.

Аналитический подход

Аналитический подход представляет построение аналитической модели с целью отбора публикаций для включения в мета-анализ. Отборочные модели основаны на учете весов каждого исследования. В общем виде формулу для модели отбора можно представить следующим образом (4) [4–6]:

$$g(x|\theta) = \frac{f(x|\theta)\omega(x)}{\int_{-\infty}^{\infty} f(x|\theta)\omega(x)dx}, \quad (4)$$

где $g(x|\theta)$ – функция отбора исследования;

x – наблюдаемый в исследовании размер эффекта;
 θ – истинный средний размер эффекта;
 $f(x|\theta)$ – функция плотности вероятности x ;
 $\omega(x)$ – функция, задающая вес исследования;
 интегральное выражение – вероятность включения исследования в мета-анализ.

Функции, задающие вес исследования, подробно обобщены в обзоре А. Sutton и соавт. [6]. Интерпретировать функцию весов можно следующим образом: чем выше значимость результатов исследования, тем вероятнее оно будет включено в мета-анализ. Для построения подобных аналитических моделей необходимо включение в мета-анализ не менее 10 исследований. Недостатком аналитического подхода является трудоемкость расчетов, а также то, что выбор функции весов основан на аналитических допущениях, поэтому интерпретация результата отборочной модели может представлять трудности.

Графический подход

Более применимым в практике методом оценки публикационных смещений представляется графический подход, реализация которого доступна при помощи готовых статистических пакетов, например библиотеки metafor языка программирования R. Графический подход для анализа публикационных смещений основан на оценке воронкообразных диаграмм (funnel plots), демонстрирующих зависимость размера эффекта от точности исследования. Размер эффекта и точность результатов исследования могут быть выражены различными статистиками в зависимости от поставленной цели. Наиболее часто оценка точности исследования в мета-анализе представлена стандартной ошибкой или обратной стандартной ошибкой (precision) в случае включения в мета-анализ одновременно как крупных, так и небольших исследований [7]. О вариантах оценки размера эффекта мы поговорим в следующем разделе. Воронкообразную диаграмму можно оценивать

как визуально, так и статистическими методами. Статистические методы основаны на математической оценке асимметрии воронкообразных диаграмм и включают регрессию Эггера [8], ранговую корреляцию Бегга [9] и их различные модификации [10–12].

Симметричность воронкообразной диаграммы свидетельствует об отсутствии публикационных смещений (рис. 2). Для демонстрации представлены сгенерированные из нормального распределения данные, имитирующие результаты 20 исследований. Каждая точка на графике соответствует отдельному клиническому исследованию. На воронкообразных диаграммах по оси X принято указывать статистику, оценивающую размер эффекта (в данном случае корреляция), по оси Y – статистику, оценивающую точность результатов исследования [7]. В зависимости от выбранной статистики для оценки точности исследования воронкообразные диаграммы могут иметь различную форму (рис. 2). Средняя линия обозначает истинный средний размер эффекта, а боковые закрашенные области – доверительные интервалы для размера эффекта.

При наличии публикационных смещений исследования будут размещены несимметрично относительно истинного среднего размера эффекта (рис. 3). На графике представлены данные, находящиеся в открытом доступе, по эффективности вакцины против туберкулеза, которые мы обсуждали ранее. В данном случае в качестве статистики, оценивающей размер эффекта, использовали отношение рисков. Чем меньше стандартная ошибка и дисперсия у размера эффекта, тем выше точность исследования и тем ближе точка исследования расположена к верхушке диаграммы, и, наоборот.

Еще один метод оценки устойчивости результатов мета-анализа – анализ чувствительности, основанный на поочередном исключении исследований из мета-анализа, и его графическое представление мы обсуждали в нашей предыдущей статье [1].

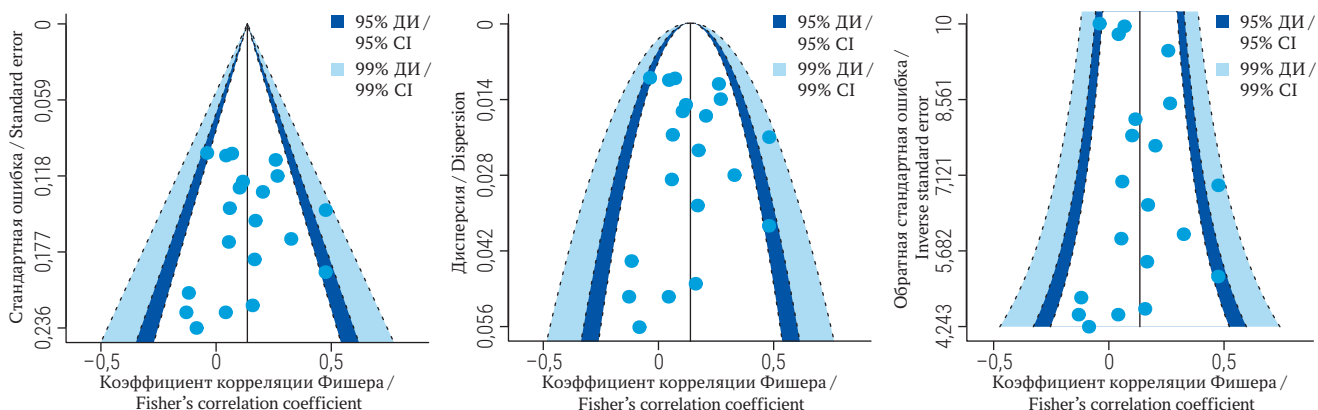


РИС. 2. Воронкообразная диаграмма, полученная при мета-анализе 20 сгенерированных исследований.

Примечание: ДИ – доверительный интервал.

FIG. 2. Funnel plots for a meta-analysis of 20 randomly generated trials.

Note: CI – confidence interval.

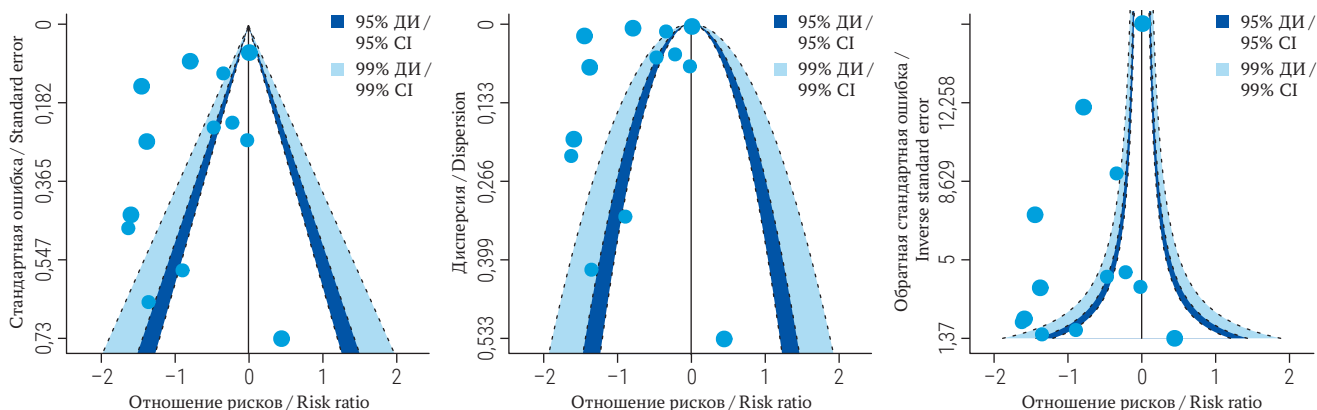


РИС. 3. Воронкообразная диаграмма, полученная при мета-анализе 13 клинических исследований.

Примечание: ДИ – доверительный интервал.

FIG. 3. Funnel plots for a meta-analysis of 13 clinical trials.

Note: CI – confidence interval.

ОЦЕНКА РАЗМЕРА ЭФФЕКТА В МЕТА-АНАЛИЗЕ

До сих пор мы использовали понятие *размер эффекта*, истинную оценку которого мы планируем получить при проведении мета-анализа. Размер эффекта может быть представлен различными статистиками в зависимости от единиц измерения, в которых выражен исход в публикациях. Далее мы обсудим наиболее часто употребляемые статистики для оценки размера эффекта и их формальное представление.

Разница средних (mean difference) и стандартизованная разница средних (standardized mean difference) – наиболее часто используемые статистики в мета-анализе для оценки размера эффекта результатов исследования, выраженных непрерывными числовыми значениями.

Разница средних (5) с дисперсией (6) оценивает абсолютную разницу между средними величинами в двух группах [13]; иными словами, оценивает среднюю величину, на которую экспериментальное вмешательство изменяет исход в сравнении с контрольным вмешательством. Применение разницы средних в мета-анализе возможно, если величины исходов в исследованиях представлены в одинаковых шкалах и единицах измерения.

$$\mu_i = \mu_{iT} - \mu_{iC}, \quad (5)$$

где μ_i – разница средних i -го исследования;

μ_{iT} – среднее значение эффекта в i -й экспериментальной группе;

μ_{iC} – среднее значение эффекта в i -й контрольной группе.

$$\sigma_i^2 = \frac{\sigma_{iT}^2}{n_{iT}} + \frac{\sigma_{iC}^2}{n_{iC}}, \quad (6)$$

где σ_i^2 – дисперсия разницы средних i -го исследования;
 σ_{iT}^2 – дисперсия эффекта в i -й экспериментальной группе;

σ_{iC}^2 – дисперсия эффекта в i -й контрольной группе;

n_{iT} – размер экспериментальной выборки в i -м исследовании;

n_{iC} – размер контрольной выборки в i -м исследовании.

Стандартизованную разницу средних (7) с дисперсией (8) необходимо использовать, когда переменные одного и того же исхода в разных исследованиях, включенных в мета-анализ, выражены в различных шкалах и/или единицах измерения [13].

$$\delta_i = \frac{\mu_{iT} - \mu_{iC}}{\sigma_i}, \quad (7)$$

где δ_i – стандартизованная разница средних i -го исследования;

μ_{iT} – среднее значение эффекта в i -й экспериментальной группе;

μ_{iC} – среднее значение эффекта в i -й контрольной группе;

σ_i – стандартное отклонение стандартизованной разницы средних i -го исследования.

$$\sigma_i^2 = \frac{(n_{iT} - 1)\sigma_{iT}^2 + (n_{iC} - 1)\sigma_{iC}^2}{n_{iT} + n_{iC} - 2}, \quad (8)$$

где σ_i^2 – дисперсия стандартизованной разницы средних i -го исследования;

σ_{iT}^2 – дисперсия эффекта в i -й экспериментальной группе;

σ_{iC}^2 – дисперсия эффекта в i -й контрольной группе;

n_{iT} – размер экспериментальной выборки в i -м исследовании;

n_{iC} – размер контрольной выборки в i -м исследовании.

Преимуществом использования стандартизованного показателя является возможность сравнения результатов между различными исследованиями, чего не позволяет показатель (абсолютной) разницы средних. Стандартизованная разница средних может принимать значения от 0 до 1, при этом значение 0,2 интерпретируется как малый; 0,5 – средний и 0,8 – большой

размер эффекта [14]. Однако показатели разницы средних и стандартизированной разницы средних не учитывают разнонаправленные шкалы. Например, в мета-анализ включены исследования, где оценивают выраженность депрессии по 10-бальной шкале, при этом в одном исследовании больший балл по шкале свидетельствует о более тяжелом течении заболевания, а в другом, наоборот, о более легком течении депрессии. В таком случае перед расчетом разницы средних или стандартизированной разницы средних необходимо вручную привести шкалы к одному направлению (например, домножив одну из шкал на минус 1).

Отношение средних (ratio of means) – еще один подход к оценке размера эффекта в мета-анализе для исходов, выраженных непрерывными числовыми значениями [15], показывающий, во сколько раз экспериментальное вмешательство изменяет исход в сравнении с контрольным вмешательством. Преимуществом данной статистики является независимость оценки размера эффекта от различных шкал и/или единиц измерения переменных исходов в исследованиях, включенных в мета-анализ. Однако расчет отношения средних корректен только в случаях, когда переменная исхода может выражаться положительными, но не отрицательными единицами измерения.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Тао, М.Ю. Надинская и А.Ю. Суворов в равной степени внесли вклад в эту работу и должны считаться первыми соавторами. Е.А. Тао, М.Ю. Надинская, А.Ю. Суворов, Н.М. Буланов, В.И. Шоломова, П.П. Потапов, М.С. Тараткин и М.Ю. Бровко участвовали в написании текста рукописи. В.И. Шоломова, П.П. Потапов и М.С. Тараткин выполняли поиск и анализ литературы по теме обзора. Е.А. Тао разработала общую концепцию статьи. М.Ю. Бровко осуществлял руководство ее написанием. Все авторы участвовали в обсуждении и редактировании работы. Все авторы утвердили окончательную версию статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Суворов А.Ю., Латушкина И.В., Гуляева К.А. и др. Базовые аспекты мета-анализа. Часть 1. Сеченовский вестник. 2023; 14(1): 4–14. [https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14/Suvorov A.Y., Latushkina I.V., Gulyaeva K.A., et al. Basic aspects of meta-analysis. Part 1. Sechenov Medical Journal. 2023; 14\(1\): 4–14. https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14](https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14/Suvorov A.Y., Latushkina I.V., Gulyaeva K.A., et al. Basic aspects of meta-analysis. Part 1. Sechenov Medical Journal. 2023; 14(1): 4–14. https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.1.4-14)
2. Borenstein M., Higgins J.P.T. Meta-Analysis and Subgroups. *Prev Sci.* 2013 Apr; 14(2): 134–143. <https://doi.org/10.1007/s11121-013-0377-7>. PMID: 23479191
3. Berkey C.S., Hoaglin D.C., Mosteller F., Colditz G.A. A random-effects regression model for meta-analysis. *Stat Med.* 1995 Feb 28; 14(4): 395–411. <https://doi.org/10.1002/sim.4780140406>. PMID: 7746979
4. Hedges L.V. Modeling publication selection effects in meta-analysis. *J Phys A Math Theor.* 1992; 7(2): 246–255. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
5. Dear K.B.G., Begg C.B. An approach for assessing publication bias prior to performing a meta-analysis. *Stat Sci.* 1992; 7(2): 237–245. <https://doi.org/10.1214/ss/1177011363>

Другими мерами оценки размера эффекта количественных переменных может быть стандартизированная разница в терминах минимально значимой разницы, разница в процентах от исходного уровня и другие. Для оценки размера эффекта категориальных данных используют отношение пропорциональных шансов (proportional odds ratios), временных рядов – отношение рисков (hazard ratio), переменных счета – отношение частот (rate ratio).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей статье мы обсудили методы количественной оценки гетерогенности, их преимущества, недостатки и необходимые условия, а также математическую реализацию и интерпретацию графического представления метарегрессионного анализа. Кроме того, мы узнали, как проводить оценку публикационных смещений аналитическими и графическими методами и как учитывать публикационные смещения в оценке общего размера эффекта при проведении мета-анализа. Также мы остановились на статистиках, используемых для оценки размера эффекта, и привели пример расчета наиболее часто используемых статистик и их стандартных отклонений.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Ekaterina A. Tao, Maria Yu. Nadinskaia and Alexander Yu. Suvorov equally contributed to this work and should be considered the first co-authors. Ekaterina A. Tao, Maria Yu. Nadinskaia, Alexander Yu. Suvorov, Nikolay M. Bulanov, Victoria I. Sholomova, Pavel P. Potapov, Mark S. Taratkin and Mikhail Yu. Brovko participated in writing the text of the manuscript. Victoria I. Sholomova, Pavel P. Potapov and Mark S. Taratkin searched and analyzed the literature on the topic of the review. Ekaterina A. Tao developed the general concept of the article. Mikhail Yu. Brovko supervised writing the text of the manuscript. All authors participated in the discussion and editing of the work. All authors approved the final version of the article.

6. Sutton A.J., Song F., Gilbody S.M., Abrams K.R. Modelling publication bias in meta-analysis: a review. *Stat Methods Med Res.* 2000 Oct; 9(5): 421–445. <https://doi.org/10.1177/096228020000900503>. PMID: 11191259
7. Sterne J.A.C., Egger M. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis. *J Clin Epidemiol.* 2001 Oct; 54(10): 1046–1055. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(01\)00377-8](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(01)00377-8). PMID: 11576817
8. Egger M., Smith G.D., Schneider M., Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997 Sep 13; 315(7109): 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>. PMID: 9310563; PMCID: PMC2127453
9. Begg C.B., Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics.* 1994 Dec; 50(4): 1088–1101. <https://doi.org/10.2307/2533446>. PMID: 7786990
10. Harbord R.M., Egger M., Sterne J.A.C. A modified test for small-study effects in meta-analyses of controlled trials with binary endpoints. *Stat Med.* 2006 Oct 30; 25(20): 3443–3457. <https://doi.org/10.1002/sim.2380>. PMID: 16345038

11. *Macaskill P., Walter S.D., Irwig L.* A comparison of methods to detect publication bias in meta-analysis. *Stat Med.* 2001 Feb 28; 20(4): 641–654. <https://doi.org/10.1002/sim.698>. PMID: 11223905.
12. *Lin L., Chu H.* Quantifying publication bias in meta-analysis. *Biometrics.* 2018 Sep; 74(3): 785–794. <https://doi.org/10.1111/biom.12817>. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29141096; PMCID: PMC5953768
13. *Bakbergenuly I., Hoaglin D.C., Kulinskaya E.* Estimation in meta-analyses of mean difference and standardized mean difference. *Stat Med.* 2020 Jan 30; 39(2): 171–191. <https://doi.org/10.1002/sim.8422>. Epub 2019 Nov 11. PMID: 31709582; PMCID: PMC6916299
14. *Cohen J.* Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Second Edition. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates; 1988. 579 p. ISBN 0-8058-0283-5
15. *Friedrich J.O., Adhikari N.K.J., Beyene J.* The ratio of means method as an alternative to mean differences for analyzing continuous outcome variables in meta-analysis: A simulation study. *BMC Med Res Methodol.* 2008; 8(1): 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-8-32>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT AUTHORS

Тао Екатерина Александровна , канд. мед. наук, ассистент кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0621-7054>

Надинская Мария Юрьевна, канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1210-2528>

Суворов Александр Юрьевич, канд. мед. наук, главный статистик отдела исследовательских сервисов Управления по научному развитию и клиническим исследованиям ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2224-0019>

Буланов Николай Михайлович, канд. мед. наук, доцент кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3989-2590>

Шоломова Виктория Игоревна, канд. мед. наук, доцент кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8785-7968>

Потапов Павел Петрович, ассистент кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-2832>

Тараткин Марк Сергеевич, начальник отдела развития молодежной науки Управления по научному развитию и клиническим исследованиям ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4369-173X>

Бровко Михаил Юрьевич, д-р. мед. наук, профессор кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии; проректор по международной деятельности ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-2701>

 Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Ekaterina A. Tao , Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0621-7054>

Maria Yu. Nadinskaia, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Hepatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1210-2528>

Alexander Yu. Suvorov, Cand. of Sci. (Medicine), Chief Statistician, Department of Research Services, Office of Scientific Development and Clinical Research, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2224-0019>

Nikolay M. Bulanov, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3989-2590>

Victoria I. Sholomova, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8785-7968>

Pavel P. Potapov, Assistant Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-2832>

Mark S. Taratkin, Head of Department of Youth Science Development, Office of Scientific Development and Clinical Research, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4369-173X>

Mikhail Yu. Brovko, Doctor of Sci. (Medicine), Professor, Department of Internal, Occupational Diseases and Rheumatology; Vice-rector for International Affairs, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-2701>



Морфологические характеристики коры головного мозга мини-свиньи в условиях генной терапии после экспериментального инсульта

З.З. Сафиуллов¹, А.А. Измайлов^{1,✉}, В.А. Маркосян¹, А.Е. Хомяков¹,
Н.В. Бойчук¹, М.В. Нигметзянова¹, А.Р. Сираева¹, С.С. Таргачев¹, В.В. Валиуллин¹,
Р.Р. Исламов¹, В.И. Пospelов²

¹ ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

ул. Бутлерова, д. 49, г. Казань, 420012, Россия

² ООО «Импульс жизни»

ул. Маршала Бирюзова, д. 32, Москва, 123060, Россия

Аннотация

Цель. Изучить эффективность превентивной генной терапии (за 2 суток) и генной терапии в острую фазу (через 4 часа) ишемического инсульта у мини-свиньи с помощью аутологичного лейкоконцентрата (АутоЛК), обогащенного рекомбинантными генами сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии 1 (NCAM1), а также миграцию лейкоцитов, трансдуцированных химерным аденовирусным вектором 5 серотипа с фибром 35 серотипа (Ad5/F35) и геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) в органы иммунной защиты.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 8-месячных вьетнамских вислобрюхих мини-свиньях ($n = 16$). Ишемический инсульт создавали путем окклюзии дистальных ветвей левой средней мозговой артерии и правой общей сонной артерии. Генетически модифицированный АутоЛК вводили превентивно внутривенно за 2 суток до или в острую фазу через 4 часа после моделирования инсульта, контрольной группе вводили 30 мл физиологического раствора. Морфологию коры мозга оценивали с помощью гистологических методов в пограничной с инфарктом и перинфарктной зонах через 21 сутки. Миграцию генетически модифицированных Ad5/F35-GFP лейкоцитов в головной мозг, селезенку, поднижнечелюстные лимфоузлы изучали через неделю после моделирования инсульта.

Результаты. В перинфарктной зоне содержание пикнотических нейронов у контрольных животных было выше, при этом количество капилляров было меньше, чем в группах генной терапии. У последних нейроны имели типичную морфологию с сохранными отростками, в контрольной группе отростки были извилисты и фрагментированы. Флуоресцентная микроскопия после введения АутоЛК с Ad5/F35-GFP выявила GFP-позитивные клетки в селезенке и поднижнечелюстных лимфатических узлах.

Заключение. Через 21 сутки после моделирования инсульта у мини-свиней на фоне превентивной генной терапии или генной терапии в острую фазу с помощью VEGF165/GDNF/NCAM1-АутоЛК установлена большая сохранность нейронов и выше плотность капилляров в перинфарктной зоне ишемического повреждения мозга. Лейкоциты с Ad5/F35-GFP обнаружены в селезенке и поднижнечелюстных лимфатических узлах.

Ключевые слова: ишемический инсульт головного мозга; нейрон; аутологичный лейкоконцентрат; сосудистый эндотелиальный фактор роста; глиальный нейротрофический фактор; нейрональная молекула клеточной адгезии

Рубрики MeSH:

ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ – ТЕРАПИЯ

ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ – ПАТОЛОГИЯ

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ – МЕТОДЫ

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для цитирования: Сафиуллов З.З., Измаилов А.А., Маркосян В.А., Хомяков А.Е., Бойчук Н.В., Нигметзянова М.В., Сираева А.Р., Таргачев С.С., Валиуллин В.В., Исламов Р.Р., Поспелов В.И. Морфологические характеристики коры головного мозга мини-свиньи в условиях генной терапии после экспериментального инсульта. Сеченовский вестник. 2024; 15(2): 13–27. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.13-27>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Измаилов Андрей Александрович, канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Адрес: ул. Бутлерова, д. 49, г. Казань, 420012, Россия

E-mail: andrei.izmaylov@kazangmu.ru

Соответствие принципам этики. Исследование проведено с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с разрешением Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (№ 5-26.05.2020).

Доступ к данным исследования. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у авторов по обоснованному запросу.

Данные и статистические методы, представленные в статье, прошли статистическое рецензирование редактором журнала – сертифицированным специалистом по биостатистике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-75-10030¹.

Благодарность. Авторы выражают благодарность студентам ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» А.М. Агаеву, Д.М. Самигуллиной, Р.Р. Малькову, Р.Х. Ахметову за помощь в проведении исследования.

Поступила: 05.04.2024

Принята: 17.05.2024

Дата публикации: 15.07.2024

Morphological characteristics of the cerebral cortex of a mini-pig under conditions of gene therapy after experimental stroke

Zufar Z. Safiullova¹, Andrey A. Izmailov^{1,✉}, Vage A. Markosyan¹, Alexander E. Khomyakov¹, Nataliya V. Boychuk¹, Maria V. Nigmatzyanova¹, Alina R. Siraeva¹, Sultan S. Targachev¹, Victor V. Valiullin¹, Rustem R. Islamov¹, Vadim I. Pospelov²

¹Kazan State Medical University
49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia

²LLC "Impulse of Life",
32, Marshala Biryuzova str., Moscow, 123060, Russia

Abstract

Aim. To study the effectiveness of preventive gene therapy (within 2 days) and gene therapy in the acute phase (after 4 hours) of ischemic stroke in mini-pigs using an autologous leucoconcentrate (AutoLeuc) enriched with recombinant genes of vascular endothelial growth factor (VEGF165), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), as well as the migration of leukocytes transduced with a chimeric adenoviral vector serotype 5 with fiber 35 serotype (Ad5/F35) and the green fluorescent protein (GFP) genome into immune defense organs.

Materials and methods. The experiment was conducted on 8-month-old Vietnamese lop-bellied mini-pigs (n=16). An ischemic stroke was created by occlusion of the distal branches of the left middle cerebral artery and the right common carotid artery. Genetically modified AutoLeuc was administered preventively intravenously 2 days before or in the acute phase 4 hours after stroke modelling; the control group was injected with 30 ml of saline solution. The morphology of the cerebral cortex was assessed using histological methods in the areas bordering the infarction and peri-infarction after 21 days. The migration of genetically modified Ad5/F35-GFP leukocytes into the brain, spleen, and submandibular lymph nodes was studied a week after stroke modelling.

Results. In the peri-infarction zone, the content of pyknotic neurons in control animals was higher, while the number of

¹ Российский научный фонд. Карточка проекта 19-75-10030. <https://rscf.ru/project/19-75-10030/> (дата обращения: 12.03.2024).

capillaries was lower than in the gene therapy groups. In the latter, neurons had a typical morphology with preserved outgrowths; in the control group, the outgrowths were tortuous and fragmented. Fluorescence microscopy after injection of AutoLeuc with Ad5/F35-GFP revealed GFP-positive cells in the spleen and submandibular lymph nodes.

Conclusion. 21 days after modeling a stroke in mini-pigs against the background of preventive gene therapy or gene therapy in the acute phase using VEGF165/GDNF/NCAM1 AutoLeuc, greater preservation of neurons and a higher density of capillaries in the peri-infarction zone of ischemic brain damage were established. Leukocytes with Ad5/F35-GFP were found in the spleen and submandibular lymph nodes.

Keywords: ischemic stroke; neuron; autologous leukoconcentrate; vascular endothelial growth factor; glial cell line-derived neurotrophic factor; neuronal cell adhesion molecule

MeSH terms:

ISCHEMIC STROKE – THERAPY

ISCHEMIC STROKE – PATHOLOGY

GENETIC THERAPY – METHODS

HISTOLOGICAL TECHNIQUES

For citation: Safiullov Z.Z., Izmailov A.A., Markosyan V.A., Khomyakov A.E., Boychuk N.V., Nigmatzyanova M.V., Siraeva A.R., Targachev S.S., Valiullin V.V., Islamov R.R., Pospelov V.I. Morphological characteristics of the cerebral cortex of a mini-pig under conditions of gene therapy after experimental stroke. Sechenov Medical Journal. 2024; 15(2): 13–27. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.13-27>

CONTACT INFORMATION:

Andrey A. Izmailov, Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University

Address: 49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia

E-mail: andrei.izmaylov@kazangmu.ru

Ethics statements. The study complies with the standards of the EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. All manipulations with animals were approved by the Local Bioethics Committee of the Kazan State Medical University, No. 5 of 26.05.2020.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Data and statistical methods used in the article were examined by a professional biostatistician on the Sechenov Medical Journal editorial staff.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interests.

Financial support. The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 19-75-10030².

Acknowledgments. The authors would like to thank the students of Kazan State Medical University (A.M. Agaev, D.M. Samigullina, R.R. Malkov, R.R. Akhmetov) for their help in conducting the study.

Received: 05.04.2024

Approved for publication: 17.05.2024

Date of publication: 15.07.2024

Список сокращений

Ad5/F35 – Chimeric adenoviral vector 5 serotypes with fiber 35 serotypes, химерный аденовирусный вектор 5 серотипа с фибром 35 серотипа

BDNF – Brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

CNTF – Ciliary neurotrophic factor, цилиарный нейротрофический фактор

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный нейротрофический фактор

GFP – Green fluorescent protein, зеленый флуоресци-

рующий белок

LIF – Leukemia inhibitory factor, фактор, ингибирующий лейкемию

NCAM – Neural cell adhesion molecule, нейрональная молекула клеточной адгезии

NGF – Nerve growth factor, фактор роста нервов

VEGF – Vascular endothelial growth factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста

АутоЛК – аутологичный лейкоконцентрат

ГМ – головной мозг

ЦНС – центральная нервная система

² Russian Science Foundation. Card of project 19-75-10030. <https://rscf.ru/project/19-75-10030/> (access date: 12.03.2024).

Ишемический инсульт, в переводе с латинского «удар», известный с античных времен как апоплексия, характеризуется фокальным инфарктом головного мозга (ГМ), возникающим в результате окклюзии мозговой артерии [1]. Степень тяжести неврологической дисфункции, развивающейся в результате инсульта, зависит от калибра артерии и области мозга, вовлеченной в патологический процесс [2]. Основные подходы к лечению инсульта заключаются в восстановлении проходимости окклюзированного сосуда, сопутствующей симптоматической терапии и реабилитационных мероприятий [3]. Клетки реактивной нервной ткани вокруг первичного очага необратимых нарушений, так называемая ишемическая полутень, или пенумбра, сохраняют жизнеспособность в течение терапевтического окна длительностью 3–6 часов [4]. Лечение, направленное на стимуляцию нейропластичности мозга и минимизацию объема развивающихся необратимых повреждений после инсульта в ишемической полутени, до сих пор не существует [5]. Поэтому в настоящее время активно разрабатываются методы генной и клеточной терапии, в первую очередь нацеленные на сдерживание негативных последствий инсульта в области пенумбры.

Известно, что общие принципы нейроонтогенеза могут быть применимы и к механизмам нейрогенерации [6]. Так, нейротрофические факторы, продуцируемые нервными и глиальными клетками в формирующемся мозге, обеспечивают миграцию, выживаемость и терминальную дифференцировку нейрональных клеток-предшественниц, а также направленный рост аксонов, синаптогенез и формирование нейронных сетей [7]. Это указывает на потенциальную возможность использования нейротрофических факторов для стимулирования нейрорегенерации у пациентов с разнообразными заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС) [8]. Для ослабления последствий патологических процессов в ЦНС уже используют в эксперименте: нейротрофины – фактор роста нервов (Nerve growth factor, NGF), нейротропный фактор мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофин-3 и нейротрофин-4/5; глиальный нейротрофический фактор (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF), ньютурин, артемин и персефин; нейропозитивные цитокины – цилиарный нейротрофический фактор (Ciliary neurotrophic factor, CNTF), фактор, ингибирующий лейкемию (Leukemia inhibitory factor, LIF), интерлейкин 6 (Interleukin-6, IL-6); сосудистые эндотелиальные факторы роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF) – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, фактор роста плаценты (Placental growth factor, PGF); инсулиноподобные факторы роста (Insulin-like growth factor, IGF) – IGF-1, IGF-2 и нейрональные молекулы клеточной адгезии (Neural cell adhesion molecule, NCAM), в том числе

белок L1 [8–10]. В многочисленных доклинических исследованиях на лабораторных животных доказана целесообразность использования генной терапии при ишемическом инсульте ГМ [11]. Доставка в область ишемического повреждения рекомбинантной комплементарной ДНК, кодирующей нейротрофические факторы BDNF, VEGF-A, NGF, GDNF, CNTF и основной фактор роста фибробластов (Basic fibroblast growth factor, bFGF), продемонстрировала положительное влияние указанных факторов на постинсультное восстановление мозга [9, 11, 12].

В настоящее время генотерапевтические препараты, экспрессирующие нейротрофические факторы, преимущественно исследуют в экспериментах с инсультом, применяя их непосредственно, после его возникновения. Однако пока нет однозначного ответа на вопрос о возможности использования превентивной генной терапии ишемического инсульта, в том числе и в клинике, с целью стимулирования физиологических адаптивных механизмов нервной ткани еще до наступления инсульта, например у пациентов, подверженных высокому риску нарушения мозгового кровообращения. Преобладающее число экспериментов, когда терапевтические гены нейротропных молекул доставляли в ЦНС в различные временные интервалы до моделирования инсульта, выполнено на грызунах [13].

В наших продолжающихся исследованиях для сдерживания негативных последствий ишемического инсульта головного мозга у мини-свиней была разработана терапия, основанная на доставке в очаг инсульта с помощью аутологических лейкоцитов из периферической крови генов, кодирующих нейротропные факторы [14]. Лейкоконтрат, обогащенный генами *VEGF165*, *GDNF* и *NCAM1*, вводили внутривенно в острую фазу инсульта (через 4 часа после окклюзии дистальной ветви средней мозговой артерии) или превентивно (за 2 суток до моделирования инсульта) [14]. На эффективность такого аутологичного лейкоконцентрата (АутоЛК) с тремя терапевтическими генами указывало: сдерживание увеличения объема инфаркта, положительное ремоделирование клеток нейроглии и восстановление уровня экспрессии синаптических белков в нейронах перинфарктной области как в условиях превентивной генной терапии, так и генной терапии в острую фазу ишемического инсульта [14].

Цель исследования: изучить влияние АутоЛК с генами *VEGF165*, *GDNF* и *NCAM1* на морфологическую сохранность нервной ткани в области ишемического повреждения коры ГМ у мини-свиньи, а также миграцию генетически модифицированных лейкоцитов, трансдуцированных химерными аденовирусными векторами 5 серотипа с фибром 35 серотипа (Chimeric Adenovirus serotype 5 with Fiber serotype 35, Ad5/F35), несущих ген зеленого флуоресцентного белка (Green fluorescent protein, GFP).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящий эксперимент проведен на 8-месячных вьетнамских вислобрюхих мини-свиньях (25–30 кг; $n = 16$) [15]. Для моделирования инсульта были отобраны самки по причине того, что негативные последствия острого ишемического инсульта у женщин более тяжелые, чем у мужчин [16]. Животных содержали по одному в индивидуальном загоне в условиях 12-часового режима ночь/день при температуре 24–25 °C с кондиционированием воздуха и контролируемым доступом к корму и воде.

Способы получения и введения АутоЛК, обогащенного генами нейротрофических факторов, и моделирование инсульта представлены ниже в сокращенном виде, их подробное описание приведено в нашей публикации, упомянутой выше [14].

Морфологические изменения в коре ГМ на фоне генной терапии изучали через 21 сутки после моделирования инсульта с помощью гистологических методов окраски фронтальных парафиновых срезов головного мозга подопытных животных. Конечная точка эксперимента была выбрана на основании продолжительности острого периода инсульта в течение 3 недель, а также 3-недельного периода активности аденовирусного вектора [17]. Для обзорного исследования очага ишемического повреждения использовали окраску гематоксилином и эозином; морфологические изменения в нейронах выявляли путем импрегнации серебром по методу Бильшовского – Грос – Лаврентьева; сохранность (жизнеспособность) нейронов оценивали окраской толудиновым синим по Ниссли; для изучения плотности васкуляризации и выраженности фиброза применяли трехцветную окраску по Массону с анилиновым синим.

Получение аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генами VEGF165, GDNF и NCAM1

У всех подопытных мини-свиней под анестезией с помощью Zoletil®100 (Virbac Sante Animale, Франция), 3 мг/кг внутримышечно, в асептических условиях из подключичной вены забирали 50 мл крови в контейнеры (гемакон), содержащие 35 мл раствора гемоконсерванта ЦФДА-1 (Green Cross Corporation, Республика Корея). Лейкоконцентрат готовили в гемаконе по нашему оригинальному протоколу, который последовательно включает седиментацию эритроцитов с помощью 6% гидроксипропилкрахмала с последующим центрифугированием (ускорение 34g) в течение 10 мин при 10 °C (центрифуга DP-2065 R PLUS, Presvac S.R.L., Аргентина) и промывки физиологическим раствором. После чего надосадочную жидкость с помощью фракционатора компонентов крови ФК-01 (ООО «Лидкор», Россия) экстрагировали, а оставшуюся в контейнере жидкость, содержащую лейкоциты, считали лейкоконцентратом.

Далее полученный лейкоконцентрат трансдуцировали с помощью Ad5/F35, несущих последовательности генов человека: VEGF165 (Ad5/F35-VEGF165), GDNF (Ad5/F35-GDNF) и NCAM1 (Ad5/F35-NCAM1) в равном соотношении каждого вектора. С помощью стерильного шприца смесь трех генетических конструкций вводили в гемакон с лейкоконцентратом.

Соотношение клеток лейкоконцентрата и аденовирусных векторов составляло 1:10 – таким образом, множественность заражения (multiplicity of infection, MOI) равнялась 10. Трансдукцию лейкоконцентрата проводили при температуре 21–22 °C и постоянном покачивании на шейкере. Через 12 ч в контейнер добавляли 200 мл стерильного физиологического раствора и центрифугировали при 1000 оборотах в минуту и температуре 10 °C в течение 10 мин. Далее с помощью фракционатора экстрагировали надосадочную жидкость, включающую в себя физиологический раствор, фрагменты клеток крови и свободные вирусные частицы, таким образом, чтобы в контейнере осталось приблизительно 30 мл физиологического раствора с лейкоконцентратом. До введения экспериментальным животным генетически модифицированный лейкоконцентрат хранили при температуре 21–22 °C при постоянном покачивании на шейкере, время от забора крови и до введения концентрата животным не превышало установленного срока для выделения лейкоконцентрата из пуповинной крови человека с целью криоконсервации.

Для исследования миграции генетически модифицированных лейкоцитов после внутривенной инфузии готовили лейкоконцентрат, трансдуцированный с помощью Ad5/F35-GFP.

Моделирование ишемического инсульта головного мозга у мини-свиней

В эксперименте использован разработанный нами протокол, включающий окклюзию правой общей сонной артерии и левой средней мозговой артерии. Животных наркотизировали с помощью Zoletil®100 и подключали к ингаляционному наркозному аппарату MinorVet Optima (Zoomed, Россия), по которому подавали 2,0–2,5% смесь изофлурана (Laboratorios Karizoo. S.A., Испания) с кислородом. После трепанации левой височной кости под операционным микроскопом YZ-20T9 (Nanjing Redsun Optical Co., Ltd. Китай) рассекали твердую мозговую оболочку, подвели биполярный пинцет под предварительно выделенные и приподнятые над уровнем поверхности мозга сосуды и путем электрокоагуляции прижигали дистальные ветви левой средней мозговой артерии. Для уменьшения кровотока в виллизиевом круге дополнительно перевязывали правую общую сонную артерию. Послеоперационный уход включал в себя терапию: анальгезирующую – кеторолак 30 мг/мл 2 р/д в/м 10 дней (Dr. Reddy's Laboratories, Ltd., Индия);

антибактериальную – цефотаксим 1 г/5 мл 1 р/д в/м 7 дней («Промомед Рус» ООО, Россия) и инфузионную – физиологический раствор 400,0 мл подкожно капельно 1 р/д 3 дня [18].

Экспериментальные группы животных

Для изучения влияния генетически модифицированного АутоЛК на морфологическую сохранность нервной ткани в области ишемического повреждения коры ГМ животные были разделены на 4 группы. Мини-свиньям из группы генной терапии инсульта в острой фазе ($n = 3$) за 14–16 ч до моделирования инсульта готовили АутоЛК, трансдуцированный Ad5/F35-VEGF165, Ad5/F35-GDNF и Ad5/F35-NCAM1 (что соответствовало времени его получения) и вводили через ушную вену через 4 ч после операции. Животным из группы превентивной генной терапии ($n = 3$) такой же АутоЛК готовили и вводили за 2 суток до моделирования инсульта. Животным контрольной группы ($n = 3$) вводили 30 мл физиологического раствора. Интактные мини-свиньи ($n = 3$) служили для сбора базовых показателей исследования.

Для изучения миграции генетически модифицированных лейкоцитов АутоЛК, трансдуцированный Ad5/F35-GFP, вводили за 2 суток ($n = 2$) или через 4 часа ($n = 2$) после моделирования инсульта (рис. 1).

Гистологические методы исследования

Через 21 сутки после моделирования инсульта всех животных наркотизировали с помощью Zoletil®100 и выводили из эксперимента путем введения хлористого калия (150 мг/кг) через ушную вену. Головной мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение недели, далее готовили фронтальные срезы толщиной 3 мм через область инфаркта. Для гистологического исследования выбирали срез с максимальным кратерообразным повреждением по типу «минус ткань», вырезали фрагменты по краю кратера размером 2×2 см (рис. 2). Полученные образцы помещали в кассеты, обрабатывали с помощью гистопроцессора АГОТ-1 (АО «Орион Медик», Россия) согласно инструкции завода-изготовителя по стандартному протоколу проводки через спирт-ксилол и готовили парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoDream EW (Milestone Medical, Италия). Образцы головного мозга интактных животных для гистологического исследования получали из области, соответствующей инфаркту у подопытных животных, в тот же день. Фронтальные парафиновые срезы мозга толщиной 5 мкм готовили с помощью ротационного микротомы HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым

синим по Нисслю, анилиновым синим по Массону, импрегнировали серебром по методу Бильшовского – Грос – Лаврентьева. Оцифрованные изображения гистологических препаратов получали с помощью микроскопа Zeiss Axio Scope.A1 (Zeiss, Германия). Морфометрический анализ проводили с использованием программы ImageJ (NIH, США).

Морфологический анализ проводили в пограничной с инфарктом области коры ГМ на расстоянии 1 мм и в периинфарктной реактивной области, прилегающей к пограничной на расстоянии 4 мм.

Окраска гематоксилином-эозином

Окрашивание срезов проводили по стандартному протоколу с помощью гематоксилина Эрлиха и спиртового раствора эозина, далее дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли и заключали в среду Витрогель (все препараты для окраски – ООО «БиоВитрум», Россия). Микроскопический анализ включал в себя оценку патологических изменений в пограничной и периинфарктной зонах ишемического повреждения коры ГМ: наличие и выраженность периваскулярного отека, некроза, кровоизлияний, лейкоцитарной инфильтрации.

Окраска толуидиновым синим по Нисслю

В 50 мл раствора толуидинового синего добавляли 2 мл модификатора окраски по Нисслю согласно инструкции изготовителя (ООО «БиоВитрум», Россия). В этот раствор погружали депарафинизированные препараты на 4 мин и дифференцировали в 96% уксуснокислом растворе этанола. Окрашенные препараты просветляли и заключали в среду Витрогель. Жизнеспособность нейронов оценивали по следующим признакам: размер клеток, сохранность плазматической мембраны, сохранность клеточного ядра и ядрышка, состояние тигроидного вещества, наличие патологических включений. Пикнотически измененные нейроны определяли по уменьшению размера клетки (сморщивание), гиперхромии и отсутствию клеточных структур. Подсчет пикнотических нейронов проводили относительно общего количества нервных клеток в пограничной и периинфарктной зонах по 0,3 мм² площади каждой. Данные представлены в виде медианы количества пикнотических нейронов [1 квартиль; 3 квартиль] на 100 нейронов.

Импregnация серебром по методу Бильшовского – Грос – Лаврентьева^{3,4}

Депарафинизированные срезы инкубировали в 20% растворе нитрата серебра в течение 60 мин, после чего препараты быстро проводили через 5 ванночек, наполненных 20% формалином на водопроводной воде, и помещали для импрегнации в заранее подготовленный рабочий раствор аммиачного серебра (1 мл 20% раствора нитрата серебра титровали 10% раствором аммиака до исчезновения осадка

³ Лаврентьев Б.И. Методика окраски нервных элементов по Бильшовскому в модификации Грос. Морфология автономной нервной системы. М.: Медгиз, 1946, издание 2-е, 244 с.

⁴ Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1957, 3-е изд., 476 с.

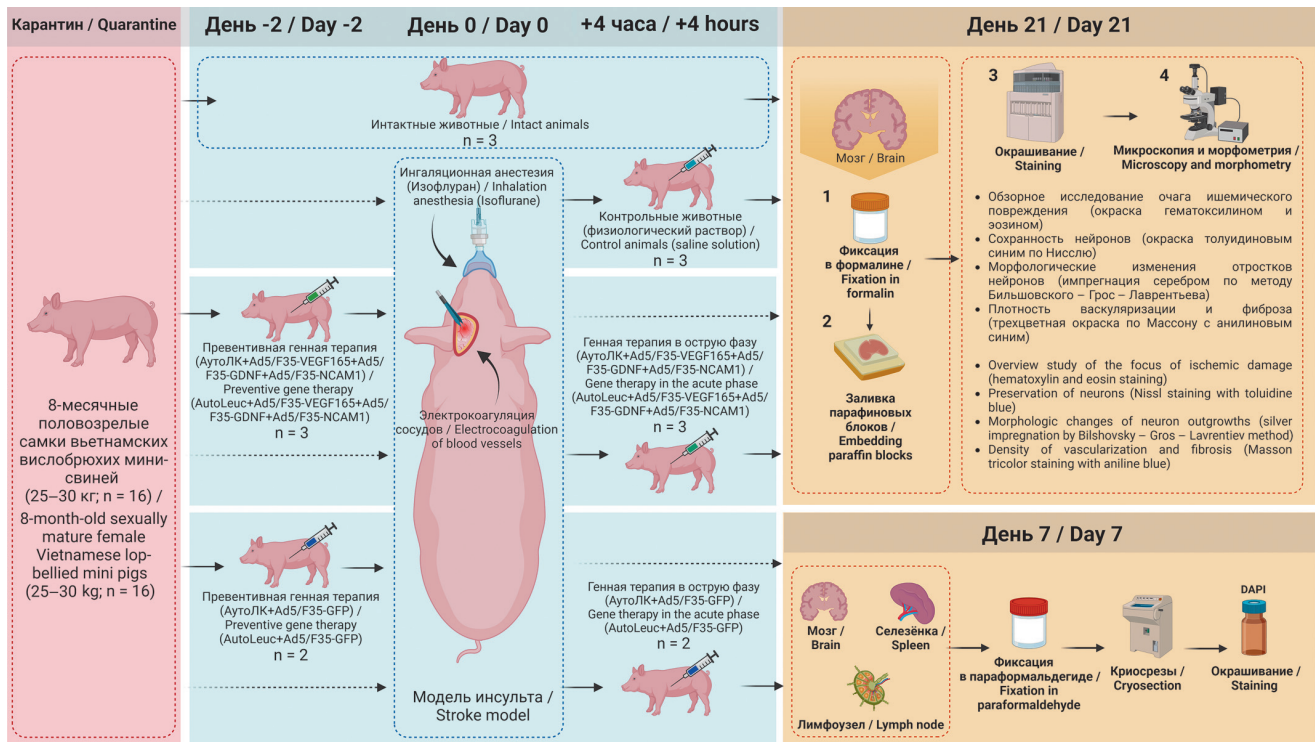


РИС. 1. Изучение влияния генетически модифицированного АутоЛК, введенного в разные периоды, на сохранность нервной ткани в области ишемического повреждения коры головного мозга. Эксперимент проведен на 4 группах мини-свиней (каждая по $n = 3$): интактная служила для сбора базовых показателей; контрольной вводили 30 мл физиологического раствора; группе превентивной генной терапии готовили и вводили АутоЛК, трансдуцированный Ad5/F35-VEGF165, Ad5/F35-GDNF и Ad5/F35-NCAM1 за 2 суток до моделирования инсульта; группе генной терапии в острой фазе готовили такой же АутоЛК за 14–16 ч до моделирования инсульта и вводили через 4 ч после операции через ушную вену. Через 21 сутки после моделирования инсульта с помощью гистологических методов окраски фронтальных парафиновых срезов изучали морфологические изменения в коре головного мозга.

Миграцию генетически модифицированных лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/F35-GFP, изучали в двух группах (каждая по $n = 2$): первой вводили препарат за 2 суток, второй через 4 часа после моделирования инсульта. Через неделю забирали головной мозг, селезенку и подмышечные лимфатические узлы для люминесцентной микроскопии.

Примечание: АутоЛК – аутологичный лейкоконцентрат; Ad5/F35 – chimeric adenoviral vector of 5 serotypes with fiber of serotype 35, химерный аденовирусный вектор 5 серотипа с фибром 35 серотипа; GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный нейротрофический фактор; NCAM – neural cell adhesion molecule, нейронная молекула клеточной адгезии; GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцирующий белок; VEGF – vascular endothelial growth factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста.

FIG. 1. Study of modified genetic AutoLeuc, introduced at different periods, for the preservation of nervous tissue in the area of ischemic damage to the cerebral cortex. The experiment was carried out on 4 groups of mini-pigs (each $n = 3$): the intact one served to collect basic indicators; the control group was injected with 30 ml of saline solution; the preventive gene therapy group was prepared and administered AutoLeuc with Ad5/F35-VEGF165, Ad5/F35-GDNF and Ad5/F35-NCAM1 2 days before stroke modeling; the acute phase gene therapy group was prepared with the same AutoLeuc 14–16 hours before stroke modeling and administered 4 hours after surgery through the ear vein. 21 days after stroke modeling morphological changes in the cerebral cortex were studied using histological methods of staining frontal paraffin sections.

The migration of genetically modified leukocytes transduced with Ad5/F35-GFP was studied in two groups (each $n = 2$): the first was administered within 2 days, the second 4 hours after stroke modeling. A week later, the brain, spleen, and mandibular lymph nodes were sampled for fluorescence microscopy.

Note: AutoLeuc – autologous leucoconcentrate; Ad5/F35 – chimeric adenoviral vector of 5 serotypes with fiber of serotype 35; GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor; NCAM – neural cell adhesion molecule; GFP – green fluorescent protein; VEGF – vascular endothelial growth factor.

оксида серебра). Срезы импрегнировали под визуальным контролем с помощью микроскопа в течение 5–10 мин, помещали на 15 мин в аммиачную воду, а затем на несколько часов в дистиллированную воду для промывки. Окрашенные препараты дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли и заключали в среду Витрогель.

Морфологическое исследование включало в себя оценку архитектуры коры, а также состояние нейронов и их отростков.

Трехцветная окраска по Массону с анилиновым синим.

Окрашивание препаратов проводили по следующему протоколу: на депарафинизированные срезы

наносили 8 капель рабочего раствора железного гематоксилина Вейгерта на 10 мин. После просушивания на срезы наносили по 6 капель спиртового раствора пикриновой кислоты на 4 мин, раствора кислого пунцового фуксина на 4 мин, затем раствора фосфорно-молибденовой кислоты на 10 мин – между реагентами срезы промывали в дистиллированной воде. Далее срезы подсушивали и на 5 мин наносили 6 капель раствора анилинового синего с последующей промывкой в дистиллированной воде, затем дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли и заключали в среду Витрогель. Микроскопический анализ препаратов включал выявление волокнистых структур для оценки выраженности соединительной ткани. Морфометрический анализ плотности васкуляризации проводили в пограничной и перинфарктной зонах ишемического повреждения коры ГМ на площади 1,5 мм² в каждой зоне методом подсчета количества капилляров (сосудов диаметром 5–10 мкм).

Люминесцентная микроскопия

Через неделю после внутривенной инфузии лейкоцитов, экспрессирующих ген *GFP*, у животных забирали головной мозг, селезенку и поднижнечелюстные лимфатические узлы. Образцы из левого (в области инфаркта) и соответствующей области правого полушарий, селезенки и лимфатических узлов фиксировали в 4% растворе параформальдегида, в целях криопротекции насыщали 30% раствором сахарозы, заливали в среду для замораживания тканей Neg 50 (Thermo Scientific, США) и готовили срезы толщиной 20 мкм на криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific, США). Полученные срезы для визуализации клеточных ядер инкубировали

в 10 мкг/мл раствора 4',6-диамидино-2-фенилиндоло (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) в фосфатно-солевом буфере (Sigma, США) и заключали в среду для защиты от выгорания флуоресценции Fluoroshield™ (Sigma Aldrich, США). Оцифрованные изображения получали с помощью люминесцентного микроскопа Zeiss Axioscope A1 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ

Описательные статистики представлены в виде медиан и интерквартильного размаха (25-й; 75-й процентиля). Для сравнения значений количественных переменных между группами применяли тест Краскела – Уоллиса. Для попарных межгрупповых сравнений использовали тест Данна, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ полученных данных проводили в среде для статистических вычислений R 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия)⁵.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обзорное исследование очага ишемического повреждения

На препаратах мозга у животных контрольной группы очаг ишемического повреждения имеет кратерообразную форму по типу «минус-ткань» (рис. 2).

На срезах ГМ, окрашенных гематоксилином и эозином, в прилегающей к области инфаркта мягкой мозговой оболочке видны реактивные изменения в виде лейкоцитарной инфильтрации, преимущественно мононуклеарной, фиброза и гемосидероза (рис. 3А). В пограничной зоне ишемического повреждения мозга отсутствуют нейроны, встречаются пенистые клетки и участки разрежения

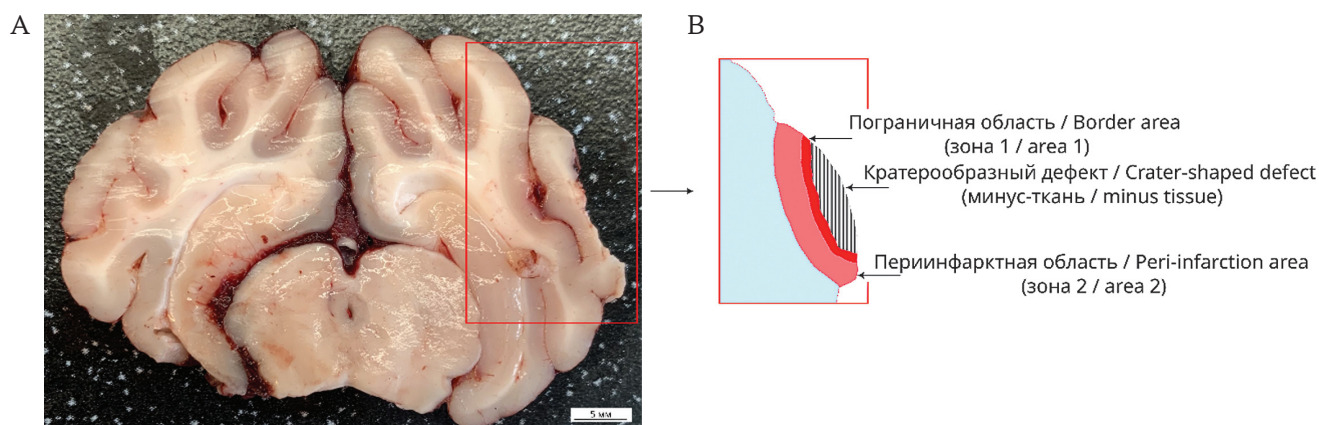


РИС. 2. Гистологическое исследование коры головного мозга у мини-свиньи через 21 сут после моделирования инсульта.

А. Фронтальный срез толщиной 3 мм через кратерообразное повреждение.

В. Схема гистологического среза с указанием зон исследования.

FIG. 2. Histological examination of the cerebral cortex in a mini-pig 21 days after a simulated stroke.

А. 3 mm thick coronal section through a crater-shaped lesion.

В. Scheme of a histological section indicating the areas of study.

⁵ Team R.C. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Published online 2022. <https://www.r-project.org/> (дата обращения: 12.10.2023).

с микрокистозными изменениями (рис. 3А). В сосудистом русле выявлены постнекротические явления с оголением сосудистого каркаса, микроциркуляторными расстройствами в виде сладжей, тромбов в капиллярах и экстравазаты. В поверхностных слоях коры обнаруживаются очаги деструкции с небольшой моноклеарной инфильтрацией, в перинфарктной зоне визуализируются выраженные изменения нейронов в виде: пикноза, гиперхромии, плохо различимых клеточных структур, а также отсутствия отростков (рис. 3А).

На микропрепаратах ГМ мини-свиней из группы генной терапии в острую фазу в пограничной зоне ишемического повреждения отмечаются менее выраженные очаги деструкции, нет существенных изменений микроциркуляторного русла и отсутствует лейкоцитарная инфильтрация. Обнаруживаются нейроны, во многих из которых визуализируются ядра, ядрышки, а также нейриты (рис. 3В). Патологические изменения в перинфарктной зоне не выражены.

В мозге животных из группы с превентивной генной терапией в пограничной с инфарктом зоне определяются единичные пикнотические нейроны

и минимальные микрокистозные изменения; нервная ткань перинфарктной зоны демонстрирует большую сохранность при сравнении с мозгом контрольной группы и группы на фоне генной терапии в острую фазу (рис. 3С).

Сохранность нейронов

В пограничной и перинфарктной зонах ишемического повреждения коры больших полушарий у мини-свиней из контрольной группы при окраске по Нисслю визуализируются нейроны с различными признаками дегенерации: вакуолизированной цитоплазмой, сморщенными пикнотическими ядрами, кариолизисом, субстанцией Ниссля либо мелкозернистой, либо не выраженной (рис. 4А), тогда как в обеих группах генной терапии тигроидное вещество сохранено в нейронах и пограничной, и перинфарктной зон (рис. 4В, С). Во всех экспериментальных группах в мозге встречаются нейроны с глиальным сателлитозом, свидетельствующим о повреждении нейронов.

Морфометрический анализ нейронов, подвергшихся пикнозу в перинфарктной зоне

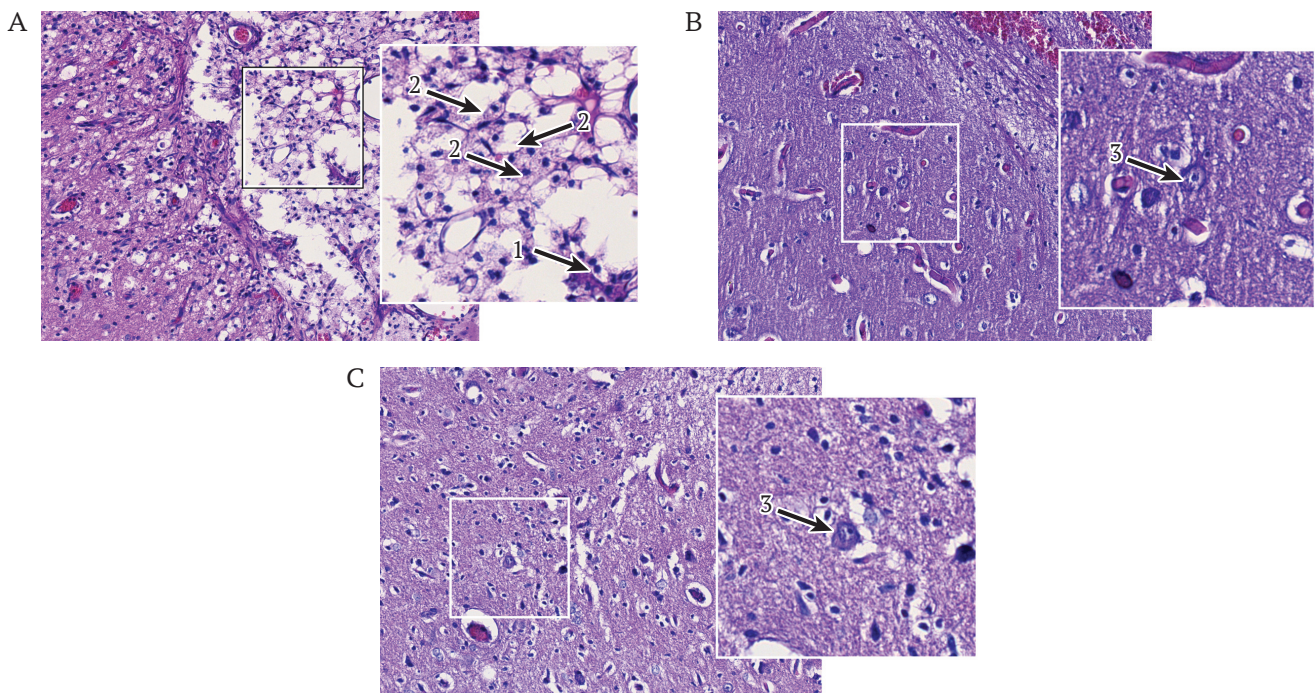


РИС. 3. Морфологические изменения в пограничной зоне ишемического повреждения коры головного мозга мини-свиней на 21 сут после моделирования инсульта. Окраска гематоксилином и эозином; ув. 200, на вставках ув. 400.

А. Контрольная группа.

В. Группа генной терапии в острую фазу.

С. Группа превентивной генной терапии.

Примечание: стрелки: 1 – оголение сосудистого каркаса; 2 – пенистые клетки; 3 – сохранные нейроны.

FIG. 3. Morphological changes in the border zone of ischemic brain injury of mini-pigs at 21 days after stroke modeling. Hematoxylin and eosin staining; magnification 200, in inserts magnification 400.

A. Control group.

B. Group of gene therapy in the acute phase.

C. Preventive gene therapy group.

Note: arrows: 1 – vascular framework denudation; 2 – foam cells; 3 – intact neurons.

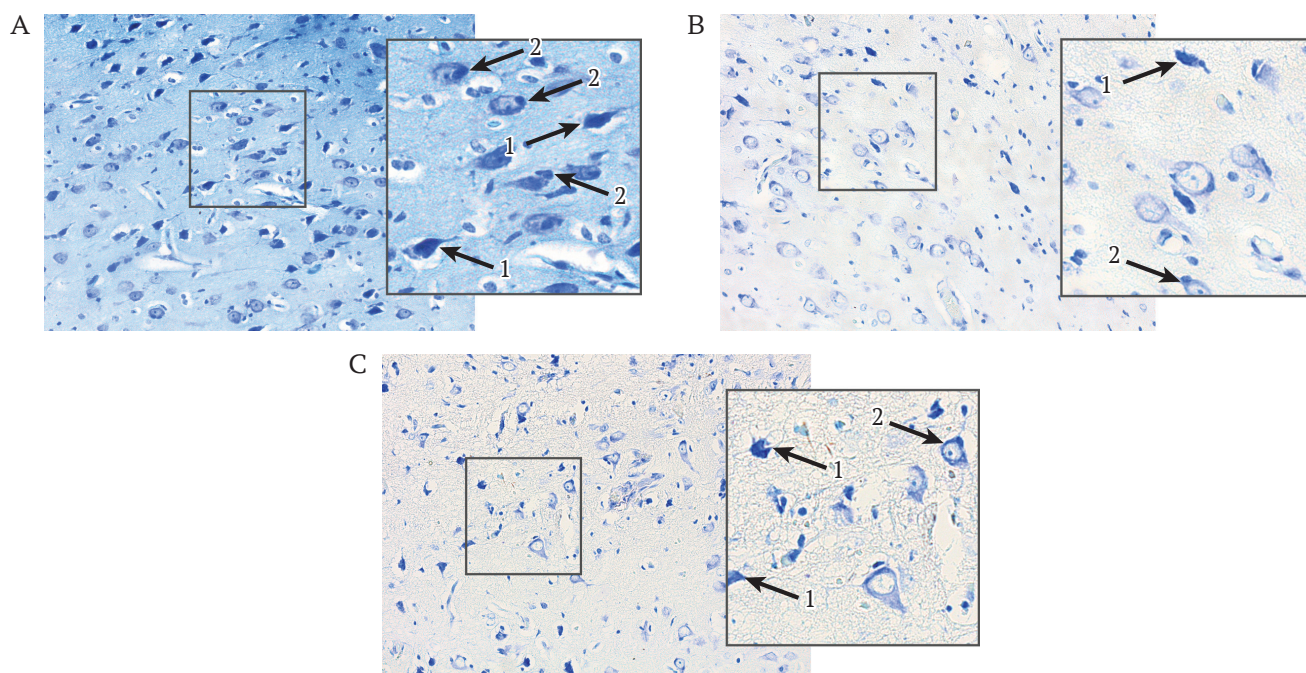


РИС. 4. Сохранность нейронов в периинфарктной зоне ишемического повреждения коры головного мозга мини-свиней через 21 сут после моделирования инсульта. Окрашивание толуидиновым синим по Нисслю; ув. 200, на вставках ув. 400.

А. Контрольная группа.

В. Группа генной терапии в острую фазу.

С. Группа превентивной генной терапии.

Примечание: стрелки: 1 – пикнотически измененные нейроны; 2 – глиальный сателлитоз.

FIG. 4. Preservation of neurons in the peri-infarct zone of ischemic brain injury of mini-pigs 21 days after stroke modeling. Nissl staining with toluidine blue; magnification 200, in inserts magnification 400.

A. Control group.

B. Group of gene therapy in the acute phase.

C. Preventive gene therapy group.

Note: arrows: 1 – pyknotic neurons; 2 – glial satellitosis.

ишемического повреждения ГМ экспериментальных мини-свиней, выявил их большее количество в контрольной группе – 49,5 (47,7; 52,9), при сравнении с группами генной терапии: в острую фазу – 31,1 (20,6; 36,36); $p = 0,0369$, и превентивной – 31,6 (29,5; 36,4); $p = 0,0526$. В пограничной зоне количество пикнотически измененных нейронов во всех экспериментальных группах не различалось и составило: в контрольной группе 81,0 (69,0; 87,2), в группе с генной терапией в острую фазу 47,0 (44,3; 52,7); $p = 0,1011$ при сравнении с контрольной группой, и в группе с превентивной генной терапией 64,3 (61,3; 76,1); $p = 0,8815$ при сравнении с контрольной группой.

Архитектура коры и морфология нейронов

На гистологических препаратах коры теменной области интактных животных, импрегнированных нитратом серебра, визуализируется характерная слоистая архитектура, включающая в себя молекулярный (плексиформный), наружный зернистый, наружный пирамидный, внутренний зернистый, внутренний пирамидный слои и слой полиморфных

клеток. Хорошо выражена сетчатая «войлокообразная» структура нервной ткани, обусловленная переплетениями тонких нейритов (рис. 5А).

У всех экспериментальных животных в пограничной зоне ишемического повреждения кора истончена, архитектура нарушена, отсутствует молекулярный слой. В периинфарктной зоне у контрольных животных, в отличие от терапевтических групп, слой наружных зернистых нейронов был истончен. Кроме того, в мозге контрольных животных во втором и третьем слоях наблюдались частичная фрагментация или отсутствие отростков нейронов, фрагментированные нервные отростки имели извитый ход (рис. 5В). В мозге мини-свиней терапевтических групп от нейронов отходили сохраненные прямые отростки (рис. 5С, D). Выраженная гиперхромия преимущественно затрагивала нейроны в наружных зернистом и пирамидном слоях во всех трех группах животных с инсультом. Однако нервная ткань у мини-свиней из терапевтических групп имела «войлокообразную» текстуру, соответствующую таковой у интактных животных (рис. 5А, В, С).

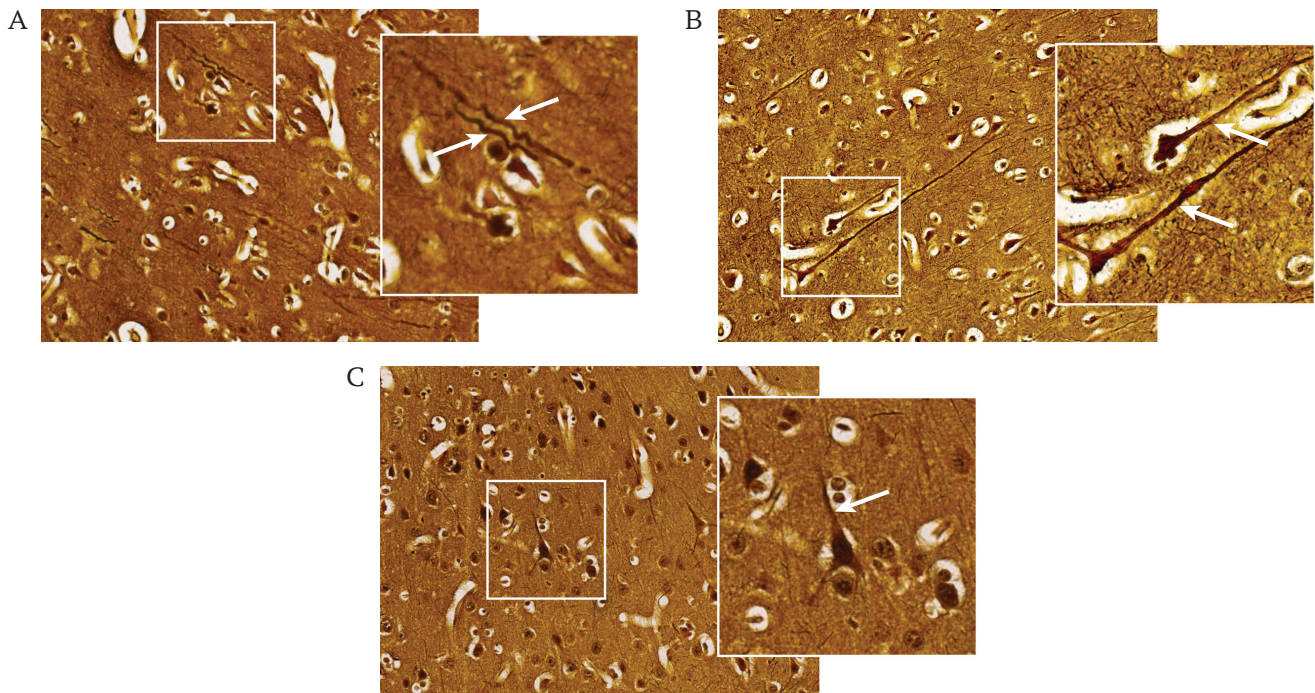


РИС. 5. Морфология отростков нейронов в периинфарктной зоне ишемического повреждения головного мозга мини-свиней через 21 сут после моделирования инсульта. Импрегнация серебром по Бильшовскому – Грос – Лаврентьеву; ув. 200, на вставках ув. 400.

А. Контрольная группа.

В. Группа генной терапии в острую фазу.

С. Группа превентивной генной терапии.

Примечание: стрелками отмечены отростки нейронов.

FIG. 5. Morphology of neuronal outgrowths in the peri-infarct zone of ischemic brain injury of mini-pigs 21 days after stroke modeling. Silver impregnation according to Bilshovsky – Gros – Lavrentiev; magnification 200, in inserts magnification 400.

A. Control group.

B. Group of gene therapy in the acute phase.

C. Preventive gene therapy group.

Note: arrows indicate neuronal outgrowths.

Васкуляризация коры в области ишемического повреждения мозга

На гистологических препаратах, окрашенных по Массону (рис. 6А–С), в пограничной и периинфарктной зонах вокруг очага инфаркта у всех экспериментальных животных стенки мелких сосудов утолщены и слоисты. Вокруг сосудов визуализируются периваскулярные соединительнотканые волокна. Морфометрический анализ количества сосудов диаметром 5–10 мкм в периинфарктной зоне выявил значимое увеличение содержания капилляров у мини-свиней в группе с превентивной генной терапией – 14,5 (14,3; 15,1), при сравнении с интактной группой – 10,3 (9,8; 11,1); $p = 0,0415$, и контрольной группой – 9,0 (8,3; 10,5); $p = 0,0127$. У животных группы генной терапии в острую фазу количество капилляров в этой зоне составило 12,8 (10,2; 13,4) и не отличалось от аналогичных данных у группы с превентивной генной терапией, $p = 0,1129$.

Миграция генетически модифицированных лейкоцитов после внутривенной инфузии

Флуоресцентная микроскопия препаратов селезенки и поднижнечелюстных лимфатических узлов экспериментальных животных после внутривенной инфузии АутоЛК, несущего репортерный ген *GFP*, до и после моделирования инсульта обнаружила лейкоциты со специфическим зеленым свечением. Ранее нами было показано присутствие генетически модифицированных клеток в периинфарктной области в левом полушарии мозга подопытных животных [14], в правом полушарии *GFP*-позитивные клетки не обнаружены. Результаты микроскопии демонстрируют, что после внутривенной инфузии лейкоциты с *Ad5/35-GFP* выселяются из кровотока в область ишемического повреждения коры ГМ и органы иммунной защиты и синтезируют рекомбинантный белок *GFP*.

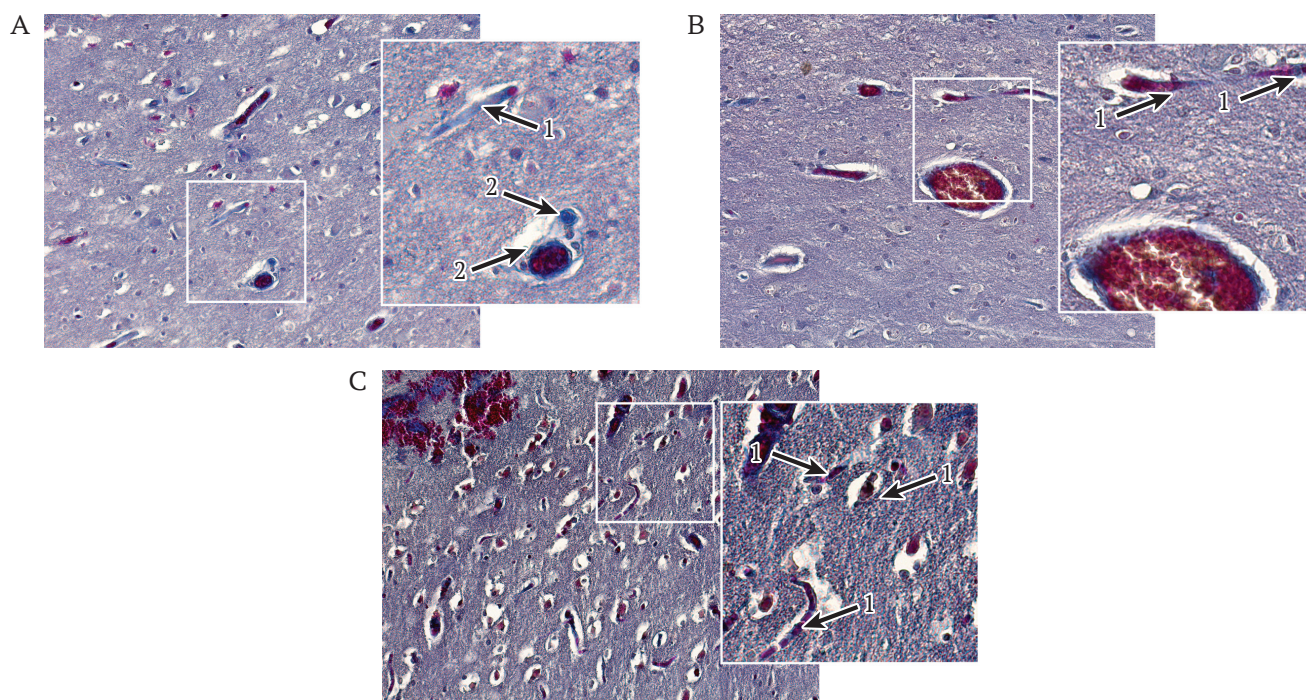


РИС. 6. Плотность капилляров в периинфарктной зоне ишемического повреждения головного мозга мини-свиней через 21 сут после моделирования инсульта. Окрашивание по Массону; ув. 200, на вставках ув. 400.

А. Контрольная группа.

В. Группа генной терапии в острую фазу.

С. Группа превентивной генной терапии.

Примечание: стрелки: 1 – капилляры; 2 – фиброз сосудистой стенки.

FIG. 6. Capillary density in the peri-infarct zone of ischemic brain injury of mini-pigs 21 days after stroke modeling. Masson staining; magnification 200, in inserts magnification 400.

A. Control group.

B. Group of gene therapy in the acute phase.

C. Preventive gene therapy group.

Note: arrows: 1 – capillaries; 2 – vascular fibrosis.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при изучении мозга мини-свиней было показано положительное влияние генной терапии на ремоделирование нейроглии и экспрессию синаптических белков в нейронах периинфарктной области мозга путем введения АутоЛК, обогащенного генами *VEGF165*, *GDNF*, *NCAM1*, как в острую фазу инсульта, так и превентивно [14].

В данном исследовании также был смоделирован ишемический инсульт у мини-свиней – на 21-й день при иммунофлуоресцентном исследовании периинфарктной области выявлен апоптоз клеток; увеличение доли микроглии и астроцитов, ответственных за формирование глиального рубца; уменьшение доли миелинообразующих олигодендроглиальных клеток; снижение экспрессии синаптических белков в нервных клетках. При этом в условиях генной терапии АутоЛК, обогащенным генами *VEGF165*, *GDNF*, *NCAM1*, в острую фазу через 4 часа после инсульта и превентивно за 2 суток до инсульта в коре ГМ животных в обеих терапевтических группах были продемонстрированы: (1) уменьшение объема инфаркта и уменьшение доли

апоптотических клеток; (2) сдерживание формирования глиального рубца; (3) увеличение количества миелинообразующих клеток. Ранее нами было косвенно подтверждено восстановление функциональной активности нейронов на основании уровня экспрессии белка синаптических пузырьков синаптофизина и белка постсинаптической плотности (PSD95) [14].

В представленном исследовании получены дополнительные доказательства положительного влияния рекомбинантных молекул *VEGF165*, *GDNF* и *NCAM1* на восстановление нервной ткани в области ишемического повреждения мозга. В мозге животных обеих терапевтических групп в периинфарктной зоне, соответствующей ишемической полутени, выявлено меньше деструктивных изменений и большее количество жизнеспособных нейронов с сохраненными нейритами, а также более высокая плотность капилляров, чем в группе инсульта без лечения.

Данные о способности генетически модифицированных лейкоцитов, обогащенных генами *VEGF165*, *GDNF*, *NCAM1*, мигрировать из кровотока через нарушенный гематоэнцефалический барьер в область

ишемического повреждения мозга и положительно влиять на ремоделирование нервной ткани дают основание полагать, что они локально продуцируют молекулы VEGF165, GDNF и NCAM1, которые по паракринному механизму сдерживают развитие последствий инсульта в области ишемической полутени. Положительное влияние VEGF165, GDNF и NCAM1 основано на их нейропротекторном действии [19–21], ангиогенных эффектах [19] и свойстве обеспечить миграцию генетически модифицированных лейкоцитов в область инфаркта мозга и выживание в ней [22].

Внутривенная инфузия АутоЛК, обогащенного рекомбинантными генами VEGF165, GDNF и NCAM1, оказывает положительное действие на постишемическую регенерацию мозга мини-свиней в области пенумбры. При этом продукция рекомбинантных молекул VEGF165, GDNF и NCAM1 генетически модифицированными лейкоцитами после их внутривенного введения продолжается не менее 3 недель [17], что соответствует острому периоду инсульта.

Ограничения исследования

При разработке принципов генной терапии для сдерживания дегенеративных процессов и стимулирования регенерации в ЦНС при травмах, ишемических инсультах и нейродегенеративных заболеваниях используются гены, кодирующие различные цитокины и их комбинации, с доказанной в эксперименте эффективностью [23]. При этом в практическую медицину пока не введен ни один одобренный для лечения заболеваний ЦНС генотерапевтический препарат [24]. Ограничения связаны как с подбором терапевтических генов, так и с вектором доставки для конкретной нозологии – согласно характеру заболевания, воздействию на этиологические, патогенетические или симптоматические аспекты, ожидаемому результату.

Результаты настоящего исследования следует считать пилотными из-за ограниченного количества животных и данных, полученных только на самках мини-свиней. Кроме того, представленные выводы основаны на однократном введении генетически модифицированного АутоЛК с комбинацией генов VEGF165, GDNF и NCAM1 в составе химерного аденовирусного вектора Ad5/35 в единственной дозе. Функциональное восстановление животных после экспериментального инсульта на фоне генной

терапии позволит комплексно оценить данные поведенческих тестов наряду с морфологическими изменениями в головном мозге.

Тот факт, что генетически модифицированные лейкоциты мини-свиней способны мигрировать в область ишемического повреждения мозга, заселять органы иммунной системы и продуцировать рекомбинантные VEGF, GDNF и NCAM *in vitro* [25], предполагает необходимость исследовать секрецию и распространение этих терапевтических молекул *in situ* для установления механизма их действия.

Направления для дальнейших исследований

Вопросы оптимизации трансдукции лейкоконцентрата с помощью комбинации химерных аденовирусных векторов Ad5/35-VEGF165, Ad5/35-GDNF и Ad5/35-NCAM1, объема и кратности введения животным, фармакокинетики, возможных побочных эффектов требуют дополнительных исследований для инициирования комплексных доклинических испытаний. Кроме того, в практической медицине для превентивной генной терапии ишемического инсульта сроки приготовления АутоЛК, обогащенного терапевтическими генами, не так критичны, как для его использования в острую фазу. В этой связи необходимы дальнейшие исследования по решению задачи получения персонализированного генно-клеточного препарата в пределах времени терапевтического окна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования согласуются с полученными ранее данными о положительном влиянии АутоЛК, обогащенного рекомбинантными генами VEGF165, GDNF и NCAM1, на регенерацию нервной ткани в области ишемической полутени мозга у мини-свиней. Через 21 сутки после моделирования инсульта у животных на фоне превентивной генной терапии или генной терапии в острую фазу инсульта установлена лучшая сохранность нейронов и большая плотность кровеносных капилляров в перинфарктной зоне ишемического повреждения мозга. Сведения о миграции генетически модифицированных лейкоцитов и их способности продуцировать рекомбинантный белок дают основание полагать, что терапевтические молекулы VEGF165, GDNF и NCAM1 по паракринному механизму оказывают положительное влияние на жизнеспособность и морфологию нервных клеток, а также на рост кровеносных сосудов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Zufar Z. Safiulloev, Vage A. Markosyan, Alina R. Siraeva, Sultan S. Targachev – participation in material collection. Andrey A. Izmailov, Alexander E. Khomyakov, Vage A. Markosyan – morphological studies. Nataliya V. Boychuk – statistical processing. Rustem R. Islamov – research idea, formulation of aim and objectives. Maria V. Nigmatzyanova, Victor V. Valiullin, Rustem R. Islamov, Vadim I. Pospelov – manuscript writing. All authors approved the final version of the article.

ВКЛАД АВТОРОВ

З.З. Сафиулов, В.А. Маркосян, А.Р. Сираева, С.С. Таргачев – участие в сборе материала. А.А. Измайлов, А.Е. Хомяков, В.А. Маркосян – морфологические исследования. Н.В. Бойчук – статистическая обработка. Р.Р. Исламов – идея исследования, формулировка цели и задач. М.В. Нигметзянова, В.В. Валиуллин, Р.Р. Исламов, В.И. Поспелов – написание рукописи. Все авторы утвердили окончательную версию статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Saini V., Guada L., Yavagal D.R. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions. *Neurology*. 2021 Nov 16; 97(20 Suppl 2): S6–S16. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012781>. PMID: 34785599
- Campbell B.C., De Silva D.A., Macleod M.R., et al. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Prim*. 2019 Oct 10; 5(1): 70. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>. PMID: 31601801
- Чикризова Е.А., Коломиец Т.В., Зерчанинова Е.И. Современные методы лечения ишемических инсультов и их осложнения. Тенденции развития науки и образования. 2022; 86(3): 121–125. <https://doi.org/10.18411/trnio-06-2022-122> / Chikrizova E.A., Kolomiets T.V., Zerchaninova E.I. Current methods of treatment of ischemic strokes and their complications. *Trends in the development of science and education*. 2022; 86(3): 121–125. <https://doi.org/10.18411/trnio-06-2022-122>
- Кудрявцева В.А., Кузьмин Е.А., Моисеева А.В. и др. Молекулярные и морфологические маркеры гибели нейронов при острых нарушениях мозгового кровообращения. *Сеченовский вестник*. 2022; 13(4): 18–32. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2022.13.4.18-32> / Kudryavtseva V.A., Kuzmin E.A., Moiseeva A.V., et al. Molecular and morphological markers of neuronal death in acute cerebrovascular accidents. *Sechenov Medical Journal*. 2022; 13(4): 18–32. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2022.13.4.18-32>
- Hasan T.F., Hasan H., Kelley R.E. Overview of acute ischemic stroke evaluation and management. *Biomedicine*. 2021 Oct 16; 9(10): 1486. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9101486>. PMID: 34680603; PMCID: PMC8533104
- Lavrov I., Islamov R. Implementing principles of neuroontogenesis and neuroplasticity for spinal cord injury therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022 May 19; 27(5): 163. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2705163>. PMID: 35638430
- Kuriakose D., Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 15; 21(20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>. PMID: 33076218; PMCID: PMC7589849
- Puhl D.L., D'Amato A.R., Gilbert R.J. Challenges of gene delivery to the central nervous system and the growing use of biomaterial vectors. *Brain Res Bull*. 2019 Aug; 150: 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.024>. Epub 2019 Jun 5. PMID: 31173859; PMCID: PMC8284997
- Craig A.J., Housley G.D. Evaluation of gene therapy as an intervention strategy to treat brain injury from stroke. *Front Mol Neurosci*. 2016; 9: 34. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00034>. PMID: 27252622; PMCID: PMC4877374
- Alfonsetti M., d'Angelo M., Castelli V. Neurotrophic factor-based pharmacological approaches in neurological disorders. *Neural Regen Res*. 2023 Jun; 18(6): 1220–1228. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.358619>. PMID: 36453397; PMCID: PMC9838155
- Rhim T., Lee M. Targeted delivery of growth factors in ischemic stroke animal models. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016; 13(5): 709–723. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1144588>. Epub 2016 Feb 6. PMID: 26788902
- Parambi D.G.T., Alharbi K.S., Kumar R., et al. Gene therapy approach with an emphasis on growth factors: theoretical and clinical outcomes in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*. 2022 Jan; 59(1): 191–233. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02555-y>. Epub 2021 Oct 15. PMID: 34655056; PMCID: PMC8518903
- Gan Y., Jing Z., Stetler R.A., Cao G. Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan 1; 5(1): 188–203. <https://doi.org/10.2741/e607>. PMID: 23276981; PMCID: PMC5516729
- Safiullov Z., Izmailov A., Sokolov M., et al. Autologous genetically enriched leucoconcentrate in the preventive and acute phases of stroke treatment in a mini-pig model. *Pharmaceutics*. 2022 Oct 17; 14(10): 2209. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102209>. PMID: 36297644; PMCID: PMC9611398
- Melià-Sorolla M., Castaño C., Degregorio-Rocasolano N., et al. Relevance of porcine stroke models to bridge the gap from pre-clinical findings to clinical implementation. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 8; 21(18): 6568. <https://doi.org/10.3390/ijms21186568>. PMID: 32911769; PMCID: PMC7555414
- Bonkhoff A.K., Schirmer M.D., Bretzner M., et al. Outcome after acute ischemic stroke is linked to sex-specific lesion patterns. *Nat Commun*. 2021 Jun 2; 12(1): 3289. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23492-3>. PMID: 34078897; PMCID: PMC8172535
- Seregin S.S., Amalfitano A. Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Dec; 9(12): 1521–1531. <https://doi.org/10.1517/14712590903307388>. PMID: 19780714
- Маркосян В.А., Измайлов А.А., Соколов М.Е. и др. Модель мелкоочагового ишемического инфаркта головного мозга как основа для разработки новых методов терапии инсульта. *Казанский Медицинский Журнал*. 2023; 104(2): 242–248. <https://doi.org/10.17816/KMJ112404> / Markosyan V.A., Izmailov A.A., Sokolov M.E., et al. Model of small-focal ischemic cerebral infarction as a basis for the development of new methods of stroke therapy. *Kazan Medical Journal*; 2023; 104(2): 242–248. <https://doi.org/10.17816/KMJ112404>
- Simoes Braga Boisserand L., Bouchart J., Geraldo L.H., et al. VEGF-C promotes brain-derived fluid drainage, confers neuroprotection, and improves stroke outcomes. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. [Preprint]. 2023 May 30 <https://doi.org/10.1101/2023.05.30.542708>. PMID: 37398128; PMCID: PMC10312491.
- Cintrón-Colón A.F., Almeida-Alves G., Boynton A.M., et al. GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons. *Cell Tissue Res*. 2020 Oct; 382(1): 47–56. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03287-6>. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32897420; PMCID: PMC7529617
- Miguel-Hidalgo J.J. Neuroprotective astroglial response to neural damage and its relevance to affective disorders. *Explor neuroprotective Ther*. 2023; 3(5): 328–345. <https://doi.org/10.37349/ent.2023.00054>. Epub 2023 Oct 31. PMID: 37920189; PMCID: PMC10622120
- Сафиуллов З.З., Гаранина Е.Е., Измайлов А.А. и др. Адресная миграция и выживание генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека после трансплантации G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза. *Гены и клетки*. 2015; 10(4): 86–89. <https://doi.org/10.23868/gc120519> / Safiullov Z.Z., Garanina E.E., Izmailov A.A., et al. Homing and survivability of genetically modified mononuclear umbilical cord blood cells after transplantation into transgenic G93A mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Genes & Cells*. 2015; 10(4): 86–89. <https://doi.org/10.23868/gc120519>
- Zhao Y., Zhang X., Chen X., Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: from mechanisms to treatment (Review). *Int J Mol Med*. 2022 Feb; 49(2): 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34878154; PMCID: PMC8711586

24. Ekkert A., Šliachtenko A., Grigaitė J., et al. Ischemic stroke genetics: what is new and how to apply it in clinical practice? *Genes* (Basel). 2021 Dec 24; 13(1): 48. <https://doi.org/10.3390/genes13010048>. PMID: 35052389; PMCID: PMC8775228

25. Islamov R., Bashirov F., Izmailov A., et al. New therapy for spinal cord injury: autologous genetically-enriched leucoconcentrate integrated with epidural electrical stimulation. *Cells*. 2022 Jan 2; 11(1): 144. <https://doi.org/10.3390/cells11010144>. PMID: 35011706; PMCID: PMC8750549

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сафиуллов Зуфар Зуфарович, канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной анатомии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4577-3448>

Измайлов Андрей Александрович✉, канд. мед. наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-4636>

Маркосян Ваге Аршалуйсович, канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>

Хомяков Александр Евгеньевич, врач-патологоанатом, научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной медицины ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5032-2599>

Бойчук Наталья Валентиновна, канд. биол. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-7619-0750>

Нигметзянова Мария Владимировна, канд. биол. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6731-4041>

Сираева Алина Рафаиловна, студентка ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-3510>

Таргачев Султан Субханвердиевич, ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5123-6062>

Валиуллин Виктор Владимирович, д-р биол. наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-6373>

Исламов Рустем Робертович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6632-4636>

Поспелов Вадим Игоревич, профессор, научный руководитель ООО «Импульс жизни».

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7369-5850>

Zufar Z. Safiullov, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Anatomy, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4577-3448>

Andrey A. Izmailov✉, Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-4636>

Vage A. Markosyan, Cand. of Sci. (Medicine), Senior Lecturer, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3789-0284>

Alexander E. Khomyakov, pathologist, Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Medicine, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5032-2599>

Nataliya V. Boychuk, Cand. of Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-7619-0750>

Maria V. Nigmatzyanova, Cand. of Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6731-4041>

Alina R. Siraeva, student, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-3510>

Sultan S. Targachev, Assistant Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5123-6062>

Victor V. Valiullin, Dr. of Sci. (Biology), Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-6373>

Rustem R. Islamov, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6632-4636>

Vadim I. Pospelov, Professor, Scientific Director of «Impulse of Life» LLC.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7369-5850>

✉ Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



Модель смерти мозга с постепенной индукцией как основа для экспериментальных исследований донорских органов

П.А. Ермолаев[✉], Т.П. Храмых, А.С. Вяльцин, Л.О. Барская

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России

ул. Ленина, д. 12, г. Омск, 644099, Россия

Аннотация

Цель. Апробировать в эксперименте патогенетически адекватную модель смерти мозга вследствие повышения внутричерепного давления с постепенной индукцией, позволяющую оценивать изменения, развивающиеся в органах потенциального донора.

Материалы и методы. 6–8-месячных беспородных крыс-самцов экспериментальной группы ($n = 18$) и контрольной группы ($n = 8$) наркотизировали, катетеризировали левую общую сонную артерию для регистрации систолического, диастолического артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС), рассчитывали среднее АД (АДср.). После перевода на искусственную вентиляцию легких в экспериментальной группе моделировали смерть мозга по разработанной методике.

Результаты. У всех животных в экспериментальной группе через 30 мин от начала эксперимента констатирована смерть мозга, в течение 3 ч вследствие прогрессирования недостаточности кровообращения погибло 10 крыс (56%). Исходно у наркотизированных животных АДср. составило 101 (90; 105) мм рт. ст., ЧСС 310 (297; 315) уд./мин. Через 5 мин от начала индукции смерти мозга АДср. повысилось до 147 (140; 150) мм рт. ст. ($p = 0,01$), ЧСС до 396 (384; 406) уд./мин ($p = 0,03$), затем в течение 20 мин АДср. постепенно снижалось до 94 (90; 100) мм рт. ст., ЧСС до 290 уд./мин. С 26 до 90 мин АДср. стабилизировалось на уровне 87–92 мм рт. ст., ЧСС от 263 до 274 уд./мин ($p = 0,01$), далее через 120–150 мин АДср. продолжало снижаться до 75–80 мм рт. ст. ($p = 0,03$), ЧСС до 256–264 уд./мин ($p = 0,01$). К завершению эксперимента, несмотря на волеическую поддержку, у животных продолжалось снижение АДср. до 64 (61; 67) мм рт. ст. ($p = 0,02$), усугублялась брадикардия до 250 (248; 260) уд./мин ($p = 0,01$), что свидетельствует о развитии декомпенсации гемодинамических расстройств.

Закключение. Апробация модели смерти мозга потенциального донора с постепенной индукцией на беспородных крысах показала себя патогенетически адекватной и позволяющей оценивать состояние потенциальных донорских органов в течение 3 ч после индукции смерти мозга.

Ключевые слова: внутричерепное давление; донор; гемодинамика; эксперимент; биомодель; трансплантация органов

Рубрики MeSH:

МОЗГА ГОЛОВНОГО СМЕРТЬ – ПАТОЛОГИЯ

МОЗГА ГОЛОВНОГО СМЕРТЬ – ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

ДОНОРЫ ТКАНЕЙ

МОДЕЛИ НА ЖИВОТНЫХ

Для цитирования: Ермолаев П.А., Храмых Т.П., Вяльцин А.С., Барская Л.О. Модель смерти мозга с постепенной индукцией как основа для экспериментальных исследований донорских органов. Сеченовский вестник. 2024; 15(2): 28–35. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.28-35>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Ермолаев Павел Александрович, канд. мед. наук, ассистент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Адрес: ул. Ленина, д. 12, г. Омск, 644099, Россия

E-mail: yermol@inbox.ru

Соответствие принципам этики. Исследование проведено с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей. Все манипуляции с животными

проведены в соответствии с разрешением Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (№ 4-24.11.2023).

Доступ к данным исследования. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у авторов по обоснованному запросу.

Данные и статистические методы, представленные в статье, прошли статистическое рецензирование редактором журнала – сертифицированным специалистом по биостатистике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки (собственные ресурсы).

Поступила: 16.04.2024

Принята: 29.05.2024

Дата печати: 15.07.2024

A brain death model with slow induction for experimental studies of organ donation

Pavel A. Ermolaev[✉], Tatyana P. Khramykh, Alexey S. Vyaltzin, Lyubov O. Barskaya

*Omsk State Medical University
12, Lenin str., Omsk, 644099, Russia*

Abstract

Aim. To test in experiment a pathogenetically adequate model of brain death due to increased intracranial pressure with gradual induction, allowing the evaluation of the changes occurring in the organs of a potential donor.

Materials and methods. 6–8 months old outbred male rats of the experimental group ($n = 18$) and the control group ($n = 8$) were anesthetized, the left common carotid artery was catheterized to record systolic, diastolic blood pressure (BP) and heart rate (HR), the mean BP (MBP) was calculated. After transfer to artificial ventilation, brain death was simulated in the experimental group using the developed method.

Results. All animals in the experimental group suffered brain death 30 minutes from the start of the experiment; 10 rats (56%) died within 3 hours due to progression of circulatory failure. Initially, in anesthetized animals, MBP was 101 (90; 105) mm Hg, HR 310 (297; 315) beats/min. After 5 minutes from the start of brain death induction, MBP increased to 147 (140; 150) mm Hg ($p = 0.01$), HR to 396 (384; 406) beats/min ($p = 0.03$). Further, within 20 minutes there was a decrease in MBP to 94 (90; 100) mm Hg and HR to 290 beats/min. During the observation period from 26 to 90 minutes, there was a stabilization of MBP at the level of 87–92 mm Hg, there was a tendency to bradycardia with HR from 263 to 274 beats/min ($p = 0.01$). Then after 120–150 minutes from the beginning of brain death induction, MBP continued to decrease to 75–80 mmHg ($p = 0.03$), HR to 256–264 beats/min ($p = 0.01$). At the end of the experiment, despite volemic support, MBP decreased to 64 (61; 67) mm Hg ($p = 0.02$), bradycardia worsened with HR to 250 (248; 260) beats/min ($p = 0.01$), indicating the hemodynamic decompensation.

Conclusion. The results of experimental testing of an animal brain death model on outbred rats showed that this model is pathogenetically adequate and useful to assess the condition of potential donor organs within 3 hours after the induction of brain death.

Keywords: intracranial pressure; donor; hemodynamics; experiment; animal model; organ transplantation

MeSH terms:

BRAIN DEATH – PATHOLOGY

BRAIN DEATH – PHYSIOPATHOLOGY

TISSUE DONORS

MODELS, ANIMAL

For citation: Ermolaev P.A., Khramykh T.P., Vyaltzin A.S., Barskaya L.O. A brain death model with slow induction for experimental studies of organ donation. Sechenov Medical Journal. 2024; 15(2): 28–35. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.28-35>

CONTACT INFORMATION:

Pavel A. Ermolaev, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Omsk State Medical University.

Address: 12, Lenin str., Omsk, 644099, Russia
E-mail: yermol@inbox.ru

Ethics statements. The study complies with the standards of the EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. All manipulations with animals were approved by the Local Bioethics Committee of the Omsk State Medical University, No. 4 of 24.11.2023.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Data and statistical methods used in the article were examined by a professional biostatistician on the Sechenov Medical Journal editorial staff.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was not sponsored (own resources).

Received: 16.04.2024

Accepted: 29.05.2024

Date of publication: 15.07.2024

Список сокращений:

АДср. – среднее артериальное давление
ВЧД – внутричерепное давление

ИВЛ – искусственная вентиляция легких
ЦНС – центральная нервная система
ЧСС – частота сердечных сокращений

Трансплантация органов остается «золотым стандартом» лечения пациентов с терминальной стадией недостаточности сердца, легких, печени и почек [1]. В подавляющем большинстве случаев источником для трансплантации органов являются доноры со смертью мозга вследствие необратимого ишемического, геморрагического или травматического повреждения центральной нервной системы (ЦНС). Смерть мозга вызывает в организме потенциального донора каскад различных гемодинамических, эндокринных и воспалительных реакций, которые оказывают повреждающее действие различной степени выраженности на морфофункциональное состояние трансплантатов [2].

Известен ряд экспериментальных моделей для исследования влияния смерти мозга на состояние донорских органов [3, 4]. В большинстве этих моделей смерть мозга развивается вследствие повышения внутричерепного давления (ВЧД) при раздувании баллона, помещенного в полость черепа. Принципиально данную модель смерти мозга вследствие повышения ВЧД можно разделить на две категории: с быстрой (sudden onset model) или постепенной (gradual onset model) индукцией. В случае быстрой индукции ВЧД повышают в течение 30–60 сек, что сопровождается высокой летальностью экспериментальных животных из-за выраженной сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности. При постепенной индукции ВЧД повышают медленно в течение 5–20 мин, в результате достигается относительная стабилизация системной гемодинамики без потребности во введении инотропных препаратов в течение нескольких часов.

Наиболее известен способ моделирования смерти мозга у мелких лабораторных животных путем трепанации черепа, введения в субдуральное пространство и последующего раздувания баллонного

катетера Фогарти 14G, что вызывает необратимое механическое повреждение головного мозга [5]. К недостаткам этого способа моделирования смерти мозга можно отнести необходимость проведения оперативного вмешательства в виде трепанации черепа с помощью специальных хирургических инструментов (микрохирургическая дрель, сверло, баллонный катетер), а также возможные технические сложности, связанные с проведением баллонного катетера в полость черепа через отверстие в кости размером 1×1 мм, что значительно снижает воспроизводимость модели и удорожает ее исполнение.

Цель исследования: апробировать в эксперименте патогенетически адекватную модель смерти мозга вследствие повышения ВЧД с постепенной индукцией, позволяющую оценивать изменения, развивающиеся в органах потенциального донора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биомодели были выбраны 6–8-месячные половозрелые беспородные крысы-самцы массой 250–300 г ($n = 32$). Эксперименты были проведены на кафедрах топографической анатомии и оперативной хирургии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России с соблюдением требований Европейской конвенции по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации (Страсбург, 1986) и соответствовало требованиям международных рекомендаций ARRIVE [6]. Минимальное достаточное количество экспериментальных животных в группе, необходимое для получения достоверных результатов, было рассчитано по формуле F. Lopez-Jimenez и соавт. [7] и составило 8 особей.

Эксперимент проводили по разработанному нами способу [8]. С учетом апробации модели острого эксперимента и прогнозируемой высокой летальности в экспериментальную группу вошли 24 животных. Всех крыс экспериментальной и контрольной ($n = 8$) групп наркотизировали 10% диэтиловым эфиром (ООО ПХФК «Медхимпром», Россия), катетеризировали левую общую сонную артерию для регистрации систолического и диастолического артериального давления, частоты сердечных сокращений (ЧСС), рассчитывали среднее артериальное давление (АДср.) по формуле $\text{АДср.} = \text{АД диастолическое} + 1/3 (\text{АД систолическое} - \text{АД диастолическое})$. Далее осуществляли им интубацию трахеи и переводили животных на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ). Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Для моделирования смерти мозга (точка 0) в положении животного лежа на животе пальпировали наружный затылочный выступ (*protuberantia occipitalis externa*) и остистый отросток II шейного позвонка, производили вкол иглы 22G с мандреном в мягкие ткани и далее вдоль чешуи затылочной кости, пунктировали большую цистерну (*cisterna magna*), что определялось по появлению капли спинномозговой жидкости в канюле после удаления мандрена (рис. 1). Иглу направляли горизонтально, продвигали на всю длину в полость черепа, соединяли с механическим тонометром. В полость черепа нагнетали атмосферный воздух до достижения давления, равного АДср., со скоростью

20 мм рт. ст./мин, время экспозиции повышенного давления составляло 5 мин, после чего ВЧД снижали в 2 раза и прекращали подачу диэтилового эфира в дыхательный контур [8].

Через 30 мин (точка 1) проводили констатацию смерти мозга у экспериментального животного на основании следующих общепринятых критериев [9]: отсутствие самостоятельного дыхания (апноэ), подтвержденное положительным тестом апноэтической оксигенации; полное и устойчивое отсутствие сознания (кома); отсутствие фотореакции зрачков и роговичных рефлексов (рис. 1). В соответствии с протоколом констатации смерти мозга при наличии положительного теста апноэтической оксигенации и признаков смерти мозга при физикальном исследовании дополнительные инструментальные методы (церебральная ангиография, электроэнцефалография, транскраниальная доплерография) не проводятся [9].

Для кондиционирования донора в течение 3 ч животным экспериментальной группы проводили ИВЛ, мониторинг показателей гемодинамики и сердечного ритма, поддерживали температуру тела на уровне 37 °С. При снижении АДср. ниже 75 мм рт. ст. проводили инфузию раствора «Гелофузина» (B.Braun Medical AG, Швейцария) для обеспечения адекватной перфузии потенциальных донорских органов. В этой группе вывод животных из эксперимента заканчивали через 3 ч после моделирования смерти мозга (точка 2) прекращением волеической поддержки и ИВЛ (рис. 1).

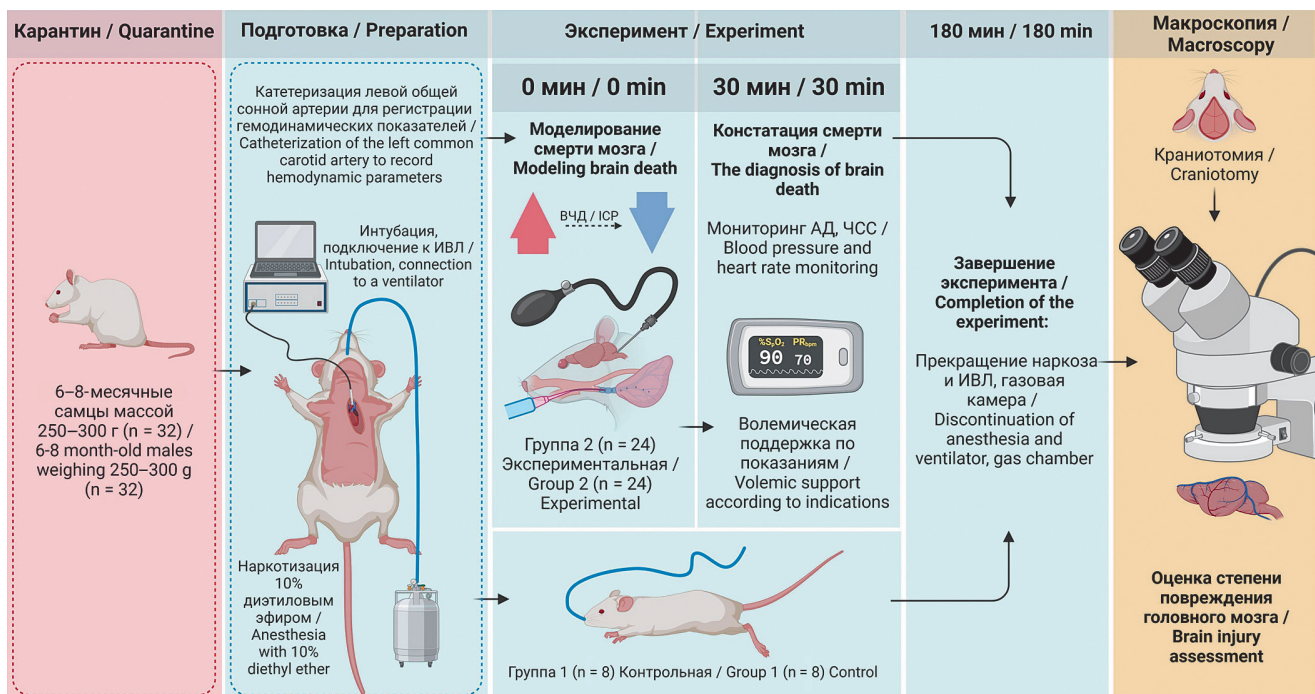


РИС. 1. Схема эксперимента.

Примечание: ИВЛ - искусственная вентиляция легких; ВЧД - внутричерепное давление; АД - артериальное давление; ЧСС - частота сердечных сокращений.

FIG. 1. Experimental design.

Note: ICP - intracranial pressure.

На этапе разработки модели смерти мозга 6 животных экспериментальной группы были исключены из исследования по причине развития биологической смерти: 3 крысы из-за проблем с интубацией и проведением ИВЛ и 3 – из-за остановки сердечной деятельности. Погибшим животным выполняли краниотомию с целью валидации экспериментальной модели, при макроскопической оценке степени повреждения головного мозга выявляли множественные кровоизлияния и каудальное смещение мозговых структур с компрессией и вклиниванием ствола мозга.

Вывод контрольных животных из эксперимента заканчивали через 3 ч (точка 2) удалением катетера из сонной артерии, прекращением подачи анестетика, остановкой ИВЛ и помещением в газовую камеру.

Статистический анализ

Для проверки нормальности распределения полученных данных использовали критерий Шапиро – Уилка. В связи с тем что гипотеза о нормальном распределении данных была отклонена, далее использовали непараметрические критерии. Для оценки различий между показателями гемодинамики контрольной и экспериментальной групп использовали критерий Манна – Уитни. Для оценки различий между показателями гемодинамики до и после моделирования смерти мозга использовали критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й; 75-й процентиля). Критический уровень значимости при тестировании статистических гипотез принимали равным 0,05. Данные обрабатывались с помощью программы Statistica 13.0 (TIBCO, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Смерть мозга была констатирована у всех 18 экспериментальных животных. При оценке их неврологического статуса, по мере повышения ВЧД

наблюдался тремор нижних конечностей с преобладанием тонуса мышц-разгибателей, то есть развивалась децеребрационная ригидность. Спустя 30 мин от начала индукции смерти мозга при временном прекращении ИВЛ в течение 1 мин отсутствовали самостоятельные дыхательные движения грудной клетки, а также сознание и мышечный тонус, не вызывались роговичные рефлексы, отсутствовала фото-реакция зрачков.

В течение 2 ч эксперимента вследствие прогрессирования недостаточности кровообращения биологическая смерть развилась у 3 крыс (летальность 17%), в течение 3 ч. еще у 7 (летальность 39%). Общая летальность за 3 часа составила 56%.

Динамика показателей АДср. и ЧСС в ходе эксперимента представлена на рисунках 2 и 3.

Показатели АДср. и ЧСС между контрольной и экспериментальной группами до индукции смерти мозга статистически значимо не отличались и составляли АДср. 101 (90; 105) мм рт. ст., ЧСС 310 (297; 315) уд./мин. Через 5 мин от начала индукции смерти мозга в экспериментальной группе было выявлено значительное повышение АДср. до 147 (140; 150) мм рт. ст. ($p = 0,01$) и ЧСС до 396 (384; 406) уд./мин ($p = 0,03$). Далее в течение 20 мин отмечалось постепенное снижение АДср. до 94 (90; 100) мм рт. ст. и ЧСС до 290 уд./мин.

В период наблюдения от 26 до 90 мин в экспериментальной группе регистрировалась относительная стабилизация АДср. на уровне 87–92 мм рт. ст., отмечалась тенденция к брадикардии с ЧСС от 263 до 274 уд./мин ($p = 0,01$) по сравнению с исходными значениями. Через 120 и 150 мин от начала индукции смерти мозга наблюдалось некоторое снижение АДср. до 75–80 мм рт. ст. ($p = 0,03$), снижение ЧСС до 256–264 уд./мин ($p = 0,01$) по сравнению с исходными значениями. К концу третьего часа эксперимента, несмотря на волеимическую поддержку, у экспериментальных животных продолжалось снижение

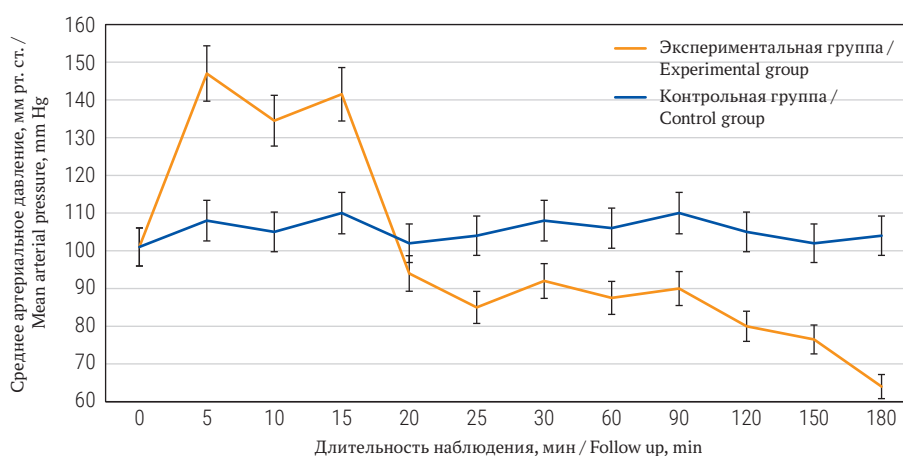


РИС. 2. Динамика среднего артериального давления у беспородных крыс-самцов после моделирования смерти мозга и в контрольной группе в течение 180 мин.

FIG. 2. Dynamics of mean blood pressure in outbred male rats after simulating brain death and in the control group for 180 min.

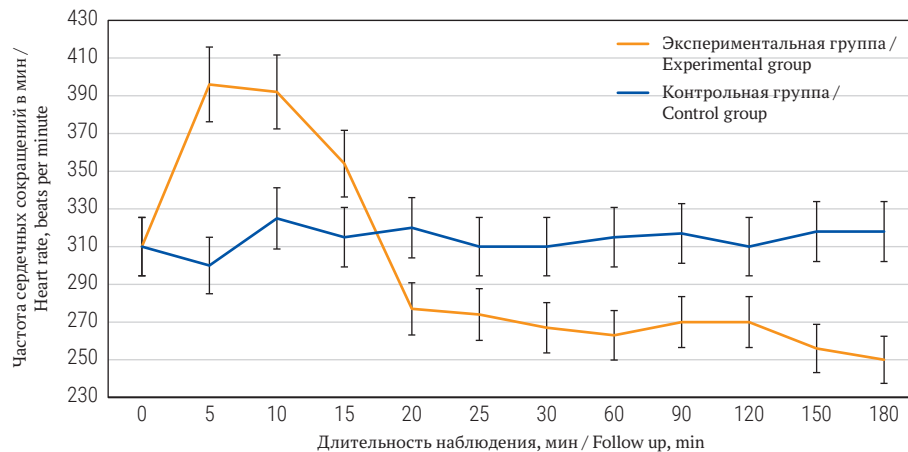


РИС. 3. Динамика частоты сердечных сокращения у беспородных крыс-самцов после моделирования смерти мозга и в контрольной группе в течение 180 мин.

FIG. 3. Dynamics of heart rate in outbred male rats after simulating brain death and in the control group for 180 minutes.

АДср. до 64 (61; 67) мм рт. ст. ($p = 0,02$), наряду с этим усугублялась брадикардия до 250 (248; 260) уд/мин ($p = 0,01$) по сравнению с исходными величинами, что свидетельствует о развитии декомпенсации гемодинамических расстройств.

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном нами исследовании представлены результаты экспериментальной апробации модели донора со смертью мозга с постепенной индукцией ВЧД. При осуществлении предлагаемого способа индукции смерть мозга является неизбежным следствием постепенного снижения церебральной перфузии, что последовательно приводит сначала к дисциркуляции, а затем и дислокации мозговых структур и, тем самым, к прекращению всех функций головного мозга.

Показано, что в ходе моделирования смерти мозга предлагаемым способом развиваются фазные нарушения центральной гемодинамики, которые характеризуются начальной кратковременной гипердинамической реакцией, сопровождающейся артериальной гипертензией и тахикардией, и последующей продолжительной гиподинамической стадией с развитием артериальной гипотензии и брадикардии, что согласуется с данными литературы [10, 11].

Необратимое тотальное повреждение ЦНС с последующим развитием смерти мозга представляет собой мощное стрессорное воздействие на организм в целом. В результате в организме потенциального донора органов запускается выраженная нейроэндокринная реакция, связанная с первоначальной активацией, а затем угнетением гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем [12–14]. У пострадавших и у экспериментальных животных со смертью мозга наблюдается значительное повышение концентрации катехоламинов в крови [14, 15]. Гиперкатехоламинемия, как известно, ассоциирована со смещением метаболических реакций

в сторону преобладания катаболизма, вазоконстрикцией и активацией свободнорадикального окисления, что в конечном итоге приводит к разобщению окислительного фосфорилирования и тканевой гипоксии [15, 16].

Смерть мозга как терминальное состояние организма донора является начальным, но далеко не единственным звеном в цепи ишемического повреждения донорских органов в ходе трансплантации. Кроме собственно ишемии, важнейшим звеном в генезе ухудшения морфофункционального состояния трансплантатов выступает системная воспалительная реакция, которая реализуется путем значительного повышения концентрации провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 альфа, интерлейкин 6, фактор некроза опухоли-альфа в крови и активации опосредованных ими проапоптотических сигнальных каскадов в периферических тканях [17, 18].

Становится очевидным, что донорские органы, эксплантированные после смерти мозга даже у молодого условно здорового субъекта, не являются в полной мере интактными, а находятся в состоянии исходной, зачастую латентной дисфункции различной степени. Это положение подтверждается данными о худшей выживаемости трупных трансплантатов, в частности почки, в сравнении с органами, полученными от живых родственных доноров [10]. С другой стороны, возможности для коррекции функционального состояния донорских органов после смерти мозга представляют значительный интерес и требуют дальнейших исследований.

Необходимо отметить, что общепринятой экспериментальной модели смерти мозга, в полной мере пригодной для всесторонней оценки развивающихся патологических изменений в донорских органах, в настоящее время не разработано. Так, к существенным недостаткам, присущим моделям смерти мозга с быстрой индукцией, следует отнести необходимость

дополнительного введения препаратов инотропного действия для поддержания уровня АДср., что усугубляет вазоконстрикцию и способствует дальнейшему ухудшению кровотока в периферических органах и тканях вплоть до развития ишемического повреждения.

Формирование наблюдаемого паттерна гемодинамических реакций в ответ на значительное повышение ВЧД, по всей видимости, может быть объяснено с позиций утраты поврежденным головным мозгом интегративной функции, а также нарушением вегетативной регуляции сосудистого тонуса и ритма сердца вследствие повреждения сосудодвигательного центра продолговатого мозга. Согласно классическому описанию о компенсаторных реакциях в ответ на увеличение ВЧД, у экспериментальных животных наблюдается артериальная гипертензия, брадикардия и нерегулярное дыхание, что впоследствии было названо рефлексом (триадой) Кушинга [19].

Гипердинамические реакции системы кровообращения при повышении ВЧД, как считается, направлены на обеспечение церебральной перфузии на адекватном уровне. При распространении ишемии на продолговатый мозг происходит резкая активация симпатoadренальной системы с увеличением сердечного выброса, тахикардией и ростом периферического сосудистого сопротивления. Смерть мозга наступает в случае прогрессирования внутричерепной гипертензии за счет декомпенсации адаптивных реакций стволовых структур и других систем организма. Далее ишемическое повреждение, достигнув шейных сегментов спинного мозга, вызывает симпатическую денервацию сердца и сосудистого

русла. Закономерно наступает гиподинамическая стадия расстройств гемодинамики с развитием системной гипотензии за счет брадикардии и утраты вазомоторного тонуса. Критическое состояние гемодинамики усугубляется гиповолемией, которая возникает как следствие повреждения и последующего отека мозга, а также является результатом метаболических, эндокринных и электролитных нарушений [20]. Изменения гемодинамических нарушений, наблюдаемых в эксперименте, являются схожими с таковыми при массивных внутричерепных кровоизлияниях и у доноров со смертью мозга в клинической практике, что может свидетельствовать о патогенетической адекватности предлагаемой биомодели [20].

Проведенное нами экспериментальное исследование носило пилотный характер и было выполнено на выборке ограниченного объема. Следующим этапом исследования будет углубленное изучение выраженности функционально-метаболических и структурных нарушений в органах в ходе кондиционирования донора со смертью мозга и возможности коррекции этих нарушений на предтрансплантационном этапе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментальной апробации модели потенциального донора с постепенной индукцией смерти мозга, разработанной на беспородных крысах, показали, что она является воспроизводимой, патогенетически адекватной и позволяет оценивать состояние потенциальных донорских органов в течение 3 ч после индукции смерти мозга.

AUTHOR CONTRIBUTION

Pavel A. Ermolaev, Alexey S. Vyaltin and Lyubov O. Barskaya carried out the experiment, data collection and statistical analysis, analyzed literature sources and compiled the text of the article. Tatyana P. Khramykh provided project general guidance, contributed to the critical revision and editing of the manuscript. All authors approved the final version of the article.

ВКЛАД АВТОРОВ

П.А. Ермолаев, А.С. Вяльцин и Л.О. Барская провели эксперимент, сбор данных и их статистическую обработку, анализ литературных источников, составили текст статьи. Т.П. Храмых осуществляла общее руководство написанием статьи, участвовала в критической доработке и редактировании рукописи. Все авторы утвердили окончательную версию статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Guo Z., Luo T., Mo R., et al. Ischemia-free organ transplantation – a review. *Curr Opin Organ Transplant*. 2022 Aug 1; 27(4): 300–304. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000998>. Epub 2022 Jul 5. PMID: 36354255
- Yoshikawa M.H., Rabelo N.N., Welling L.C., et al. Brain death and management of the potential donor. *Neurol Sci*. 2021 Sep; 42(9): 3541–3552. <https://doi.org/10.1007/s10072-021-05360-6>. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34138388; PMCID: PMC8210518
- Zens T.J., Danobeitia J.S., Chlebeck P.J., et al. Guidelines for the management of a brain death donor in the rhesus macaque: A translational transplant model. *PLoS ONE* 2017 Sep 19; 12(9): e0182552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182552>. PMID: 28926566; PMCID: PMC5604963
- Esmailzadeh M., Sadeghi M., Heissler H.E., et al. Experimental rat model for brain death induction and kidney transplantation. *J Invest Surg*. 2020 Feb; 33(2): 141–146. <https://doi.org/10.1080/08941939.2018.1480677>. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30335532
- Petersen A., Soderstrom M., Saha B., Sharma P. Animal models of traumatic brain injury: a review of pathophysiology to biomarkers and treatments. *Exp Brain Res*. 2021 Oct; 239(10): 2939–2950. <https://doi.org/10.1007/s00221-021-06178-6>. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34324019
- Percie du Sert N., Ahluwalia A., Alam S., et al. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14; 18(7): e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>. PMID: 32663221; PMCID: PMC7360025
- Lopez-Jimenez F., Pniagua D., Lamas G.A. La interpretación de los ensayos clínicos negativos [Interpretation of negative clinical trials]. *Rev. Invest. Clin*. 1998 Sep-Oct; 50(5): 435–440. Spanish. PMID: 9949676
- Ермолаев П.А., Храмых Т.П. Патент РФ RU 2798902 C1, Способ моделирования смерти головного мозга в эксперименте. Опубликовано: 28.06.2023 Бюл. № 19 / Ermolaev P.A.,

- Khramykh T.P.* Patent of the Russian Federation No 2798902 C1. A method for experimental modeling of brain death. Date of publication: 28.06.2023 Bull. № 19.
9. *Clarke C.*, Management of the brain-dead organ donor. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021 Sep; 37(Suppl 3): 395–400. <https://doi.org/10.1007/s12055-021-01224-y>. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34548770; PMCID: PMC8445737
 10. *Jurcau A., Simion A.* Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 21; 23(1): 14. <https://doi.org/10.3390/ijms23010014>. PMID: 35008440; PMCID: PMC8744548
 11. *Pomper G., Trescher K., Santer D., et al.* Introducing a mouse model of brain death. *J Neurosci Methods.* 2010 Sep 30; 192(1): 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.019>. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20655951
 12. *Kalra S., Malik R., Singh G., et al.* Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology.* 2022 Aug; 30(4): 1153–1166. <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01017-8>. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35802283; PMCID: PMC9293826
 13. *Visser K., Koggel M., Blaauw J., et al.* Blood-based biomarkers of inflammation in mild traumatic brain injury: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022 Jan; 132: 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.11.036>. Epub 2021 Nov 23. PMID: 34826510
 14. *Виноградов В.Л.* Актуальные вопросы органного донорства. Введение. Лекция. Трансплантология. 2013; 4: 15–23. /
 - Vinogradov V.L.* Actual issues of organ donation. Introduction. The lecture. *The Russian Journal of Transplantation.* 2013; 4: 15–23 (In Russian).
 15. *Feng D., Lewis A.* Brain death: ethical and legal challenges. *Neurol Clin.* 2023 Aug; 41(3): 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2023.03.004>. Epub 2023 Apr 20. PMID: 37407100
 16. *Walweel K., Boon A.C., See Hoe L.E., et al.* Brain stem death induces pro-inflammatory cytokine production and cardiac dysfunction in sheep model. *Biomed J.* 2022 Oct; 45(5): 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.10.007>. Epub 2021 Oct 16. PMID: 34666219; PMCID: PMC9661508
 17. *Alsbrook D.L., Di Napoli M., Bhatia K., et al.* Neuroinflammation in acute ischemic and hemorrhagic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2023 Aug; 23(8): 407–431. <https://doi.org/10.1007/s11910-023-01282-2>. Epub 2023 Jul 3. PMID: 37395873; PMCID: PMC10544736
 18. *Marasco S., Kras A., Schulberg E., et al.* Donor brain death time and impact on outcomes in heart transplantation. *Transplant Proc.* 2013 Jan-Feb; 45(1): 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.08.008>. PMID: 23375272
 19. *Tsai Y.H., Lin J.Y., Huang Y.Y., Wong J.M.* Cushing response-based warning system for intensive care of brain-injured patients. *Clin Neurophysiol.* 2018 Dec; 129(12): 2602–2612. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2018.09.010>. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30453271
 20. *Ng S.Y., Lee A.Y.W.* Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Front Cell Neurosci.* 2019 Nov 27; 13: 528. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>. PMID: 31827423; PMCID: PMC6890857

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ермолаев Павел Александрович , канд. мед. наук, ассистент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8733-6102>

Храмых Татьяна Петровна, д-р мед. наук, доцент, заведующая кафедрой топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5508-6679>

Вяльцин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, доцент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2569-438X>

Барская Любовь Олеговна, канд. мед. наук, доцент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0460-4296>

Pavel A. Ermolaev , Cand. of Sci. (Medicine), Assistant Professor, Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Omsk State Medical University.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8733-6102>

Tatyana P. Khramykh, Dr. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Omsk State Medical University.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5508-6679>

Alexey S. Vyaltzin, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Omsk State Medical University.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2569-438X>

Lyubov O. Barskaya, Cand. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Omsk State Medical University.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0460-4296>

 Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



Специфическая противоопухолевая активность анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов в отношении CA125-позитивных и CA125-негативных клеток

Т.М. Кулинич^{1,✉}, Я.Ю. Киселева¹, А.М. Шишкин¹, Е.А. Кудинова¹, О.Б. Князева¹,
Р. Ранджит^{2,3}, В.К. Боженко¹, В.А. Солодкий¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России
ул. Профсоюзная, д. 86, Москва, 117997, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, Москва, 117198, Россия

³ ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая онкологическая больница № 1
Департамента здравоохранения города Москвы»
Загородное шоссе, д. 18А, Москва, 117151, Россия

Аннотация

Цель. Оценить противоопухолевую эффективность разработанного нами препарата на основе цитотоксических Т-лимфоцитов, генетически модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), специфичным к антигену CA125 в отношении как CA125-позитивных, так и CA125-негативных клеточных культур.

Материалы и методы. Исследование было проведено в условиях *in vitro* на CA125-позитивных клетках рака яичника человека (OVCAR-3, OVKATE) и CA125-негативных клетках (рака молочной железы MCF-7, эмбриональной почки HEK293). Цитотоксические эффекты в отношении опухолевых клеток оценивали через 0, 4, 8 и 24 часа с помощью бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиевого (MTT) и лактатдегидрогеназного (ЛДГ) тестов. Также было проведено исследование изменения количества клеток в реальном времени при воздействии трансфицированных лимфоцитов при помощи прибора RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, США). Контролем специфичности являлись лимфокин-активированные киллеры (ЛАК).

Результаты. На культурах клеток OVCAR-3 и OVKATE был получен выраженный цитотоксический эффект при использовании анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов, превышающий воздействие ЛАК в 1,3 раза. Популяция клеток в исследуемых опытных образцах снижалась на $70 \pm 4\%$, что превосходило эффект ЛАК на $9 \pm 8,2\%$. В отношении MCF-7 цитотоксическое воздействие анти-CA125 CAR-T лимфоцитов имеет минимальное значение, что проявилось в снижении относительного количества живых клеток на 25,8%, по сравнению с цитотоксичностью ЛАК в 68%. Исследование изменения количества клеток в реальном времени доказало высокий специфический цитотоксический эффект анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов в отношении опухолевых культур, экспрессирующих CA-125, при этом уступающий по эффективности ЛАК для культур, не экспрессирующих CA125 (MCF-7, HEK293).

Закключение. Применение анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов в отношении CA125-позитивных опухолевых клеточных линий OVCAR-3 и OVKATE продемонстрировало выраженный специфический цитотоксический эффект, превышающий цитотоксическое воздействие ЛАК, чего не удалось достигнуть в отношении CA125-негативных клеток MCF-7 и HEK293.

Ключевые слова: высокотехнологический лекарственный препарат; рак яичников; эпителиальная карцинома яичника; иммунотерапия; химерный антигенный рецептор; Т-клеточная иммунотерапия; лимфокин-активированные клетки

Рубрики MeSH:

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ

ЯИЧНИКОВ НОВООБРАЗОВАНИЯ – ЛЕКАРСТВЕННАЯ ТЕРАПИЯ

ЯИЧНИКИ – ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ЯИЧНИКИ – ПАТОЛОГИЯ

РЕЦЕПТОРЫ ХИМЕРНОГО АНТИГЕНА – ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

КЛЕТКИ-КИЛЛЕРЫ, ЛИМФОКИНАМИ АКТИВИРУЕМЫЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ТЕСТЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ

Для цитирования: Кулинич Т.М., Киселева Я.Ю., Шишкин А.М., Кудинова Е.А., Князева О.Б., Ранджит Р., Боженко В.К., Солодкий В.А. Специфическая противоопухолевая активность анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов в отношении CA125-позитивных и CA125-негативных клеток. Сеченовский вестник. 2024; 15(2): 36–47. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.36-47>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Кулинич Татьяна Михайловна, канд. мед. наук, заведующая лабораторией иммунологии и онкоцитологии научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенологии» Минздрава России.

Адрес: ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997, Россия

E-mail: sobral@mail.ru

Соответствие принципам этики. Данное исследование с использованием биологического материала проводилось исключительно в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения биомедицинских исследований. Исследование проведено в соответствии с разрешением Независимого этического комитета и этической комиссии ФГБУ «Российский научный центр рентгенологии» Минздрава России (протоколы № 10 от 29.10.2021 и № 2/14-Э от 17.02.2014).

Доступ к данным исследования. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у авторов по обоснованному запросу.

Данные и статистические методы, представленные в статье, прошли статистическое рецензирование редактором журнала – сертифицированным специалистом по биостатистике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было проведено при поддержке Государственного контракта № 14.N 08.11.0081 от 14 июля 2016 г. в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Поступила: 05.04.2024

Принята: 20.05.2024

Дата печати: 15.07.2024

Specific antitumor activity of anti-CA125 CAR-T lymphocytes against CA125-positive and CA125-negative cells

Tatyana M. Kulinich^{1,✉}, Yana Yu. Kiseleva¹, Alexander M. Shishkin¹, Elena A. Kudinova¹, Oksana B. Knyazeva¹, Rajesh Ranjit^{2,3}, Vladimir K. Bozhenko¹, Vladimir A. Solodky¹

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology
86, Profsoyuznaya str., Moscow, 117997, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia
6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

³Municipal Clinical Hospital Number 1 of the Moscow City Health Department
18A, Zagorodnoye highway, Moscow, 117151, Russia

Abstract

Aim. To evaluate the antitumor efficacy of our developed drug based on cytotoxic T lymphocytes genetically modified with a chimeric antigen receptor (CAR) specific to the CA125 antigen in relation to both CA125-positive and CA125-negative cell cultures.

Materials and methods. We performed an *in vitro* study on CA125-positive human ovarian cancer cells (OVCAR-3, OVKATE) and CA125 negative cells (breast cancer MCF 7, embryonic kidney HEK293). Cytotoxic effects on tumor cells were evaluated after 0, 4, 8 and 24 hours using the 3'-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and Lactate Dehydrogenase (LDH) tests. We also studied the changes in the number of cells "in real time" when exposed to transfected lymphocytes using the RTCA iCELLigence device (ACEA Biosciences, USA). Lymphokine-activated killer (LAK) cells were used as a specificity control.

Results. The study demonstrated that anti-CA125 CAR-T lymphocytes exhibited a pronounced cytotoxic effect on OVCAR-3 and OVKATE cell cultures, exceeding the effect of LAK by 1.3 times. The cell population in the experimental

samples decreased by $70 \pm 4\%$, which exceeded the LAK effect by $9 \pm 8.2\%$. With regard to the MCF-7 cell line, the cytotoxic effect of anti-CA125 CAR-T lymphocytes was minimal as evidenced by a 25.8% decrease in the relative number of live cells in comparison to the LAK cytotoxicity of 68%. Real-time monitoring of cell proliferation and viability proved a high specific cytotoxic effect of anti-CA125 CAR-T lymphocytes against tumor cultures expressing CA-125, while inferior to LAK in cultures not expressing CA125 (MCF-7, HEK293).

Conclusions. The use of anti-CA125 CAR-T lymphocytes against CA125-positive tumor cell lines OVCAR-3 and OVKATE demonstrated a pronounced specific cytotoxic effect exceeding the cytotoxic effect of LAK, which was not achieved against CA125-negative MCF-7 and HEK293 cells.

Keywords: high-tech drug; ovarian cancer; epithelial ovarian carcinoma; immunotherapy; chimeric antigen receptor; T-cell therapy; lymphokine-activated killer cells

MeSH terms:

CELL LINE, TUMOR

OVARIAN NEOPLASMS – DRUG THERAPY

OVARY – DRUG EFFECTS

OVARY – PATHOLOGY

RECEPTORS, CHIMERIC ANTIGEN – THERAPEUTIC USE

KILLER CELLS, LYMPHOKINE-ACTIVATED

CYTOTOXICITY TESTS, IMMUNOLOGIC

For citation: Kulinich T.M., Kiseleva Y.Yu., Shishkin A.M., Kudinova E.A., Knyazeva O.B., Ranjit R., Bozhenko V.K., Solodky V.A. Specific antitumor activity of anti-CA125 CAR-T lymphocytes against CA125-positive and CA125-negative cells. Sechenov Medical Journal. 2024; 15(2): 36–47. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.36-47>

CONTACT INFORMATION:

Tatyana M. Kulinich, Cand. of Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Immunology and Oncocytology, Research Department of Molecular Biology and Experimental Therapy of Tumors, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

Address: 86, Profsoyuznaya str., Moscow, 117997, Russia.

E-mail: sobral@mail.ru

Ethics statements. This research using biological material was conducted solely in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Biomedical Research. The study was conducted in accordance with the permission of the Independent Ethics Committee and the Ethics Commission of the “Russian Scientific Center of Roentgenoradiology” (protocols No. 10 of 29.10.2021 and No. 2/14-E of 17.02.2014).

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Data and statistical methods used in the article were examined by a professional biostatistician on the Sechenov Medical Journal editorial staff.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was conducted with the support of State Contract No. 14.N 08.11.0081 dated 14.07.2016 within the framework of the federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period until 2020 and beyond”.

Received: 05.04.2024

Accepted: 20.05.2024

Date of publication: 15.07.2024

Список сокращений:

CA125 – Carbohydrate antigen 125, углеводный антиген 125

CAR – Chimeric Antigen Receptor, химерный антигенный рецептор

CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy, адоптивная Т-клеточная иммунотерапия

CD – Cluster of differentiation, кластер дифференцировки

MUC16 – Mucin 16, муцин 16

sMUC16 – Mucin 16 extracellular segment, внеклеточный сегмент муцина 16

ЛАК – лимфокин-активированные киллеры

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

Рак яичников занимает восьмое место в структуре онкологических заболеваний у женщин и третье место в структуре заболеваний женской репродуктивной системы [1, 2] и является второй по частоте причиной смертности, связанной с гинекологическими заболеваниями [3, 4].

Примерно 90% опухолей яичника составляет эпителиальная карцинома яичника [5]. Из-за отсутствия специфических ранних симптомов и адекватных методов скрининга первичной эпителиальной карциномы яичников [6] более 51% ее случаев диагностируют на стадии II и 29% – на стадии IV [7, 8]. Основным методом лечения для таких пациентов является обширное хирургическое вмешательство в сочетании с химиотерапией, однако прогноз для таких пациентов на сегодня остается неблагоприятным [9, 10]. Отсутствие серьезных изменений за последние десятилетия по показателю общей выживаемости у женщин с диагнозом «рак яичников» [11], высокая частота рецидивов и резистентных к химиопрепаратам форм свидетельствуют о необходимости создания новых методов лечения этой высоколетальной нозологии.

Адоптивная Т-клеточная иммунотерапия с использованием химерных антигенных рецепторов (Chimeric antigen receptor T-cell therapy, CAR-T) является одним из наиболее интенсивно развивающихся и перспективных методов лечения онкологических заболеваний, позволяющим минимально воздействовать на нормальные ткани организма благодаря своей высокой специфичности [12]. Однако если лечение гемобластозов с помощью кластеров дифференцировки 19, 20 (Clusters of differentiation 19, 20, CD19/20) в составе CAR-T [13, 14] получило широкое распространение в клинической практике, то использование CAR-T для лечения солидных опухолей столкнулось с рядом принципиальных проблем: наличием побочных эффектов, связанных с экспрессией целевого антигена нормальными клетками организма вследствие относительной специфичности опухолевых антигенов, а также токсичностью вне опухоли (в маточной трубе, эндометрии, перикарде, брюшине), локальной иммуносупрессией CAR-T-лимфоцитов клетками микроокружения опухоли и недостаточным цитотоксическим эффектом в отношении крупных новообразований [15, 16]. Для решения этих проблем ведутся активные исследования, направленные как на модификацию конструкции CAR с целью усиления эффективности генно-модифицированных Т-лимфоцитов [17, 18], так и на увеличение доставки CAR-T-лимфоцитов в ткани опухоли с помощью хоминг-рецепторов (homing receptors) [19, 20].

CAR-T для лечения рака яичников является многообещающим подходом [21], в частности, с использованием CAR-T-продуктов, нацеленных на различные антигены, одним из которых является углеводный

антиген 125 (Carbohydrate antigen 125, CA125), экстрацеллюлярный домен гликопротеина муцина 16 (Mucin 16, MUC16) [21, 22].

MUC16 гиперэкспрессируется в различных опухолях и участвует в активации пролиферации и метастазировании раковых клеток [23]. Показано, что в 80% случаев эпителиальная карцинома яичников экспрессирует MUC16 [21, 23], а его внеклеточный сегмент (Mucin 16 extracellular segment, sMUC16) благодаря десквамации и протеолитическому расщеплению N-концевого домена MUC16 попадает в кровотоки с поверхности клеток опухоли [24, 25]. sMUC16, антигенный эпитоп CA125, обнаруживают в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, его принято считать лучшим биомаркером эпителиального рака яичников [26]. MUC16 и его растворимый фрагмент CA125 занимают особую позицию среди белков, являясь не только диагностическим биомаркером, но и привлекательной терапевтической мишенью для антиген-позитивных опухолей, включая рак яичника [27].

В настоящее время нами разрабатывается соматоклеточный лекарственный препарат на основе анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов, предназначенный для лечения CA125-позитивного рака яичников. Препарат представляет собой Т-лимфоциты, генетически модифицированные *ex vivo* ДНК-плазмидой, обеспечивающей экспрессию на поверхности клеток CAR с высокой аффинностью к опухоль-специфичному антигену CA125. Отсутствие встраивания в ДНК клетки-хозяина Т-лимфоцита резко снижает риск побочных эффектов, в частности, возможные мутагенные реакции. Разработанная нами технология получения CA125 CAR-T-лимфоцитов не требует дополнительного наращивания клеток, что существенно снижает стоимость процедуры.

Цель исследования: оценить противоопухолевую эффективность *in vitro* нового соматоклеточного лекарственного препарата на основе анти-CA125 CAR-T лимфоцитов. Оценить цитотоксичность на основе воздействия исследуемого препарата в отношении CA125-позитивных и CA125-негативных клеточных линий, а также сравнить с эффектом лимфокин-активированных киллеров (ЛАК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение фракции моноклеаров периферической крови человека

Моноклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной периферической крови человека (12–30 МЕ гепарина/1 мл крови) центрифугированием на ступенчатом градиенте фикола-урографина плотностью 1,077 г/мл (ООО НПФ «ПанЭко», Россия) при ускорении в 700 g в течение 25 мин. Далее их трижды отмывали фосфатно-солевым буфером, pH 7,4 при 300, 160 и 300 g по 10 мин и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей

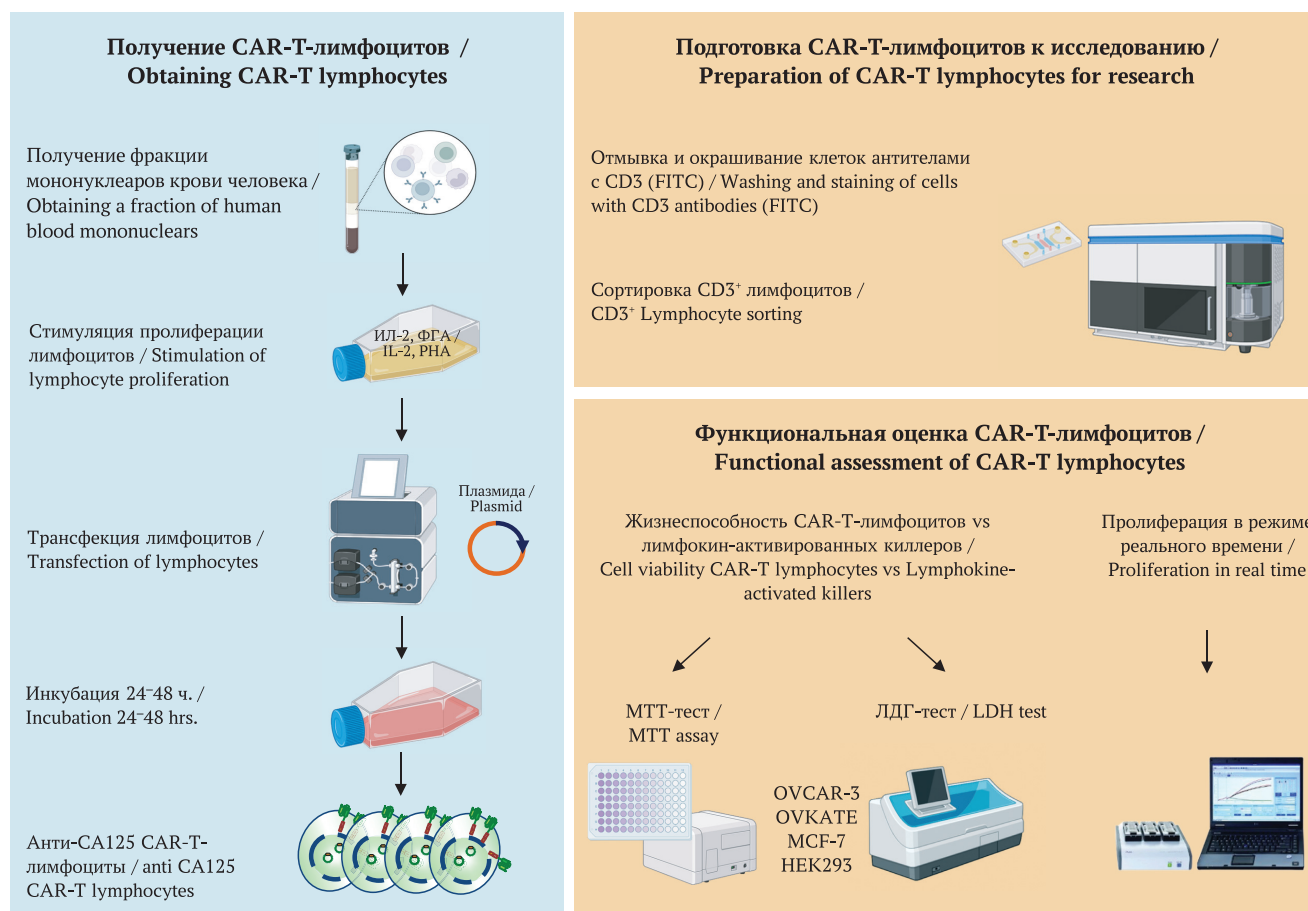


РИС. 1. Изучение специфической противоопухолевой активности анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов. Первый этап: выделение фракции мононуклеаров крови и трансфекция клеток плазмидным вектором, несущим ген CAR к CA125; последующая 24-часовая инкубация для экспрессии CAR на мембране лимфоцитов; параллельно с получением CAR-T продукта активация лимфокин-активированных киллеров (ЛАК). Второй этап (после анализа полученной фракции CAR-T-лимфоцитов): оценка цитотоксичности с помощью МТТ и ЛДГ-тестов; оценка воздействия CAR-T-лимфоцитов на пролиферацию исследуемых культур клеток в режиме реального времени.

Примечание: CAR – Chimeric Antigen Receptor, химерный антигенный рецептор; CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy, адоптивная Т-клеточная иммунотерапия; ИЛ-2 – интерлейкин 2; ФГА – фитогемагглютинин; CA125 – Carbohydrate antigen 125, углеводный антиген 125; CD3 (FITC) – Cluster of differentiation, кластер дифференцировки; МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

FIG. 1. Study of the specific antitumor activity of anti-CA125 CAR-T lymphocytes. First stage: isolation of the blood mononuclear cell fraction and transfection of cells with a plasmid vector carrying the CAR gene for CA125; subsequent 24-hour incubation for CAR expression on the lymphocyte membrane; in parallel with the production of the CAR-T product, activation of lymphokine-activated killer cells (LAK). Second stage (after analysis of the obtained fraction of CAR-T lymphocytes): assessment of cytotoxicity using MTT and LDH tests; assessment of the impact of CAR-T lymphocytes on the proliferation of cell cultures under study in real time.

Note: CAR – Chimeric Antigen Receptor; CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy; IL-2 – Interleukin 2; PHA – Phytohemagglutinin; CA125 – Carbohydrate antigen 125; CD3 (FITC) – Cluster of differentiation; MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; LDH – lactate dehydrogenase.

10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, США), 0,3 мг/мл L-глутамина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) и 10 мкг/мл гентамицина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) при 37 °C и 5% CO₂. Количество и состав выделенных мононуклеаров периферической крови контролировали на гематологическом анализаторе Advia-60 (Bayer HealthCare LLC,

США). Лимфоциты стимулировали к пролиферации добавлением 50 Ед/мл интерлейкина-2 (ООО «НПК «Биотех», Россия) и 2 мкг/мл фитогемагглютина (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в чашках Петри с адгезивным покрытием в стерильных условиях при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч. За это время происходила адгезия моноцитов,

содержащихся в моноклеарной фракции крови, к дну чашек Петри. Неприкрепившиеся клетки, представляющие собой в основном активированные лимфоциты, смывали пипетированием и использовали для электропорации.

Процедура трансфекции, получение CAR-T-лимфоцитов

Исследуемый препарат содержал Т-лимфоциты, генетически модифицированные ДНК-плазмидой pCI/3CA2-CAR3g. Данная плазида, несущая ген CAR, специфичный к антигену MUC16, представляла собой конструкцию третьего поколения, включающую шарнирную область CD8, трансмембранную область CD28 и активационные домены CD137 (4-1 BB), CD 247 (ζ-цепь). Распознающая часть была сконструирована на основании моноклонального антитела X181 [28]. Трансфекция лимфоцитов плазмидной конструкцией производилась на электропораторе Lonza Amaxa Nucleofector II с использованием набора Human T-Cell Nucleofector Kit (Lonza, Швейцария), программы T-020 или T-023. Для трансфекции одного образца объемом 100 мкл использовали 5×10^6 клеток и 5 мкг стерильного раствора плазмиды с концентрацией 1 мг/мл. После проведения трансфекции клетки переносили в чашки Петри и культивировали в течение 24–48 часов в стандартных стерильных условиях 5% CO₂, 37 °C, с использованием среды RPMI-1640 с содержанием 10% ЭТС и 10 мкг/мл гентамицина. Через сутки фракцию моноклеаров дважды отмывали в 10 мл RPMI-1640 при 300 g в течение 5 минут, окрашивали антителами к CD3-FITC (Sony, Япония) и проводили выборку CD3-положительных Т-лимфоцитов на клеточном сортере SH8000 (Sony, Япония). Количество жизнеспособных лимфоцитов, несущих CAR, оценивали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) с помощью окраски пропидием йодидом и антителами к CD3 (Beckman Coulter, США).

Клеточные линии

Противоопухолевую эффективность оценивали *in vitro* на моделях CA125-позитивных культур клеток аденокарцином яичника человека OVCAR-3¹ и OVKATE² и CA125-негативных: рака молочной железы MCF-7³ и эмбриональной почки человека HEK293⁴. Клетки опухолевых культур культивировали в питательной среде DMEM (содержание глюкозы 4,5 г/л; ООО НПП «ПанЭко», Россия) с 10% ЭТС

(Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 10 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиевый тест

Для оценки цитотоксических эффектов, оказываемых лимфоцитами на клетки исследуемых опухолевых линий, были использованы три метода: бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиевый (МТТ) тест, лактатдегидрогеназный (ЛДГ) тест и оценка количества жизнеспособных клеток в условиях реального времени.

Для постановки МТТ-теста клетки рассеивали в лунки 96-луночного планшета и инкубировали до получения 50% конфлюэнтности, затем к клеткам-мишеням вносили эффекторные CAR-T-лимфоциты или ЛАК в количестве 10:1 по отношению к опухолевым клеткам. Ко-культивирование проводили в течение 8 часов в стандартных условиях (5% CO₂, 37 °C), затем отбирали ростовую среду, проводили однократную промывку раствором Хенкса (ООО НПП «ПанЭко», Россия), далее в каждую лунку планшета вносили МТТ (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 5 мг/мл в растворе Хенкса. После 2-часовой инкубации удаляли жидкость и в лунки планшета вносили по 100 мл раствора диметилсульфоксида (ООО НПП «ПанЭко», Россия), измеряли оптическую плотность на планшетном ридере SpectraMax i3 (Molecular Devices, США) при двух длинах волн, 540 и 690 нм. Контролем специфичности являлись ЛАК, полученные путем аналогичного выделения лимфоцитов периферической крови и последующей их инкубации с интерлейкином-2. В качестве негативных образцов использовали культуры OVCAR-3, OVKATE и MCF-7 без добавления эффекторных клеток.

Лактатдегидрогеназный тест

ЛДГ-тест, в отличие от МТТ-теста, отражает количество погибших клеток за все время инкубации (активность ЛДГ во внеклеточной инкубационной среде пропорциональна количеству погибших клеток). Объектом исследования явились линии OVCAR-3, OVKATE, MCF-7 и HEK293. ЛДГ-тест оценивался через 24 и 48 часов инкубации клеток-мишеней с CAR-T и ЛАК. При оценке цитотоксического эффекта с помощью ЛДГ-теста были использованы два значения количества вносимых лимфоцитов: 250 тыс. и 500 тыс. (соотношение эффекторов и клеток-мишеней – 10:1 и 20:1). Контролем специфичности являлись ЛАК, негативным контролем – образцы клеточных культур без воздействия цитотоксических

¹ American Type Culture Collection (ATCC): Cell Products/Human Cells/HTB-161. <https://www.atcc.org/products/htb-161> (дата обращения: 02.02.2024).

² Cellosaurus OVKATE (CVCL_3110). https://cellosaurus.org/CVCL_3110 (дата обращения: 02.02.2024).

³ American Type Culture Collection (ATCC): Cell Products/Human Cells/ CRL-3435. <https://www.atcc.org/products/crl-3435> (дата обращения: 02.02.2024).

⁴ American Type Culture Collection (ATCC): Cell Products/Human Cells/ CRL-1573. <https://www.atcc.org/products/crl-1573> (дата обращения: 02.02.2024).

клеток. Оценку уровня ЛДГ проводили на биохимическом анализаторе AU400 (Olympus, Япония).

Оценка пролиферации в реальном времени

Технология RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, США) позволяет проводить оценку количества жизнеспособных адгезивных клеток по изменению показателя «клеточного индекса», отражающего зависимость количества жизнеспособных клеток от времени инкубации. Среда инкубации в исследовании цитотоксичности имела следующий состав: DMEM, 10 мкг/мл гентамицина (все – ООО НПП «ПанЭко», Россия) и 10% ЭТС (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клетки инкубировали в специализированных планшетах E-plate 16 (Agilent, США) в течение 24 часов. На момент начала опыта достигалась конфлюэнтность 50%, что составляло около 50 тыс. клеток на ячейку. Исследуемые клеточные продукты – CAR-T-лимфоциты и ЛАК вносили в лунки планшета в количестве 250 тыс. и 500 тыс. в 50 мкл среды RPMI1640, что соответствовало 5:1 и 10:1 эффекторов и клеток-мишеней. В качестве контроля использовались клетки опухолевых культур, к которым добавляли 50 мкл среды RPMI1640.

Статистический анализ

Все эксперименты были повторены три раза независимо друг от друга, показатели непрерывных переменных соответствовали нормальному распределению (тест Колмогорова – Смирнова и Крамера фон Мизеса) и представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Группы сравнивались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Тьюки. Нормированное количество клеток представлено в виде доли (%), для сравнения групп по этому параметру использовался критерий хи-квадрат с апостериорным тестом. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$. Для обработки данных использовалась программа IBM SPSS v.23.0 (SPSS: An IBM Company, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка цитотоксического эффекта с помощью МТТ-теста

В ходе эксперимента проводили измерение количества метаболически активных клеток в культурах после воздействия исследуемого продукта на основе анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов и ЛАК. Цитотоксический эффект оценивали через 4, 8 и 24 часа. Сравнение эффектов было проведено в отношении культур клеток опухолей женской репродуктивной системы MCF-7, OVCAR-3 и OVKATE.

Анти-CA125 CAR-T-лимфоциты оказывали стойкий цитотоксический эффект на клеточные культуры линий OVCAR-3 и OVKATE. Популяция клеток

в исследуемых опытных образцах снижалась на $70 \pm 4\%$, что превосходило эффект, оказываемый ЛАК, на $9 \pm 8,2\%$. Разница для цитотоксических эффектов, оказываемых анти-CA125 CAR-T-лимфоцитами и ЛАК, составила 1,3 раза.

В отношении CA125-негативной клеточной линии MCF-7 эффект исследуемого CAR-T продукта проявлялся в снижении относительного количества живых клеток на 25,8%. При инкубации клеток MCF-7 с ЛАК наблюдался более выраженный цитотоксический эффект – количество жизнеспособных клеток снижалось на 67,9% ($35 \pm 4\%$ клеток сохраняли функциональную активность после 24-часовой инкубации).

Средние значения оптической плотности для трех независимых экспериментов представлены в таблице 1. Количество метаболически активных живых клеток вычисляли на основании принятия среднего значения количества клеток в контрольных образцах после 24-часовой инкубации за 100%, что выражено параметром «нормированное количество клеток». При сравнении значений контрольных и опытных образцов установлены статистически значимые отличия при воздействии ЛАК на все исследуемые клеточные культуры после 8 и 24 часов ко-культивирования. Анти-CA125 CAR-T-лимфоциты оказывали статистически значимые эффекты при воздействии на CA-125-позитивные линии через 8 и 24 часа инкубации и на клетки линии MCF-7 через 24 часа. Также при сравнении групп с применением ЛАК и CAR-T-лимфоцитов были обнаружены достоверные отличия в эффективности воздействия на все клеточные популяции после 24 часов инкубации.

При сравнении результатов не было выявлено статистически значимых различий цитотоксического эффекта ЛАК в зависимости от экспрессии CA125, в то же время разница в эффектах, оказываемых на клетки с разным уровнем экспрессии CA125 специфичными CAR-T-лимфоцитами через 24 часа инкубации, составила 44,5% (табл. 1).

Оценка цитотоксического эффекта с помощью ЛДГ-теста

Как представлено в таблице 2, для клеток линии OVCAR-3 результаты ЛДГ-теста схожи с результатами МТТ-теста, внесение CAR-T-лимфоцитов вызывает гибель клеток исследуемой культуры. Цитотоксический эффект CAR-T сопоставим с ЛАК, пропорционален времени инкубации и возрастает примерно в 2 раза при увеличении времени воздействия до 48 часов. Также показано, что уменьшение количества добавляемого продукта в 2 раза приводит к снижению цитотоксического эффекта в 1,3 раза при инкубации в течение 24 часов и незначительному снижению (в 1,1 раза) при увеличении времени инкубации до 48 часов.

Таблица 1. Результаты МТТ-теста CAR-T-лимфоцитов и ЛАК по сравнению с контролем на культурах клеток OVCAR-3, OVKATE и MCF-7

Table 1. Results of the MTT test CAR-T lymphocytes and LAK compared with control on OVCAR-3, OVKATE and MCF-7 cell cultures

Клеточная культура / Cell culture	Оптическая плотность / Optical density			ANOVA, величина p / ANOVA, p value	Нормированное количество клеток, % / Normalized cell count, %			Хи-квадрат, величина p / Chi square, p value
	Контроль / Control	CAR-T / CAR-T	ЛАК / LAK		Контроль / Control	CAR-T / CAR-T	ЛАК / LAC	
OVCAR-3								
0 ч / 0 h	0,41 ± 0,024	0,414 ± 0,027	0,412 ± 0,035	n.s.	84,5	85,3	84,9	n.s.
4 ч / 4 h	0,41 ± 0,03	0,319 ± 0,091	0,333 ± 0,128	n.s.	84,6	65,7 ^a	68,6 ^a	<0,05
8 ч / 8 h	0,419 ± 0,026	0,264 ± 0,084 ^a	0,22 ± 0,043 ^a	<0,05	86,4	54,5 ^a	45,4 ^a	<0,001
24 ч / 24 h	0,485 ± 0,019	0,129 ± 0,019 ^{a, b}	0,168 ± 0,009 ^a	<0,05	100	26,7 ^a	34,7 ^a	<0,001
OVKATE								
0 ч / 0 h	0,289 ± 0,06	0,291 ± 0,025	0,288 ± 0,02	n.s.	76,8	77,3	76,5	n.s.
4 ч / 4 h	0,29 ± 0,031	0,253 ± 0,087	0,243 ± 0,043	n.s.	77,1	67,4	64,5	n.s.
8 ч / 8 h	0,337 ± 0,027	0,216 ± 0,009 ^a	0,206 ± 0,025 ^a	<0,05	89,6	57,5 ^a	54,7 ^a	<0,01
24 ч / 24 h	0,376 ± 0,018	0,123 ± 0,0 ^{a, b}	0,16 ± 0,008 ^a	<0,05	100	32,7	42,6	<0,001
MCF-7								
0 ч / 0 h	0,337 ± 0,071	0,342 ± 0,051	0,337 ± 0,037	n.s.	82,3	83,5	82,1	n.s.
4 ч / 4 h	0,314 ± 0,036	0,333 ± 0,08	0,28 ± 0,041	n.s.	76,5	81,2	68,4	n.s.
8 ч / 8 h	0,342 ± 0,04	0,318 ± 0,128	0,214 ± 0,036 ^a	<0,05	83,4	77,6	52,1 ^a	<0,05
24 ч / 24 h	0,41 ± 0,023	0,276 ± 0,087 ^b	0,132 ± 0,02 ^a	<0,05	100	74,2 ^a	32,1 ^{a, b}	<0,05

Примечание: МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy, адаптивная Т-клеточная иммунотерапия; ЛАК – лимфокин-активированные киллеры.

n.s. – not significant, не значимо.

^a $p < 0,05$ при сравнении с контролем в апостериорном тесте Тьюки / хи-квадрат.

^b $p < 0,05$ при сравнении с ЛАК в апостериорном тесте Тьюки / хи-квадрат.

Note: MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy; LAK – Lymphokine-activated killer cells.

n.s. – not significant.

^a $p < 0.05$ when compared with control in Tukey's / Chi-square post hoc test.

^b $p < 0.05$ when compared with LAK in in Tukey's / Chi-square post hoc test.

Результаты ЛДГ-теста для культуры OVKATE показали, что наибольший эффект оказывают CAR-T-лимфоциты, экспрессирующие Т-клеточный рецептор к CA125. Эффект пропорционален времени инкубации, но при уменьшении количества вносимого продукта снижается в 1,3 раза при инкубации 24 часа и в 1,1 раза при инкубации 48 часов. Цитотоксические эффекты CAR-T лимфоцитов и ЛАК по данным ЛДГ-теста для клеток, экспрессирующих CA125, статистически значимо не отличаются.

При исследовании и сравнении цитотоксических эффектов, оказываемых CAR-T-лимфоцитами и ЛАК, на клетки, не экспрессирующие CA125 (MCF-7, HEK293), было показано, что ЛАК для обеих культур превосходит CAR-T по эффективности. Также отмечалось усиление эффекта при увеличении времени инкубации до 48 часов и увеличении количества вносимых лимфоцитов.

Таким образом, в ходе исследования было показано, что CAR-T-лимфоциты оказывают выраженный цитотоксический эффект на CA125-позитивные культуры. Данный эффект имеет зависимость от времени инкубации и количества внесенных лимфоцитов, а также превосходит цитотоксический эффект ЛАК. В отношении культур клеток, не экспрессирующих

CA125, цитотоксический эффект ЛАК превышает эффект, оказываемый CAR-T.

Исследование влияния CAR-T на жизнеспособность клеток

Для исследования влияния CAR-T-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к CA125, на рост клеточных линий, различающихся по экспрессии CA125, проводили мониторинг в режиме реального времени (рис. 2).

Как представлено на рисунке 2, в контрольных образцах наблюдается рост количества жизнеспособных клеток (увеличение показателя клеточного индекса в 3,5 раза). Внесение ЛАК и CAR-T к культуре клеток OVKATE в соотношении 10:1 (500 тыс.) приводит к снижению показателя клеточного индекса, что свидетельствует о снижении количества жизнеспособных клеток в лунках и наличии выраженного цитотоксического эффекта для ЛАК и CAR-T. Через 64 часа после внесения лимфоцитов индекс пролиферации в контрольных образцах более чем в пять раз превышает индекс в образцах с CAR-T-лимфоцитами.

Внесение CAR-T-лимфоцитов и ЛАК в количестве 5:1 (250 тыс.) оказывает менее выраженный цитотоксический эффект, однако показатель клеточного

Таблица 2. Результаты лактатдегидрогеназного теста после 24 и 48 часов инкубации с CAR-T-лимфоцитами и ЛАК по сравнению с контролем на культуры клеток OVCAR-3, OVKATE, MCF-7 и HEK293

Table 2. Results of lactate dehydrogenase test after 24 and 48 hours of incubation with CAR-T lymphocytes and LAK compared with control on OVCAR-3, OVKATE, MCF-7 and HEK293 cell cultures

Клеточная культура / Cell culture	Часы / Hours	Контроль / Control	CAR-T 500 тыс. / CAR-T 500K	CAR-T 250 тыс. / CAR-T 250K	ЛАК 500 тыс. / LAK 500K	ЛАК 250 тыс. / LAK 250K	ANOVA, величина p / ANOVA, p value
OVCAR-3	24 ч / 24 h	1	3,4 ± 0,8 ^a	2,6 ± 0,8 ^a	3,2 ± 0,7 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	<0,05
	48 ч / 48 h	1,3 ± 0,6	5,7 ± 1,4 ^a	4,8 ± 0,4 ^a	6,5 ± 0,9 ^a	5 ± 1,2 ^a	<0,05
OVKATE	24 ч / 24 h	1	4,8 ± 0,6 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	4,9 ± 0,8 ^a	3,7 ± 0,6 ^a	<0,01
	48 ч / 48 h	1,5 ± 0,5	6,1 ± 1,2 ^a	5,6 ± 1,0 ^a	5,9 ± 0,8 ^a	5,5 ± 1,1 ^a	<0,05
MCF-7	24 ч / 24 h	1	1,7 ± 0,6 ^b	1,3 ± 0,4 ^b	3,5 ± 0,9 ^a	2,9 ± 0,5 ^a	<0,05
	48 ч / 48 h	1,4 ± 0,7	3,1 ± 0,5 ^{a, b}	2,8 ± 0,5 ^b	5,8 ± 0,8 ^a	5,2 ± 1,1 ^a	<0,01
HEK293	24 ч / 24 h	1	1,5 ± 0,8 ^b	1,3 ± 0,6 ^b	4,5 ± 0,9 ^a	3,7 ± 0,9 ^a	<0,05
	48 ч / 48 h	1,3 ± 0,6	1,9 ± 0,8 ^b	1,7 ± 0,6 ^b	5,9 ± 1,1 ^a	4,9 ± 0,8 ^a	<0,05

Примечание: CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy, адоптивная Т-клеточная иммунотерапия; ЛАК – лимфокин-активированные киллеры.

^a $p < 0,05$ при сравнении с контролем в апостериорном тесте Тьюки.

^b $p < 0,05$ при сравнении с аналогичной группой ЛАК (250 тыс. или 500 тыс.) в апостериорном тесте Тьюки.

Note: CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy; LAK – Lymphokine-activated killer cells.

^a $p < 0.05$ when compared with control in Tukey's post hoc test.

^b $p < 0.05$ when compared with a similar LAK group (250K or 500K) in Tukey's post hoc test.

индекса в исследуемых лунках также достоверно ниже, чем в контрольных.

При исследовании динамики показателя клеточного индекса на клетках линии OVCAR-3 при воздействии CAR-T и ЛАК получены результаты, аналогичные с данными для OVKATE.

При исследовании культур, не экспрессирующих CA125 (MCF-7 и HEK293), было показано, что при добавлении CAR-T регистрировалось снижение показателя клеточного индекса в 3,5 раза, что демонстрирует выраженный цитотоксический эффект CAR-T. Однако снижение пролиферативной

активности по уровню было близким с воздействием ЛАК и менее выраженным, чем при воздействии CAR-T на культуры OVCAR-3 и OVKATE.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании было показано, что цитотоксическое воздействие CAR-T и ЛАК сопоставимо для культур, не экспрессирующих CA125, при этом CAR-T оказывает специфический эффект в отношении клеток, экспрессирующих CA125.

Технология CAR-T показала высокую эффективность в клинических исследованиях при лечении

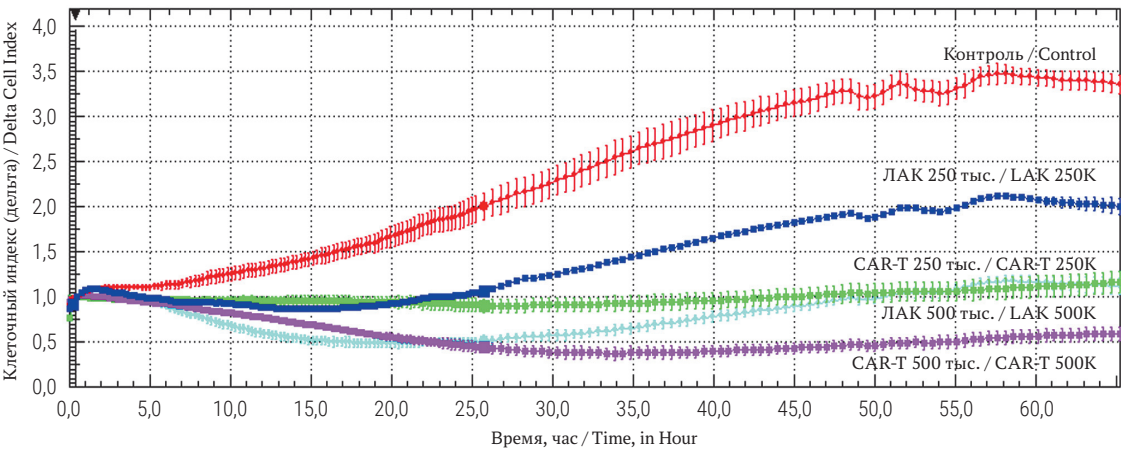


РИС. 2. Динамика количества клеток культуры OVKATE в процессе инкубации с/без CAR-T-лимфоцитами и ЛАК (получена с RTCA iCELLigence).

Примечание: CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy, адоптивная Т-клеточная иммунотерапия; ЛАК – лимфокин-активированные киллеры.

FIG. 2. Dynamics of OVKATE culture cell number during incubation with/without CAR-T lymphocytes and LAK (obtained from RTCA iCELLigence).

Note: CAR-T – Chimeric antigen receptor T-cell therapy; LAK – Lymphokine-activated killer cells.

гемобластозов и включена в протоколы лечения. Однако для солидных опухолей на данный момент еще нет зарегистрированных CAR-T продуктов, разрешенных к медицинскому применению [29].

Тем не менее литературные данные, а также опыт проведенных нами экспериментальных исследований свидетельствуют о высокой перспективности CAR-T по сравнению с ЛАК-терапией, что связано, в первую очередь, с более высокой специфичностью воздействия CAR-T-лимфоцитов [30].

ЛАК способны эффективно воздействовать на клетки опухоли различного гистогенеза, независимо от экспрессии специфических рецепторов на поверхности опухолевой клетки [31]. CAR-T-лимфоцитам требуется наличие специфических рецепторов на поверхности опухолевой клетки для ее активации, благодаря которым они не оказывают цитотоксического воздействия на другие клетки, не экспрессирующие данный рецептор [17, 18]. Эти преимущества CAR-T позволяют применять данный метод при создании таргетных противоопухолевых препаратов не только для CA125-позитивных опухолей, но и против других опухолей, экспрессирующих специфические рецепторы.

В данной работе нами была проведена оценка эффективности CAR-T-лимфоцитов, полученных путем трансфекции плазмидной конструкции третьего поколения, несущей ген *CAR*, специфичный к антигену MUC16 (CAR-CA125) [32]. Исследование цитотоксического действия CAR-T-лимфоцитов на культурах клеток OVCAR-3 и OVKATE показало выраженный специфический цитотоксический эффект. Воздействие CAR-T-лимфоцитов на CA125-негативные клетки, видимо, неспецифично и является проявлением собственной цитотоксичности аллогенных лимфоцитов. В то же время увеличение количества погибших CA125-позитивных клеток от CAR-T по сравнению с воздействием ЛАК может свидетельствовать о наличии специфической токсичности разработанного нами препарата в отношении CA125. Проведенное исследование показало неспецифичность воздействия ЛАК на CA125-негативные и CA125-позитивные

линии, что согласуется с литературными данными и, как следствие, увеличивает риск возникновения побочных эффектов при терапии ЛАК [30, 31]. В то же время в представленном исследовании противоопухолевый эффект, оказываемый CAR-T-лимфоцитами, был пропорционален времени инкубации, что дает основания для возможного снижения количества препарата при получении адекватного цитотоксического эффекта.

Полученные нами результаты показывают важность и необходимость дальнейших исследований разработанного продукта, являющегося потенциальным соматоклеточным лекарственным препаратом на основе CAR-T-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к CA125.

Ограничения исследования

Настоящее исследование было нацелено на оценку конкретного CAR-T продукта, направленного на опухолевый антиген CA125. Потенциальных мишеней для разработки конструкций CAR, а также способов создания CAR-T продукта, существует большое количество, выбор мишени, конструкции CAR, вектора и способа доставки генетического материала во многом определяют свойства полученного продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании был достигнут выраженный специфический цитотоксический эффект *in vitro* вследствие применения анти-CA125 CAR-T-лимфоцитов в отношении CA125-позитивных опухолевых клеточных линий OVCAR-3 и OVKATE, превышающий цитотоксическое воздействие ЛАК. Применение методов МТТ, ЛДГ-тестов и RTCA iCELLigence позволило получить детальное представление о величине противоопухолевого действия разработанного нами препарата CAR-T, направленного на опухолевые клетки, экспрессирующие CA125. На культуры CA125-негативных клеток MCF-7 и HEK293 его цитотоксическое воздействие имеет минимальное значение, а воздействие ЛАК на эти клетки сравнимо с воздействием на OVCAR-3 и OVKATE.

AUTHOR CONTRIBUTION

Tatyana M. Kulinich, Yana Yu. Kiseleva, Alexander M. Shishkin and Elena A. Kudinova equally participated in experimental studies, analyzed the scientific literature, participated in drafting the text of the article. Oksana B. Knyazeva and Rajesh Ranjit analyzed the data obtained, edited the text of the article, prepared illustrations. Vladimir K. Bozhenko developed the concept and design of the study, conducted the guidance of writing the article. Vladimir A. Solodky conducted scientific consulting. All authors approved the final version of the article.

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.М. Кулинич, Я.Ю. Киселева, А.М. Шишкин и Е.А. Кудинова в равной мере участвовали в проведении экспериментальных исследований, провели анализ научной литературы, участвовали в составлении текста статьи. О.Б. Князева и Р. Ранджит провели интерпретацию полученных данных, редактирование рукописи, подготовку иллюстративного материала. В.К. Боженко был ответственным за разработку концепции и дизайна исследования, руководил написанием статьи. В.А. Солодкий проводил научное консультирование. Все авторы утвердили окончательную версию статьи

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zhang J., Li M., Feng L., et al. Laparoscopic versus laparotomic surgical treatment in apparent stage I ovarian cancer: a multi-center retrospective cohort study. *World J Surg Oncol*. 2024 Feb 22; 22(1): 62. <https://doi.org/10.1186/s12957-024-03345-1>. PMID: 38389046; PMCID: PMC10882876
- Jokhadze N., Das A., Dizon D.S. Global cancer statistics: A healthy population relies on population health. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun; 74(3): 224–226. <https://doi.org/10.3322/caac.21838>. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572764
- Котова Е.Г., Папанова Е.К., Адамян Л.В. Своевременное выявление и лечение злокачественных новообразований репродуктивных органов у женщин как резерв роста ожидаемой продолжительности жизни в Российской Федерации. *Проблемы репродукции*. 2023; 29(6): 6–11. <https://doi.org/10.17116/repro2023290616> / Kotova E.G., Papanova E.K., Adamyan L.V. Timely detection and treatment of malignant neoplasms of the reproductive organs in women as a reserve for increasing life expectancy in the Russian Federation. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2023; 29(6): 6–11 (In Russian). <https://doi.org/10.17116/repro2023290616>
- Osann K., Wenzel L., McKinney C., et al. Fear of recurrence, emotional well-being and quality of life among long-term advanced ovarian cancer survivors. *Gynecol Oncol*. 2023 Apr; 171: 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.02.015>. Epub 2023 Mar 9. PMID: 36905875; PMCID: PMC10681156.
- Yu Y., Li X.B., Lin Y.L., et al. Efficacy of 1 384 cases of peritoneal carcinomatosis underwent cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2021 Mar 25; 24(3): 230–239. Chinese. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn.441530-20201110-00603>. PMID: 34645167
- Shan D., Cheng S., Ma Y., Peng H. Serum levels of tumor markers and their clinical significance in epithelial ovarian cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2023 Jul 28; 48(7): 1039–1049. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230090>. PMID: 37724407; PMCID: PMC10930038
- Suzuki T., Conant A., Jung Y., et al. A stem-like patient-derived ovarian cancer model of platinum resistance reveals dissociation of stemness and resistance. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 29; 25(7): 3843. <https://doi.org/10.3390/ijms25073843>. PMID: 38612653; PMCID: PMC11011340
- Torre L.A., Trabert B., DeSantis C.E., et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 July; 68(4): 284–296. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>. Epub 2018 May 29. PMID: 29809280; PMCID: PMC6621554
- Mikuła-Pietrasik J., Witucka A., Pakula M., et al. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Feb; 76(4): 681–697. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2954-1>. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30382284; PMCID: PMC6514066
- Vergote I., Gonzalez-Martin A., Lorusso D., et al. Clinical research in ovarian cancer: consensus recommendations from the Gynecologic Cancer InterGroup. *Lancet Oncol*. 2022 Aug; 23(8): e374–e384. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00139-5). Erratum in: *Lancet Oncol*. 2022 Sep; 23(9): e404. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00502-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00502-2). PMID: 35901833; PMCID: PMC9465953
- Lawton F.G., Pavlik E.J. Perspectives on ovarian cancer 1809 to 2022 and beyond. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Mar 24; 12(4): 791. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040791>. PMID: 35453839; PMCID: PMC9024743
- Sun D., Shi X., Li S., et al. CAR-T cell therapy: a breakthrough in traditional cancer treatment strategies (Review). *Mol Med Rep*. 2024 Mar; 29(3): 47. <https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13171>. Epub 2024 Jan 26. PMID: 38275119; PMCID: PMC10835665
- Wang L., Zhang L., Dunmall L.C., et al. The dilemmas and possible solutions for CAR-T cell therapy application in solid tumors. *Cancer Lett*. 2024 Jun 1; 591: 216871. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216871>. Epub 2024 Apr 10. PMID: 38604310
- Tong C., Zhang Y., Liu Y., et al. Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood*. 2020 October 1; 136(14): 1632–1644. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005278>. PMID: 32556247; PMCID: PMC7596761
- Li Y., Zheng Y., Liu T., et al. The potential and promise for clinical application of adoptive T cell therapy in cancer. *J Transl Med*. 2024 May 1; 22(1): 413. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05206-7>. PMID: 38693513; PMCID: PMC11064426
- Jogalekar M.P., Rajendran R.L., Khan F., et al. CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments. *Front Immunol*. 2022 Jul 22; 13: 925985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925985>. PMID: 35936003; PMCID: PMC9355792
- Flugel C.L., Majzner R.G., Krenciute G., et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023 Jan; 20(1): 49–62. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00704-3>. Epub 2022 Nov 23. PMID: 36418477; PMCID: PMC10278599
- Daei Sorkhabi A., Mohamed Khosroshahi L., Sarkesh A., et al. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies. *Front Immunol*. 2023 Mar 20; 14: 1113882. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1113882>. PMID: 37020557; PMCID: PMC10067596
- Biondi M., Tettamanti S., Galimberti S., et al. Selective homing of CAR-Clk cells to the bone marrow niche enhances control of the acute myeloid leukemia burden. *Blood*. 2023 May 25; 141(21): 2587–2598. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018330>. PMID: 36787509; PMCID: PMC10646802
- Hong Y., Walling B.L., Kim H.R., et al. ST3GAL1 and β II-spectrin pathways control CAR T cell migration to target tumors. *Nat Immunol*. 2023 Jun; 24(6): 1007–1019. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01498-x>. Epub 2023 Apr 17. PMID: 37069398; PMCID: PMC10515092
- Zhang X.W., Wu Y.S., Xu T.M., et al. CAR-T Cells in the treatment of ovarian cancer: a promising cell therapy. *Biomolecules*. 2023 Mar 2; 13(3): 465. <https://doi.org/10.3390/biom13030465>. PMID: 36979400; PMCID: PMC10046142
- Cutri-French C., Nasioudis D., George E., et al. CAR-T Cell Therapy in ovarian cancer: where are we now? *Diagnostics (Basel)*. 2024 Apr 16; 14(8): 819. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14080819>. PMID: 38667465; PMCID: PMC11049291
- Giamougiannis P., Martin-Hirsch P.L., Martin F.L. The evolving role of MUC16 (CA125) in the transformation of ovarian cells and the progression of neoplasia. *Carcinogenesis*. 2021 Apr 17; 42(3): 327–343. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab010>. PMID: 33608706
- Wang C.W., Weaver S.D., Boonpatrawong N., et al. A revised molecular model of ovarian cancer biomarker CA125 (MUC16) enabled by long-read sequencing. *Cancer Res Commun*. 2024 Jan 31; 4(1): 253–263. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0327>. PMID: 38197671; PMCID: PMC10829539
- Lee K., Perry K., Xu M., et al. Structural basis for antibody recognition of the proximal MUC16 ectodomain. *J Ovarian Res*. 2024 Feb 19; 17(1): 41. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01373-9>. PMID: 38374055; PMCID: PMC10875768
- Song Y., Yuan M., Wang G. Update value and clinical application of MUC16 (cancer antigen 125). *Expert Opin Ther Targets*. 2023 Jul-Dec; 27(8): 745–756. <https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2248376>. Epub 2023 Aug 24. PMID: 37584221
- Casey N.P., Kleinmanns K., Forcados C., et al. Efficient CAR T cell targeting of the CA125 extracellular repeat domain of MUC16. *J Immunother Cancer*. 2024 Apr 11; 12(4): e008179. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-008179>. PMID: 38604812; PMCID: PMC11015285
- Боженко В., Кудинова Е., Кулинич Т. и др. Патент РФ RU 2 747 095 C2. Мономолекулярный химерный Т-клеточный рецептор к раковому антигену CA125. Опубликовано: 26.04.2021 Бюл. № 12 / Bozhenko V., Kudinova E., Kulich T., et al. Patent of the Russian Federation RU 2 747 095 C2. Monomolecular chimeric T-cell receptor to cancer antigen CA125. Published: 26.04.2021 Bul. No. 12.

29. Albelda S.M. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn. *Nat Rev Clin Oncol*. 2024 Jan; 21(1): 47–66. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00832-4>. Epub 2023 Oct 30. PMID: 37904019
30. Wang Y., Suarez E.R., Kastrunes G., et al. Evolution of cell therapy for renal cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2024 Jan 9; 23(1): 8. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01911-x>. PMID: 38195534; PMCID: PMC10775455
31. Wendel P., Reindl L.M., Bexte T., et al. Arming immune cells for battle: a brief journey through the advancements of T and NK cell immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 23; 13(6): 1481. <https://doi.org/10.3390/cancers13061481>. PMID: 33807011; PMCID: PMC8004685
32. Киселева Я.Ю., Большакова О.Б., Кулинич Т.М. и др. Сравнение эффективности плазмид 1 и 3 поколения, кодирующих химерный Т-клеточный рецептор к опухолевому маркеру рака яичников. *Вестник Российского Научного Центра Рентгенодиагностики*. 2021; 21(2): 25–40 / Kiseleva Y.Y., Bolshakova O.B., Kulinich T.M., et al. Comparison of the efficiency of 1st and 3rd generation plasmids encoding a chimeric Tcell receptor for a tumor marker of ovarian cancer. *Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology*. 2021; 21(2): 25–40

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кулинич Татьяна Михайловна[✉], канд. мед. наук, заведующая лабораторией иммунологии и онкоцитологии научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>

Киселева Яна Юрьевна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории иммунологии и онкоцитологии научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>

Шишкин Александр Михайлович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и онкоцитологии научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4492-9543>

Кудинова Елена Александровна, д-р мед. наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

Князева Оксана Борисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточной и генной терапии ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>

Ранджит Раджеш, аспирант, ассистент кафедры онкологии и рентгенодиагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; врач-онколог ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая онкологическая больница № 1 ДЗМ».

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4255-4197>

Боженко Владимир Константинович, д-р мед. наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>

Солодкий Владимир Алексеевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

Tatyana M. Kulinich[✉], Cand. of Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Immunology and Oncocytology, Research Department of Molecular Biology and Experimental Therapy of Tumors, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>

Yana Yu. Kiseleva, Cand. of Sci. (Medicine), Researcher, Laboratory of Immunology and Oncocytology, Research Department of Molecular Biology and Experimental Therapy of Tumors, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>

Alexander M. Shishkin, Cand. of Sci. (Medicine), Senior researcher, Laboratory of Immunology and Oncocytology, Research Department of Molecular Biology and Experimental Therapy of Tumors, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4492-9543>

Elena A. Kudinova, Dr. of Sci. (Medicine), Head of the Clinical and Diagnostic Laboratory, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

Oksana B. Knyazeva, Junior researcher, Laboratory of Cell and Gene Therapy, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>

Ranjit Rajesh, postgraduate student, Assistant Professor, Department of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine, Peoples' Friendship University of Russia; oncologist, Municipal Clinical Hospital Number 1 of the Moscow City Health Department.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4255-4197>

Vladimir K. Bozhenko, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Head of the Research Department of Molecular Biology and Experimental Tumor Therapy, Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>

Vladimir A. Solodky, Academician of the RAS, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Director of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

✉ Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



Жирно-кислотный состав сыворотки крови и мембран эритроцитов у мужчин со стеатозом и стеатогепатитом с нормальной активностью трансаминаз

М.В. Кручинина^{1,2,✉}, М.Ф. Осипенко², А.А. Шестов³, М.В. Паруликова¹

¹ НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»

ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, г. Новосибирск, 630089, Россия

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Красный проспект, д. 52, г. Новосибирск, 630091, Россия

³ Медицинская школа Перельмана, университет Пенсильвании

3400 Civic Center Boulevard Building, Филадельфия, Пенсильвания, 19104, США

Аннотация

Цель исследования – изучить особенности профиля жирных кислот (ЖК) сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с двумя формами жировой болезни печени смешанного генеза (метаболическая и алкогольная): стеатозом и стеатогепатитом с нормальной активностью трансаминаз.

Материалы и методы. Обследованы 33 мужчины (50,7 ± 9,6 года) с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболическая и алкогольная) со степенью фиброза F ≤ 1 (FibroTest). По результатам ActiTest пациенты были разделены на группы стеатоза – с минимальной (A0–1) активностью (n = 17) и стеатогепатита – с умеренной/выраженной (A2–3) некровоспалительной активностью (n = 16). Исследование состава ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов проведено с помощью газовой хроматографии / масс-спектрометрии Agilent 7000B (Agilent Technologies, Inc., США). Применены методы непарной статистики с использованием volcano plot и дискриминантного анализа на основе ортогональных наименьших квадратов (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA), ROC-анализ.

Результаты. Анализ volcano plot показал, что у пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболическая и алкогольная) с нормальной активностью трансаминаз в группе стеатогепатита сывороточные уровни стеариновой C18:0 (p = 0,016), арахиновой C20:0 (p = 0,023) кислот, соотношение насыщенные/полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (p = 0,001) были статистически значимо выше, чем в группе стеатоза. Суммарное содержание в сыворотке крови всех ПНЖК (p = 0,003), маргариновой C17:0 (p = 0,011), суммы двух омега-3 ПНЖК – эйкозапентаеновой (C20:5n-3) и докозагексаеновой (C22:6n-3) (p = 0,04), суммарное содержание всех омега-3 ПНЖК (p = 0,042) были статистически значимо ниже в группе стеатогепатита. OPLS-DA продемонстрировал достаточно точное разделение стеатогепатита и стеатоза при использовании отдельных ЖК и их соотношений. При включении в анализ отдельных ЖК и их соотношений получена модель с AUC = 0,827 (95% доверительный интервал 0,499–1,0), чувствительностью 82,2% и специфичностью 80,7%.

Заключение. ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов представляются перспективными биомаркерами стеатогепатита при нормальном уровне трансаминаз.

Ключевые слова: жировая болезнь печени; метаболический и алкогольный генез; стеатогепатит; жирные кислоты; эритроциты; сыворотка крови

Рубрики MeSH:

ПЕЧЕНИ ЖИРОВАЯ ДИСТРОФИЯ – МЕТАБОЛИЗМ

ТРАНСАМИНАЗЫ – КРОВЬ

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – КРОВЬ

ЭРИТРОЦИТА МЕМБРАНА

Для цитирования: Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Шестов А.А., Паруликова М.В. Жирно-кислотный состав сыворотки крови и мембран эритроцитов у мужчин со стеатозом и стеатогепатитом с нормальной активностью трансаминаз. Сеченовский вестник. 2024; 15(2): 48–60. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.48-60>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Кручинина Маргарита Витальевна, д-р мед. наук, доцент, заведующая и ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»; профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Адрес: ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, г. Новосибирск, 630089, Россия

E-mail: kruchmargo@yandex.ru

Соответствие принципам этики. Исследование проведено в соответствии с разрешением Локального этического комитета НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» № 122-29.11.2016. Все пациенты, включенные в исследование, дали письменное информированное согласие на участие в работе.

Доступ к данным исследования. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить у авторов по обоснованному запросу.

Данные и статистические методы, представленные в статье, прошли статистическое рецензирование редактором журнала – сертифицированным специалистом по биостатистике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетной темы «Изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их ранней диагностике и профилактике», 2024–2028 гг. (FWNR-2024-0004).

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность Соколовой А.С., канд. хим. наук, научному сотруднику лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН» за помощь в подготовке образцов для проведения исследования жирных кислот эритроцитов и Шашкову М.В., канд. хим. наук, научному сотруднику аналитической лаборатории ФГБУН «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения РАН» за исследование содержания жирных кислот.

Поступила: 12.04.2024

Принята: 13.05.2024

Дата печати: 15.07.2024

Fatty acid composition of blood serum and erythrocyte membranes in men with steatosis and steatohepatitis with normal transaminase activity

Margarita V. Kruchinina^{1,2,✉}, Marina F. Osipenko², Alexander A. Shestov³,
Marina V. Parulikova¹

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
175/1, Boris Bogatkov str., Novosibirsk, 630089, Russia

² Novosibirsk State Medical University

52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia

³ Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania
3400 Civic Center Boulevard Building, Philadelphia, PA 19104, USA

Abstract

Aim. To study the characteristics of the fatty acid (FA) profile of blood serum and erythrocyte membranes in patients with two forms of fatty liver disease (metabolic + alcoholic): steatosis and steatohepatitis with normal transaminase activity.

Materials and methods. We examined 33 men (50.7 ± 9.6 years) with fatty liver disease (metabolic and alcoholic) with fibrosis $F \leq 1$ (FibroTest). According to the ActiTest results, patients were divided into groups of steatosis – with minimal (A0–1) activity ($n = 17$) and steatohepatitis – with moderate/severe (A2–3) necroinflammatory activity ($n = 16$). The FA composition of blood serum and erythrocyte membranes was studied using gas chromatography/mass

spectrometry Agilent 7000B (Agilent Technologies, Inc., USA). Methods of unpaired statistics using volcano plot and discriminant analysis based on orthogonal least squares (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA), ROC analysis were applied.

Results. Volcano plot analysis showed that in patients with fatty liver disease (metabolic and alcoholic) with normal transaminase activity, serum levels of stearic C18:0 ($p = 0.016$), arachidic C20:0 ($p = 0.023$), ratio saturated / polyunsaturated fatty acids (PUFA) ($p = 0.001$) were statistically significantly higher in the steatohepatitis group compared with the steatosis group. The total content in the blood serum of all PUFA ($p = 0.003$), margaric C17:0 ($p = 0.011$), the sum of two omega-3 PUFA – eicosapentaenoic acid (C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3) ($p = 0.04$), the total content of all omega-3 PUFA ($p = 0.042$) were statistically significantly lower in patients with steatohepatitis. OPLS-DA demonstrated fairly accurate separation of steatohepatitis and steatosis using individual FA and their ratios. When individual FA and their ratios were included in the analysis, a model was obtained with AUC = 0.827 (95% confidence interval 0.499–1.0), sensitivity 82.2% and specificity 80.7%.

Conclusion. FA in blood serum and erythrocyte membranes appear to be promising biomarkers of steatohepatitis with normal levels of transaminases.

Keywords: fatty liver disease; metabolic and alcoholic genesis; steatohepatitis; fatty acids; red blood cells; blood serum

MeSH terms:

FATTY LIVER – METABOLISM

TRANSAMINASES – BLOOD

FATTY ACIDS – BLOOD

ERYTHROCYTE MEMBRANE

For citation: Kruchinina M.V., Osipenko M.F., Shestov A.A., Parulikova M.V. Fatty acid composition of blood serum and erythrocyte membranes in men with steatosis and steatohepatitis with normal transaminase activity. Sechenov Medical Journal. 2024; 15(2): 48–60. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2024.15.2.48-60>

CONTACT INFORMATION:

Margarita V. Kruchinina, Dr. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Head and Leading Researcher of the Gastroenterology Laboratory, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University.

Address: Boris Bogatkov str., 175/1, Novosibirsk, 630089, Russia

E-mail: kruchmargo@yandex.ru

Ethics statements. The study was conducted in accordance with the permission of the Local Bioethics Ethical Committee of the Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, No. 122, of 29.11.2016. Written informed consent was obtained from all patients included in the study.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Data and statistical methods used in the article were examined by a professional biostatistician on the Sechenov Medical Journal editorial staff.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out under the State assignment within the budget theme “Study of molecular genetics and molecular biological mechanisms of development of common therapeutic diseases in Siberia to improve approaches to their early diagnosis and prevention”, 2024–2028. (FWNR-2024-0004).

Acknowledgments. The authors express their deep gratitude to A.S. Sokolova, Cand. of Sci. (Chemistry), researcher at the Laboratory of Physiologically Active Substances of the Novosibirsk Institute of Organic Chemistry named after N.N. Vorozhtsov, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences for assistance in preparing samples for the study of erythrocyte fatty acids; M.V. Shashkov, Cand. of Sci. (Chemistry), researcher at the Analytical Laboratory of the Institute of Catalysis named after G.K. Boreskov, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences for the study of fatty acid content.

Received: 12.04.2024

Approved: 13.05.2024

Date of publication: 15.07.2024

Список сокращений:

AUC – площадь под ROC-кривой

АЛТ – аланиновая аминотрансфераза

АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза

ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза

ДИ – доверительный интервал

ЖБП – жировая болезнь печени

ЖК – жирные кислоты

ИМТ – индекс массы тела

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

НЖК – насыщенные жирные кислоты

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

СД2 – сахарный диабет 2-го типа

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является наиболее распространенным хроническим заболеванием печени во всем мире, от которого страдает 25–33% населения земного шара [1]. НАЖБП охватывает широкий гистологический спектр: от простого стеатоза, который часто имеет доброкачественное течение, до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), характеризующегося повышенным риском прогрессирования, до цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [2]. НАСГ ассоциирован с высокой частотой сердечно-сосудистой смертности независимо от традиционных факторов риска [3], опасностью развития сахарного диабета 2-го типа (СД2) [4], с более высокой распространенностью и частотой формирования хронической болезни почек [5].

«Золотым стандартом» диагностики стеатогепатита, несмотря на множество недостатков, включая инвазивность, ошибки отбора проб, высокую стоимость, риск развития осложнений, различия в интерпретации гистологической картины, в настоящее время остается гистологическая оценка при проведении биопсии печени и обнаружение не только накопления липидов, но и баллонной дистрофии гепатоцитов и признаков лобулярного воспаления [6, 7].

Существующие методы визуализации, включая ультразвуковое исследование печени, компьютерную томографию, магнитно-резонансную томографию, определение САР-функции (Controlled Attenuation Parameter, параметр контролируемого затухания в ткани печени) при выполнении эластометрии печени, не позволяют четко дифференцировать стеатоз от стеатогепатита [2].

Широко используемая в рутинной практике активность аминотрансфераз как показатель воспаления имеет существенные ограничения: у 13–27% пациентов с НАСГ значения аланиновой аминотрансферазы (АЛТ) находятся в пределах референсных значений [8].

Для диагностики стеатогепатита также предложен ряд сывороточных тестов, основанных на измерении нескольких биохимических показателей: ActiTest в составе FibroTest, NashTest, AshTest в составе FibroMax [9]. Несмотря на то что эти тесты имеют ограничения по диагностической точности, в ряде исследований показана возможность использования, в частности, ActiTest для неинвазивного определения степени воспалительной активности при НАЖБП [10, 11].

В качестве биомаркеров жировой болезни печени (ЖБП) различного генеза нами предложено использовать жирные кислоты (ЖК) мембран эритроцитов и сыворотки крови. Так, модель, включавшая уровни элаидиновой (C18:1;t9), маргариновой (C17:0), стеариновой (C18:0), α -линоленовой (C18:3n-3), пальмитолеиновой (C16:1;9) и эйкозапентаеновой (C20:5n-3) кислот в мембранах эритроцитов, показала высокую диагностическую точность с площадью под ROC-кривой (AUC) 0,914 (95% доверительный интервал (95% ДИ) 0,602–0,976), для разделения пациентов с алкогольной и неалкогольной этиологией ЖБП [12]. Смешанный генез ЖБП (метаболический и алкогольный) по сравнению только с метаболическим или алкогольным был ассоциирован с большей степенью ненасыщенности ЖК мембран эритроцитов [12].

В представленной работе мы поставили цель: изучить особенности профиля ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с двумя формами ЖБП смешанного генеза (метаболическая и алкогольная): стеатозом и стеатогепатитом с нормальной активностью трансаминаз

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено одномоментное исследование со сплошным набором пациентов на базе гастроэнтерологического отделения ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск» в период с 1 января по 31 декабря 2023 года. Учитывая вариабельность состава ЖК у женщин в зависимости от фазы гормонального цикла, в исследование включались только мужчины.

Критериями включения в исследование служили: возраст от 18 лет и старше; мужской пол; признаки ЖБП по данным ультразвукового исследования органов брюшной полости (диффузная гиперэхогенность паренхимы печени и неоднородность ее структуры, нечеткость и/или подчеркнутость сосудистого рисунка, дистальное затухание эхосигнала); индекс стеатоза печени FLI (Fatty liver index) > 60; степень фиброза печени F $\leq$ 1 по данным алгоритма FibroTest (BioPredictive, Франция); активность аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) < 40 Ед/л; наличие метаболического синдрома согласно Рекомендациям экспертов ВНОК¹, употребление алкоголя в дозах, опасных для здоровья (значение The

¹ Национальные рекомендации по диагностике и лечению метаболического синдрома. 2009. URL: http://www.scardio.ru/content/images/recommendation/nacionalnye_rekomendacii_po_diagnostike_i_lecheniyu_metabolicheskogo_sindroma.pdf (дата обращения: 13.01.2024).

Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) ≥ 8); воздержание от приема алкоголя в течение ≥ 7 дней до включения в исследование; подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: наличие дополнительной этиологии заболевания печени (вирусы гепатитов, лекарства, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, болезнь Вильсона, гемохроматоз); парентеральное питание; сахарный диабет 1-го типа; доказанные генетические причины стеатоза печени; желчнокаменная болезнь или билиарный сладж; прием биологически активных добавок, содержащих омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), статинов; общий холестерин сыворотки ≥ 8 ммоль/л, холестерин липопротеинов низкой плотности ≥ 5 ммоль/л; наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии, злокачественных опухолей.

Исходно оценено 56 мужчин с ЖБП смешанного генеза (метаболическая и алкогольная). Критерии исключения имели 23 пациента. В исследование включены 33 мужчины ($50,7 \pm 9,6$ года). Поточковая диаграмма включения пациентов представлена на рисунке 1.

Степень некровоспалительной активности в печени определена с помощью расчетного алгоритма ActiTest в составе FibroTest (BioPredictive, Франция). По результатам этого теста пациенты были разделены на группы стеатоза – с минимальной (A0–1) активностью по ActiTest ($n = 17$) и стеатогепатита – с умеренной/выраженной (A2–3) некровоспалительной активностью ($n = 16$).

В группах оценивались: возраст, окружность талии, индекс массы тела (ИМТ), наличие избыточной массы тела / ожирения, СД2/предиабета (нарушенная гликемия натощак, нарушенная толерантность к глюкозе), артериальной гипертензии, прием сахароснижающих и антигипертензивных препаратов, паттерн потребления алкоголя (частота, разовая и недельная дозы, характер напитков, стаж), биохимические параметры: общий белок, альбумин, АЛТ, АСТ, гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), щелочная фосфатаза, общий и прямой билирубин, липидный профиль (общий холестерин, холестерин липопротеинов высокой и низкой плотности, триглицериды), креатинин, мочевая кислота, концентрация гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов.

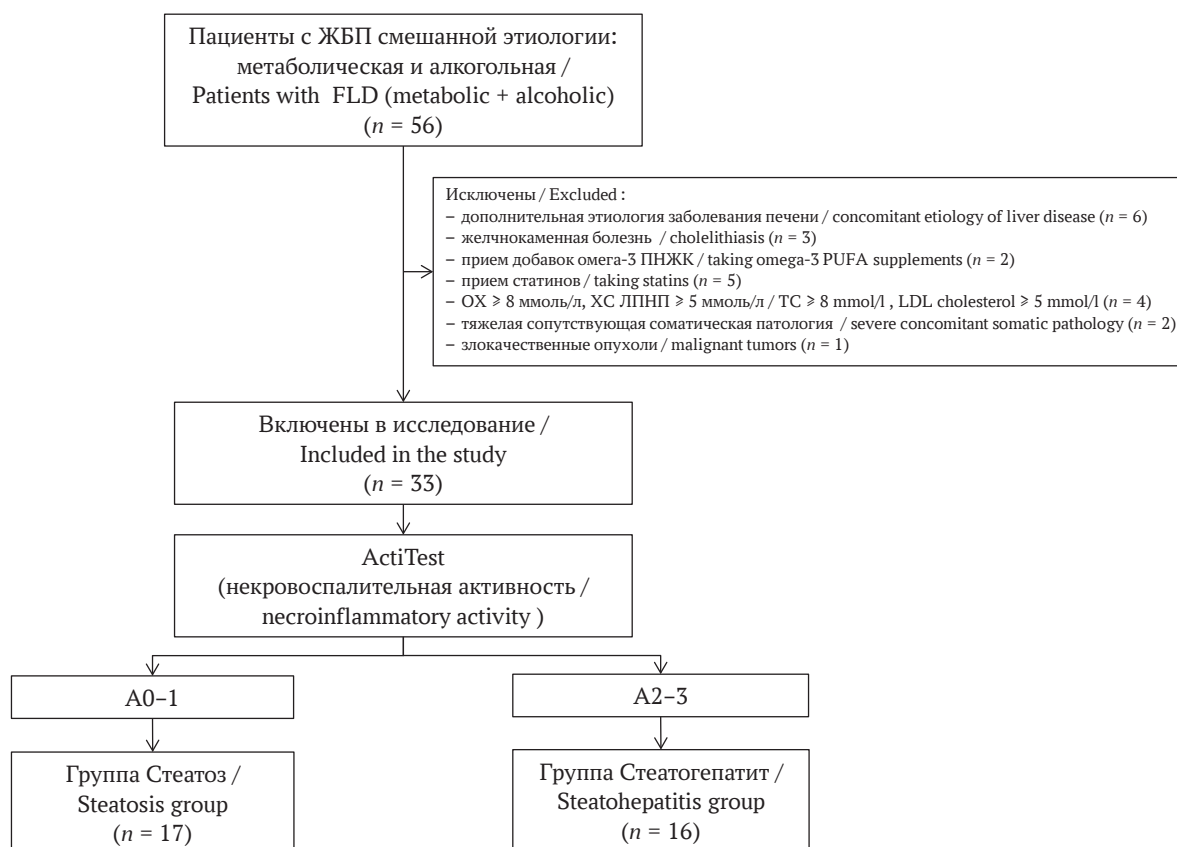


РИС. 1. Поточковая диаграмма включения пациентов в исследование.

Примечание: ЖБП – жировая болезнь печени; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ОХ – общий холестерин; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности.

FIG. 1. Flow diagram of patient enrollment in the study.

Note: FLD – fatty liver disease; PUFA – polyunsaturated fatty acids; TC – total cholesterol; LDL cholesterol – low-density lipoprotein cholesterol.

Исследование состава жирных кислот

Состав ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов изучен с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии с использованием системы на основе трех квадруполов Agilent 7000B (Agilent Technologies, Inc., США). Концентрации ЖК выражали в относительных процентах. Предел обнаружения ЖК составил ~ 1 мкг на образец.

В мембранах эритроцитов и сыворотке крови произведено определение 18 жирных кислот, относящихся к разным классам: насыщенные жирные кислоты (НЖК) (C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C20:0), мононенасыщенные (C16:1;7, C16:1;9, C18:1;9, C18:1;7), полиненасыщенные, в том числе омега-3 ПНЖК (C18:3n-3, C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3) и омега-6 ПНЖК (C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6), их суммарных содержаний, а также их соотношений: НЖК/ненасыщенные ЖК, НЖК/ПНЖК, омега-6/омега-3 ПНЖК.

Статистический анализ

При выполнении статистической обработки данных определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартное отклонение (standard deviation, SD) ($M \pm SD$). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t -тест Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального, вычислялись медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля), при сравнении групп использовались непараметрические критерии (U -критерий Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса). Оценка статистической значимости различий относительных показателей проведена с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

Проведен корреляционный анализ и рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена для оценки связи между концентрацией ЖК и ИМТ, ожирением, паттерном употребления алкоголя, уровнем АЛТ, АСТ, билирубина. Для оценки силы связи применена шкала Чеддока: при значениях коэффициентов 0–0,3 связь оценена как очень слабая; 0,3–0,5 – слабая; 0,5–0,7 – средняя; 0,7–0,9 – высокая; 0,9–1 – очень высокая.

Для определения потенциальных биомаркеров стеатогепатита проведена процедура нормализации концентрации ЖК по медиане с последующим применением методов непарной статистики с использованием volcano plot и дискриминантного анализа на основе ортогональных наименьших квадратов (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA).

Оценка диагностической точности произведена с помощью ROC-анализа. Рассчитана чувствительность, специфичность и AUC. Качество модели оценивалось как отличное при значениях AUC – 0,9–1,0;

очень хорошее – 0,8–0,9; хорошее – 0,7–0,8; среднее – 0,6–0,7; неудовлетворительное – менее 0,5.

Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для статистической обработки использовалось программное обеспечение MATLAB R2019a (MathWorks, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая характеристика групп

Клинико-биохимические показатели пациентов исследуемых групп представлены в таблице 1.

Пациенты со стеатозом и стеатогепатитом были сопоставимы по возрасту, все обследованные имели избыточную массу тела или абдоминальное ожирение. Вместе с тем в группе со стеатогепатитом оказалась большей доля лиц с СД2 и предиабетом ($p < 0,05$) и более высокими уровнями гликемии натощак ($p < 0,05$).

Показатели липидного профиля, пуринового обмена не различались между группами. Большая часть пациентов обеих групп принимала гипотензивные препараты (сартаны, блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы), гипогликемические средства (метформин), без значимых различий между группами.

Паттерн приема алкоголя: частота, характер алкогольных напитков, разовая доза и стаж не различались между группами со стеатозом и стеатогепатитом. Половина пациентов ($n = 8$) в группе стеатогепатита и 7 (41%) в группе стеатоза употребляли алкоголь два и более раз в неделю. Больше половины пациентов – 10 (59%) в группе стеатоза и 11 (69%) в группе стеатогепатита принимали крепкие алкогольные напитки. Недельная доза потребляемого алкоголя в группе стеатогепатита оказалась в два раза выше, чем в группе стеатоза, – 240 г vs. 120 г ($p < 0,05$).

Группы статистически значимо не различались по параметрам общего анализа крови, индексу стеатоза печени FLI (Fatty liver index). Показатели общего белка, альбумина, билирубина, креатинина находились в пределах референсных значений без различий между группами. Активности АЛТ и ГГТ в группе со стеатогепатитом оказались статистически значимо выше, чем у пациентов со стеатозом ($p = 0,037$, $p < 0,0001$ соответственно), причем для АЛТ эти различия выявлены внутри референсных значений, активность же ГГТ в группе стеатогепатита превышала референсные значения в 1,5 раза. Показатели АСТ и ЩФ не отличались между группами и находились в пределах референсных значений.

Жирные кислоты сыворотки крови и мембран эритроцитов

После нормализации концентрации жирных кислот по медиане использован метод volcano plot, который объединил результаты анализа кратных изменений и T -тестов в один график и позволил выбрать ЖК

Таблица 1. Общая характеристика пациентов со стеатозом и стеатогепатитом
Table 1. General characteristics of the patients with steatosis and steatohepatitis

Показатели / Indicators	Стеатоз / Steatosis (n = 17)	Стеатогепатит / Steatohepatitis (n = 16)	Значение p / p value
Возраст, лет / Age, years	48,47 ± 9,4	54,8 ± 8,9	n.s.
ИМТ, кг/м ² / BMI, kg/m ²	28,7 (26,8; 32,3)	28,7 (26,3; 33,1)	n.s.
Окружность талии, см / Waist circumference, cm	116,2 (111; 123)	117,7 (112; 124)	n.s.
Избыточная масса тела, n (%) / Overweight, n (%)	9 (53%)	7 (44%)	n.s.
Ожирение, n (%) / Obesity, n (%)	8 (47%)	9 (56%)	n.s.
СД2 и НГН / НГТ / T2DM and IFG / IGT, n (%)	6 (35%)	12 (75%)	<0,05
Метформин, n (%) / Metformin, n (%)	3 (18%)	4 (25%)	n.s.
Артериальная гипертензия, n (%) / Arterial hypertension, n (%)	16 (94%)	16 (100%)	n.s.
Гипотензивная терапия, n (%) / Antihypertensive therapy, n (%)	10 (59%)	10 (63%)	n.s.
Паттерн потребления алкоголя / Alcohol consumption patterns			
≥2 раз в неделю, n (%) / ≥2 times a week, n (%)	7 (41%)	8 (50%)	n.s.
крепкие напитки / strong alcoholic drinks	10 (59%)	11 (69%)	n.s.
разовая доза, г чистого этанола / single dose, g of pure ethanol	75 (50; 120)	100 (65; 165)	n.s.
недельная доза, г чистого этанола / weekly dose, g of pure ethanol	120 (50; 180)	240 (140; 440)	<0,05
стаж, лет / alcohol consumption experience, years	12 (8; 20)	13,5 (11; 16)	n.s.
Эритроциты, ×10 ¹² /л / Red blood cells, ×10 ¹² /l	5,2 (4,8; 5,4)	4,8 (4,52; 5,3)	n.s.
Гемоглобин, г/л / Hemoglobin, g/l	157 (147,5; 165,5)	153 (138,2; 162,4)	n.s.
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л / White blood cells, ×10 ⁹ /l	6,8 (5,6; 7,85)	7,7 (6,5; 8,2)	n.s.
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л / Platelets, ×10 ⁹ /l	231 (175,5; 245)	221 (196; 253,5)	n.s.
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	69 (66; 72)	69 (69; 70,7)	n.s.
Альбумин, г/л / Albumin, g/l	43 (42; 45)	43 (42; 43)	n.s.
АЛТ, Ед/л / ALT, U/l	19,5 (15; 31,7)	28 (21,5; 34)	<0,05
АСТ, Ед/л / AST, U/l	19,5 (14; 21)	23 (20; 35)	n.s.
ГГТ, Ед/л (референсные значения 11–50 Ед/л) / GGT, U/l (Reference range (11–50 U/l))	22 (19; 27,7)	77 (56; 83,5)	<0,001
Щелочная фосфатаза, Ед/л (референсные значения 60–275 Ед/л) / Alkaline phosphatase, U/l (Reference range (60–275 U/l))	155 (134; 177)	149 (71,3; 185)	n.s.
Общий билирубин, мкмоль/л / Total bilirubin, μmol/l	10 (7,2; 11,9)	13,4 (11,8; 17,8)	n.s.
Прямой билирубин, мкмоль/л / Direct bilirubin, μmol/l	3,5 (2,3; 4,2)	2,2 (1,8; 3,7)	n.s.
Глюкоза венозной крови натощак, ммоль/л / Fasting venous blood glucose, mmol/l	6,3 (5,4; 6,5)	6,9 (6,2; 10,5)	<0,05
Общий холестерин, ммоль/л / Total cholesterol, mmol/l	6,1 (4,6; 7,11)	5,1 (4,2; 6,1)	n.s.
Триглицериды, ммоль/л / Triglycerides, mmol/l	1,4 (1,3; 2,8)	1,9 (1,0; 2,9)	n.s.
ХС ЛПВП, ммоль/л / HDL cholesterol, mmol/l	1,1 (1,0; 1,15)	1,07 (0,83; 1,2)	n.s.
ХС ЛПНП, ммоль/л / LDL cholesterol, mmol/l	4,1 (3,3; 5,6)	3,6 (2,5; 5,1)	n.s.
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, μmol/l	83 (76; 87)	80 (75,3; 90)	n.s.
Мочевая кислота, мг/дл / Uric acid, mg/dl	356 (351; 412)	353 (317; 407)	n.s.
Индекс стеатоза печени / Fatty liver index	79,3 ± 8,3	88,5 ± 13,6	n.s.

Примечание: n.s. – not significant, не значимо; ИМТ – индекс массы тела; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; НГН – нарушенная гликемия натощак, НГТ – нарушенная толерантность к глюкозе; АЛТ – аланиновая аминотрансфераза; АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза; ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности.

Note: n.s. – not significant; BMI – body mass index; T2DM – type 2 diabetes mellitus; IFG – Impaired fasting glucose, IGT – impaired glucose tolerance; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; GGT – gamma-glutamyltransferase; HDL cholesterol – high density lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol – low-density lipoprotein cholesterol.

и их соотношения с наиболее значимыми различиями между группами пациентов со стеатогепатитом и стеатозом. Результаты представлены в таблице 2.

Группа стеатогепатита статистически значимо отличалась от группы стеатоза более высокой сывороточной концентрацией как отдельных ЖК:

стеариновой (C18:0), арахидовой (C20:0), так и соотношением НЖК/ПНЖК. Одновременно с этим в группе стеатогепатита сывороточная концентрация маргариновой ЖК (C17:0), суммарное содержание ПНЖК, сумма двух n-3 ПНЖК (C20:5n-3 + C22:6n-3), всех n-3 ПНЖК были статистически значимо ниже, чем

Таблица 2. Результаты volcano plot анализа жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов и их соотношений
Table 2. Results of volcano plot analysis of fatty acids of blood serum and erythrocyte membranes and their ratios

Жирные кислоты / Fatty acids	Кратность изменений / Frequency of changes	log2	Значения p / p value	$-\log_{10}(p)$
Сывороточные / Serum				
НЖК/ПНЖК / SFA/PUFA	1,879	1,582	0,001	2,838
ПНЖК / PUFA	1,766	-1,365	0,003	2,537
Стеариновая (C18:0) / Stearic (C18:0)	1,586	0,665	0,016	1,785
Маргариновая (C17:0) / Margaric (C17:0)	1,473	-0,596	0,011	1,736
Арахидовая (C20:0) / Arachidic (C20:0)	1,509	0,587	0,023	1,631
омега-3 ПНЖК (C20:5n-3+C22:6n-3) / n-3 PUFA (C20:5n-3+C22:6n-3)	0,635	-0,622	0,040	1,394
омега-3 ПНЖК / n-3 PUFA	0,655	-0,611	0,042	1,375
Эйкозапентаеновая (C20:5n-3) / Eicosapentaenoic (C20:5n-3)	0,423	-1,240	0,051	1,288
Пальмитолеиновая (C16:1;9) / Palmitoleic (C16:1;9)	0,666	-0,587	0,058	1,244
Эритроцитарные / Red blood cells				
Эйкозапентаеновая (C20:5n-3) / Eicosapentaenoic (C20:5n-3)	0,624	-0,681	0,051	1,297

Примечание: НЖК – насыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.
 Note: SFA – saturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids.

в группе стеатоза. Сывороточная концентрация пальмитолеиновой (C16:1;9) и эйкозапентаеновой кислот (C20:5n-3) и концентрация эйкозапентаеновой кислоты (C20:5n-3) в мембранах эритроцитов оказались ниже при стеатогепатите по сравнению со стеатозом, значимость различий близка к принятому уровню.

Проведение дискриминантного анализа OPLS-DA продемонстрировало достаточно точное разделение стеатогепатита и стеатоза при использовании вышеописанных биомаркеров (рис. 2).

ROC-анализ, построенный на исход «стеатогепатит», показал хорошее качество модели для суммарного содержания ПНЖК сыворотки крови: AUC 0,785 (95% ДИ 0,634–0,918), чувствительность 62,5%, специфичность 88,9%; для стеариновой кислоты (C18:0) сыворотки: AUC 0,788 (95% ДИ 0,634–0,92), чувствительность 75%, специфичность 72,2%; для арахидовой кислоты (C20:0) сыворотки: AUC 0,753 (95% ДИ 0,567–0,895), чувствительность 75%, специфичность 77,8%. Для суммарного содержания двух омега-3 ПНЖК в сыворотке – C20:5n-3 и C22:6n-3 получена модель среднего качества: AUC 0,694 (95% ДИ 0,516–0,866), чувствительность 62,5%, специфичность 66,7% (рис. 3).

При создании диагностической панели с включением в ее состав содержания совокупности ЖК и их соотношений получена модель очень хорошего качества: площадь под кривой увеличилась до 0,827 (95% ДИ 0,499–1,0); чувствительность составила 82,2%, специфичность – 80,7% (рис. 3).

Установлена слабая корреляция активности АЛТ с суммарным количеством НЖК сыворотки ($r = 0,466$, $p = 0,011$), с соотношением НЖК/ПНЖК ($r = 0,472$, $p = 0,01$); активности АСТ – с сывороточным уровнем маргариновой ЖК (C17:0) – $r = -0,334$, $p = 0,048$; активности ГГТ – с уровнем стеариновой ЖК (C18:0) в сыворотке крови – $r = 0,386$, $p = 0,038$,

с суммарным содержанием сывороточных НЖК – $r = 0,450$, $p = 0,010$, с соотношением НЖК/ПНЖК – $r = 0,391$, $p = 0,036$. Выявлены слабые обратные ассоциации между концентрацией общего и прямого билирубина и содержанием эйкозапентаеновой ЖК (C20:5n-3) в сыворотке крови – $r = -0,329$, $p = 0,041$ и $r = -0,391$, $p = 0,037$ соответственно.

Выявлены слабые прямые корреляции суммы сывороточных НЖК с ИМТ ($r = 0,447$, $p = 0,015$), наличием СД2 ($r = 0,437$, $p = 0,018$). Прямая слабая корреляция установлена между наличием СД2 и сывороточным уровнем арахидовой кислоты (C20:0). Уровень пальмитолеиновой ЖК (C16:1;9) прямо коррелировал с концентрацией общего холестерина ($r = 0,417$, $p = 0,025$), триглицеридов ($r = 0,617$, $p = 0,0001$). Соотношение НЖК/ПНЖК также оказалось прямо связанным с уровнем глюкозы крови натощак ($r = 0,437$, $p = 0,018$), с большей силой связи – с уровнем триглицеридов ($r = 0,652$, $p = 0,0001$). Напротив, с суммарным содержанием ПНЖК связи показателей метаболических нарушений были обратными: для ИМТ – $r = -0,454$, $p = 0,013$, для СД 2 – $r = -0,443$, $p = 0,018$, для уровня триглицеридов – $r = -0,723$, $p = 0,0001$.

Среди НЖК сывороточная маргариновая (C17:0) слабо обратно коррелировала с разовой дозой потребляемого алкоголя ($r = -0,422$, $p = 0,023$). Выявлена слабая ассоциация сывороточного содержания пальмитолеиновой кислоты (C16:1;9) с частотой потребления алкоголя ($r = 0,371$, $p = 0,048$). Наблюдалась слабая обратная корреляция суммарных концентраций сывороточных омега-3 ПНЖК с недельной дозой потребляемого этанола ($r = -0,369$, $p = 0,049$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании проанализированы особенности профиля ЖК сыворотки крови

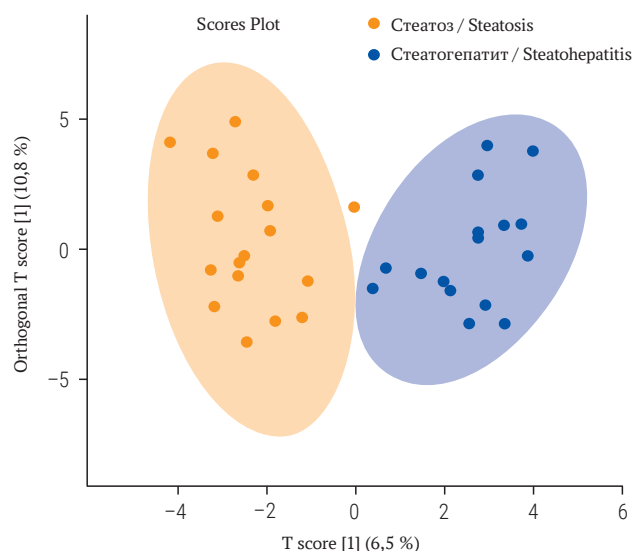


РИС. 2. Дискриминантный анализ OPLS-DA, проведенный на основе концентраций жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов.

Примечание: OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, дискриминантный анализ на основе ортогональных наименьших квадратов.

Оранжевое облако, оранжевые точки – содержание жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов в группе пациентов со стеатозом; синее облако, синие точки – в группе пациентов со стеатогепатитом. По оси абсцисс отображен прогнозирующий компонент, по оси ординат – ортогональный компонент. В скобках указан процент дисперсии ответа, ассоциированный только с компонентом-предиктором (T1 = 6,5% по горизонтали и T1 = 10,8% по вертикали).

FIG. 2. Discriminant analysis OPLS-DA based on fatty acid concentrations in serum and erythrocyte membranes.

Note: OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis.

Orange cloud, orange dots – fatty acid concentrations in serum and erythrocyte membranes in the group of patients with steatosis; blue cloud, blue dots – in the group of steatohepatitis. The predictive component is displayed along the abscissa axis, and the orthogonal component is displayed along the ordinate axis. The percentage of response variance associated only with the predictor component is indicated in parentheses (T1 = 6.5% horizontally and T1 = 10.8% vertically).

и мембран эритроцитов у мужчин с ЖБП смешанного генеза (метаболическая и алкогольная) с разной степенью некротовоспалительной активности. Данные литературы свидетельствуют о наличии ассоциации между содержанием ЖК в сыворотке крови и степенью фиброза печени [13], поэтому в настоящее исследование включены пациенты с $F \leq 1$. Пациенты были разделены на группы, отличающиеся по некротовоспалительной активности – стеатоз и стеатогепатит, с использованием ActiTest в составе FibroTest. Мы понимаем условность подобного разделения, поскольку согласно рекомендациям Европейского общества по изучению заболеваний печени лишь биопсия печени является основанием для установления стеатогепатита [7]. Однако наличие исследований,

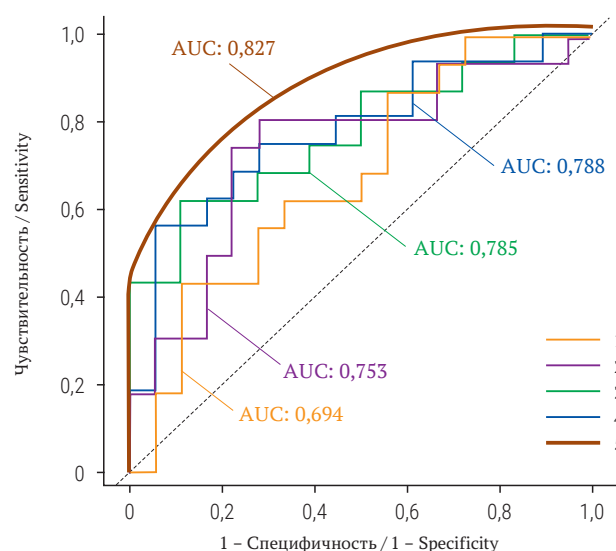


РИС. 3. ROC-кривые, построенные на исход «стеатогепатит».

1. Суммарное содержание омега-3 ПНЖК сыворотки (C20:5n-3 + C22:6n-3).
2. Арахидовая кислота (C20:0) сыворотки.
3. Суммарное содержание ПНЖК сыворотки.
4. Стеариновая кислота (C18:0) сыворотки.
5. Совокупность жирных кислот сыворотки НЖК/ПНЖК, ПНЖК, стеариновой (C18:0), маргариновой (C17:0), арахидовой (C20:0), омега-3 ПНЖК (C20:5n-3 + C22:6n-3), омега-3 ПНЖК, C16:1;9, C20:5n-3 и C20:5n-3 в мембранах эритроцитов.

Примечание: НЖК – насыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

FIG. 3. ROC curves plotted for the outcome “steatohepatitis”.

1. Total content of omega-3 PUFA in serum (C20:5n-3 + C22:6n-3).
2. Arachidic acid (C20:0) of serum.
3. Total serum PUFA content.
4. Stearic acid (C18:0) of serum.
5. The totality of serum fatty acids SFA/PUFA, PUFA, stearic (C18:0), margaric (C17:0), arachidic (C20:0), omega-3 PUFA (C20:5n-3 + C22:6n-3), omega-3 PUFA, C16:1;9, C20:5n-3 and C20:5n-3 in erythrocyte membranes.

Note: SFA – saturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids.

подтверждающих возможность установления некротовоспалительной активности при НАЖБП с использованием ActiTest [10, 11], позволило применить данный сыровоточный тест в настоящей работе.

Хорошо известно, что продолжающееся потребление алкоголя оказывает существенное влияние на результаты сыровоточных и визуализирующих методов определения степени фиброза, некротовоспалительной активности [9, 14], что послужило основанием для включения в наше исследование пациентов в состоянии абстиненции. Оно ассоциировано со снижением активности АЛТ, АСТ. Вместе с этим по данным литературы известно, что часть пациентов со стеатогепатитом имеет устойчивый

уровень активности трансаминаз в пределах референсных значений. Так, Х. Ма и соавт. [15] в мета-анализе 11 исследований с участием 4084 пациентов установили, что среди больных с НАСГ доля пациентов с нормальным значением АЛТ составляет 19%. По данным H.S. Uslusoy и соавт. [8] такие пациенты составили 30,4% от всех обследованных с гистологически подтвержденным НАСГ. Изучение этой группы пациентов имеет большое значение как для понимания механизмов патогенеза заболевания, так и для оценки его клинического профиля. В литературе нам не удалось найти работ, в которых изучался бы профиль ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов со стеатогепатитом и нормальным уровнем трансаминаз.

В нашем исследовании пациенты со стеатогепатитом имели более высокие уровни глюкозы натощак (вследствие большей доли лиц с СД2 и предиабетом), большую активность ГГТ, АЛТ, причем последняя находилась в пределах референсных значений. Пациенты данной группы в течение более чем 10 лет систематически потребляли алкоголь (более половины – крепкие алкогольные напитки) в дозах, опасных для здоровья.

Изучение корреляций уровней ЖК с активностью трансаминаз определило как сам факт их наличия, так и силу и направленность имеющихся связей. По данным W. Yoo и соавт. [13] установлены обратные корреляции между уровнями сывороточных пентадекановой (C15:0) и маргариновой (C17:0) кислот и активностью АСТ, АЛТ и прямыми между активностью АСТ и содержанием C16:1n-7c. В нашей работе статистически значимыми оказались слабые прямые корреляции между суммарным содержанием НЖК, соотношением НЖК/ПНЖК в сыворотке крови и активностью АЛТ. Полученные результаты по обратной слабой корреляции между активностью АСТ и уровнем маргариновой (C17:0) кислоты в мембранах эритроцитов согласуются с результатами W. Yoo и соавт. [13] по данной ЖК в сыворотке крови.

Постепенное использование современных методов статистической обработки – дискриминантного анализа, метода volcano plot, ROC-анализа позволило выделить конкретные ЖК и их соотношения для достаточно точной дифференциальной диагностики стеатоза и стеатогепатита.

Измененный липидный профиль при НАЖБП позволяет предположить, что изменения концентрации и качества липидов в клеточных мембранах могут повлиять на патогенез и прогрессирование стеатоза или стеатогепатита [16, 17].

Специфические ЖК являются важными медиаторами печеночной липотоксичности, которые активируют лизосомально- и митохондриально-зависимые пути апоптоза, а также стресс эндоплазматического ретикулаума [18, 19]. Некоторые ЖК не оказывают токсического воздействия на печень. Добавление

мононенасыщенной олеиновой кислоты в эксперименте приводило к безопасному накоплению триглицеридов в клетках печени, в отличие от насыщенной пальмитиновой кислоты [20]. Н.В. Деерак и соавт. [21] получили аналогичные результаты, применяя сочетание олеиновой и пальмитиновой кислот.

При анализе профиля ЖК наиболее значимые различия получены для НЖК (как суммарного, так и отдельных ЖК), концентрация которых была выше в группе стеатогепатита при снижении мононенасыщенной пальмитолеиновой C16:1;9 и ПНЖК, что, вероятно, патогенетически значимо. Эти результаты согласуются с данными M. Notarnicola и соавт. [22], которые показали, что повышенное соотношение НЖК/ПНЖК в мембранах эритроцитов может быть маркером повреждения печени. Эти же авторы продемонстрировали, что изменение соотношения стеариновой и олеиновой ЖК в мембранах эритроцитов (C18:0/C18:1;c9) ассоциировано со степенью повреждения печени в связи с измененной регуляцией процессов десатурации и элонгации ЖК, что значимо в патогенезе ЖБП [22].

Вместе с тем имеются данные о протективной роли ряда насыщенных ЖК. Так, показано, что и пентадекановая (C15:0), и маргариновая (C17:0) кислоты обратно ассоциированы с риском развития СД2 и сердечно-сосудистых заболеваний [23]. Более того, в экспериментах на мышах W. Yoo и соавт. [13] показали, что уровни пентадекановой (C15:0), маргариновой (C17:0) и пальмитэлаидиновой (C16:1n-7t) кислот в сыворотке крови отрицательно коррелируют с баллонной дистрофией гепатоцитов, которая является гистологическим признаком стеатогепатита и ассоциирована с прогрессированием заболевания. По мнению R. Mayo и соавт., уровень маргариновой кислоты (C17:0) в сыворотке крови оказался самым точным маркером, позволяющим разделять простой стеатоз от стеатогепатита [24].

Сниженные уровни пальмитолеиновой кислоты (C16:1;9) сыворотки крови у пациентов со стеатогепатитом по данным настоящей работы могут быть обусловлены ее расходом в связи с высокой активностью stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) и в липогенезе *de novo* [25]. В экспериментах на мышах R. Guo и соавт. [26] показали, что обогащение диеты мононенасыщенными ЖК значительно усугубляло вызванную алкоголем дисфункцию печени. Авторы показали низкое содержание пальмитолеиновой кислоты (C16:1;9) в мембранах эритроцитов пациентов с тяжелой НАЖБП и предположили, что это связано с высокой активностью элонгазы 5 (Elovl5), приводящей к более высокой скорости превращения пальмитолеиновой (C16:1;9) в вакценовую кислоту (C18:1n-7c), которая ассоциирована с некровоспалительной активностью в ткани печени и степенью фиброза у пациентов с ЖБП по данным Yoo W и соавт. [13].

Исследование В. Amirkalali и соавт. обнаружило прямую связь между суммарным содержанием мононенасыщенных ЖК и уровнем провоспалительного интерлейкина 6 в сыворотке крови, который может индуцировать печеночную инсулинорезистентность [27].

Анализируя роль омега-3 ПНЖК в группах со стеатогепатитом и стеатозом печени, следует подчеркнуть ряд важных молекулярных механизмов их эффектов. Омега-3 ПНЖК, особенно эйкозапентаеновая кислота (C20:5n-3) и докозагексаеновая кислота (C22:6n-3), регулируя факторы транскрипции генов (т.е. PPAR α , PPAR γ , SREBP-1, ChREBP), могут контролировать ключевые пути, участвующие в метаболизме липидов в печени. Так, омега-3 ПНЖК являются мощными активаторами рецептора PPAR α , который усиливает регуляцию нескольких генов, участвующих в стимуляции окисления жирных кислот, и понижает регуляцию провоспалительных генов таких цитокинов, как фактор некроза опухоли- α и интерлейкин 6. Омега-3 ПНЖК активируют рецептор PPAR γ , что приводит к усилению окисления жиров и повышению чувствительности к инсулину [28].

Хотя результаты исследований, касающихся роли n-3 ПНЖК при алкогольной болезни печени, противоречивы, появляется все больше свидетельств того, что эти кислоты могут быть полезны для снижения выраженности алкогольного стеатоза и вызванного алкоголем повреждения печени посредством снижения липогенеза *de novo* и мобилизации липидов из жировой ткани, усиления β -окисления жирных кислот в митохондриях, уменьшения воспаления печени и окислительного стресса [29].

По данным настоящего исследования, сниженные уровни ПНЖК в сыворотке крови, преимущественно омега-3, были значимы для построения модели диагностики стеатогепатита ЖБП смешанного генеза, для эйкозапентаеновой кислоты (C20:5n-3) подобное снижение отмечено и в мембранах эритроцитов. Эти результаты согласуются с данными S. Kartsoli и соавт. [16]. Омега-3 ПНЖК могут ингибировать арахидоновый каскад конкурентно антагонизирующими ферментами (дельта 6- и дельта-5-десатуразы, циклооксигеназы и липоксигеназы), тем самым обеспечивая противовоспалительные эффекты, ингибируя синтез воспалительных медиаторов арахидоновой кислоты и тромбоксана A₂ [29].

Результаты исследования Y. Zhou и соавт. [30] показали снижение уровней эйкозапентаеновой (C20:5n-3) и докозагексаеновой (C22:6n-3) кислот

в ткани печени пациентов с НАЖБП. W. Yoo и соавт. [13] выявили снижение циркулирующих уровней другой n-3 ПНЖК, докозапентаеновой (22:5n-f3), у пациентов с НАСГ с различной степенью фиброза печени. V. Nobili [31] было показано, что докозагексаеновая кислота у детей с ЖБП может модулировать активацию клеток – предшественников печени, выживаемость гепатоцитов и поляризацию макрофагов посредством взаимодействия с GPR120 и подавления NF- κ B, что существенно снижает степень воспаления в печени. По данным M.H. Spooner и соавт. [32] и E. Scorletti и соавт. [33], добавление n-3 ПНЖК может уменьшить жировые отложения в печени без снижения степени фиброза печени.

M. Wang и соавт. [34] показали влияние n-3 ПНЖК на снижение некровоспалительных нарушений при алкогольном стеатозе печени в экспериментальных моделях посредством механизма ингибирования этанол-индуцированного липолиза жировой ткани через ось PDE3B-AMPK.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений: небольшой объем выборки, включение в исследование только лиц мужского пола, использование ActiTest для разделения пациентов на группы с различной некровоспалительной активностью. Однако полученные результаты следует считать перспективными для будущих исследований по использованию ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов в качестве неинвазивных маркеров стеатогепатита, в том числе на больших группах больных с ЖБП, у пациентов с разной биохимической активностью, степенью фиброза печени, некровоспалительной активностью, подтвержденной гистологически.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие стеатогепатита по сравнению со стеатозом (на основании данных ActiTest) у пациентов с ЖБП смешанного генеза (метаболическая и алкогольная) с нормальной активностью трансаминаз ассоциировано с более высокими уровнями сывороточных стеариновой (C18:0), арахидоновой (C20:0) кислот, соотношения НЖК/ПНЖК и более низкими – ПНЖК, маргариновой (C17:0), суммарного содержания эйкозапентаеновой (C20:5n-3) и докозагексаеновой (C22:6n-3), суммы всех омега-3 ПНЖК в сыворотке крови, а также эритроцитарными и сывороточными уровнями эйкозапентаеновой (C20:5n-3) кислоты. Модель, включающая уровни данных жирных кислот, обеспечила AUC 0,827, чувствительность 82,2%, специфичность 80,7% в различении стеатогепатита и стеатоза печени.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Кручинина и М.Ф. Осипенко разработали концепцию и дизайн исследования. М.В. Кручинина и М.В. Паруликова проводили сбор, анализ и интерпретацию данных. М.В. Кручинина и А.А. Шестов выполняли статистическую обработку данных. Все авторы принимали участие в составлении текста рукописи. М.В. Кручинина и М.Ф. Осипенко осуществляли критическую доработку рукописи. Все авторы утвердили окончательную версию статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Quek J., Chan K.E., Wong Z.Y., et al.* Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2023; 8(1): 20–30. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00317-X). Epub 2022 Nov 16. PMID: 36400097
2. *Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018; 67(1): 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>. Epub 2017 Sep 29. PMID: 28714183
3. *Polyzos S.A., Chrysavgis L., Vachliotis I.D., et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Insights in epidemiology, pathogenesis, imaging, prevention and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2023 Aug; 93: 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.04.010>. Epub 2023 May 4. PMID: 37149203
4. *Le M.H., Le D.M., Baez T.C., et al.* Global incidence of adverse clinical events in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Mol Hepatol.* 2024 Apr; 30(2): 235–246. <https://doi.org/10.3350/cmh.2023.0485>. Epub 2024 Jan 26. PMID: 38281814; PMCID: PMC11016479
5. *Mantovani A., Petracca G., Beatrice G., et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut.* 2022 Jan; 71(1): 156–162. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323082>. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33303564
6. *Sumida Y., Nakajima A., Itoh Y.* Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 14; 20(2): 475–485. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i2.475>. PMID: 24574716; PMCID: PMC3923022
7. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; Clinical Practice Guideline Panel; Chair; EASL Governing Board representative; Panel members. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *J Hepatol.* 2021 Sep; 75(3): 659–689. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.05.025>. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34166721
8. *Uslusoy H.S., Nak S.G., Gülden M., Biyikli Z.* Non-alcoholic steatohepatitis with normal aminotransferase values. *World J Gastroenterol.* 2009 Apr 21; 15(15): 1863–1868. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1863>. PMID: 19370784; PMCID: PMC2670414
9. *Chen Z., Ma Y., Cai J., et al.* Serum biomarkers for liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2022 Dec 1; 537: 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.09.022>. Epub 2022 Sep 27. PMID: 36174721
10. *Munteanu M., Tiniakos D., Anstee Q., et al.* Diagnostic performance of FibroTest, SteatoTest and ActiTest in patients with NAFLD using the SAF score as histological reference. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016 Oct; 44(8): 877–889. <https://doi.org/10.1111/apt.13770>. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27549244; PMCID: PMC5113673
11. *Ciećko-Michalska I., Szczepanek M., Wierzbicka-Tutka I., et al.* Non-invasive diagnosis of steatosis, inflammatory changes and

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Margarita V. Kruchinina and Marina F. Osipenko developed the concept and design of the study. Margarita V. Kruchinina and Marina V. Parulikova collected, analyzed and interpreted the data. Margarita V. Kruchinina and Alexander A. Shestov performed statistical analysis. All authors took part in drafting the manuscript. Margarita V. Kruchinina and Marina F. Osipenko carried out critical revision of the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

- liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver diseases. Pilot study. *Arch Med Sci Atheroscler Dis.* 2018 Dec 28; 3: e179–e183. <https://doi.org/10.5114/amsad.2018.81184>. PMID: 30775610; PMCID: PMC6374567
12. *Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В., Кручинина Э.В.* Жирные кислоты мембран эритроцитов в дифференцировании пациентов с жировой болезнью печени алкогольного, неалкогольного и смешанного генеза. Эффективная фармакотерапия. 2023; 19 (43): 28–41. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2023-19-43-28-41>. EDN: CQDSQR / *Kruchinina M.V., Osipenko M.F., Parulikova M.V., Kruchinina E.V.* Fatty acids of erythrocyte membranes in the differentiation of patients with fatty liver disease of alcoholic, non-alcoholic and mixed genesis. *Effective Pharmacotherapy.* 2023; 19 (43): 28–41. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2023-19-43-28-41>. EDN: CQDSQR
13. *Yoo W., Gjukan D., Stevenson H.L., et al.* Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS One.* 2017 Dec 15; 12(12): e0189965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189965>. PMID: 29244873; PMCID: PMC5731750
14. *Shan R., Yin H., Yang W., et al.* Influencing factors of transient elastography in detecting liver stiffness. *Exp Ther Med.* 2016 Oct; 12(4): 2302–2306. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3617>. Epub 2016 Aug 24. Erratum in: *Exp Ther Med.* 2018 Dec; 16(6): 5425. PMID: 27698728; PMCID: PMC5038607
15. *Ma X., Liu S., Zhang J., et al.* Proportion of NAFLD patients with normal ALT value in overall NAFLD patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020 Jan 14; 20(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-1165-z>. PMID: 31937252; PMCID: PMC6961232
16. *Kartsoli S., Kostara C.E., Tsimihodimos V., et al.* Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2020 Aug 27; 12(8): 436–450. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i8.436>. PMID: 32952872; PMCID: PMC7475773
17. *Béland-Bonenfant S., Rouland A., Petit J.M., Vergès B.* Concise review of lipidomics in nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* 2023 May; 49(3): 101432. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2023.101432>. Epub 2023 Feb 11. PMID: 36781065
18. *Eo H., Valentine R.J.* Saturated fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance are prevented by Imoxin in C2C12 myotubes. *Front Physiol.* 2022 Jul 22; 13: 842819. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.842819>. PMID: 35936891; PMCID: PMC9355746
19. *Wu X., Zhang L., Gurley E., et al.* Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways. *Hepatology.* 2008 Jun; 47(6): 1905–1915. <https://doi.org/10.1002/hep.22239>. PMID: 18452148
20. *Flessa C.M., Nasiri-Ansari N., Kyrou I., et al.* Genetic and diet-induced animal models for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) research. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 13; 23(24): 15791. <https://doi.org/10.3390/ijms232415791>. PMID: 36555433; PMCID: PMC9780957

21. Deepak H.B., Shreekrishna N., Sameermahmood Z., et al. An in vitro model of hepatic steatosis using lipid loaded induced pluripotent stem cell derived hepatocyte like cells. *J Biol Methods*. 2020 Jul 22; 7(3): e135. <https://doi.org/10.14440/jbm.2020.330>. PMID: 32934967; PMCID: PMC7483829
22. Notarnicola M., Caruso M.G., Tutino V., et al. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2017 Aug 23; 16(1): 160. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0552-0>. PMID: 28830448; PMCID: PMC5568099
23. Jenkins B., West J.A., Koulman A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. *Molecules*. 2015 Jan 30; 20(2): 2425–2444. <https://doi.org/10.3390/molecules20022425>. PMID: 25647578; PMCID: PMC6272531
24. Mayo R., Crespo J., Martínez-Arranz I., et al. Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun*. 2018 May 4; 2(7): 807–820. <https://doi.org/10.1002/hep4.1188>. PMID: 30027139; PMCID: PMC6049064
25. Lee J.J., Lambert J.E., Hovhannisyann Y., et al. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2015 Jan; 101(1): 34–43. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092262>. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25527748; PMCID: PMC4266891
26. Guo R., Chen L., Zhu J., et al. Monounsaturated fatty acid-enriched olive oil exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in C57BL/6J mice. *Food Funct*. 2023 Feb 6; 14(3): 1573–1583. <https://doi.org/10.1039/D2FO03323B>. PMID: 36655918
27. Amirkalali B., Sohrabi M.R., Esrafiy A., et al. Erythrocyte membrane fatty acid profile & serum cytokine levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res*. 2018 Apr; 147(4): 352–360. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1065_16. PMID: 29998870; PMCID: PMC6057244
28. Spooner M.H., Jump D.B. Omega-3 fatty acids and nonalcoholic fatty liver disease in adults and children: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019 Mar; 22(2): 103–110. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000539>. PMID: 30601174; PMCID: PMC6355343
29. Wang M., Ma L.J., Yang Y., et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids for the management of alcoholic liver disease: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59(sup1): S116–S129. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544542>. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30580553
30. Zhou Y., Orešić M., Leivonen M., et al. Noninvasive detection of nonalcoholic steatohepatitis using clinical markers and circulating levels of lipids and metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 Oct; 14(10): 1463–1472.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.046>. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27317851
31. Nobili V., Carpino G., Alisi A., et al. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PloS one*. 2014 Feb 4; 9(2): e88005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088005>. PMID: 24505350; PMCID: PMC3913708
32. Spooner M.H., Jump D.B. Nonalcoholic fatty liver disease and Omega-3 fatty acids: mechanisms and clinical use. *Annu Rev Nutr*. 2023 Aug 21; 43: 199–223. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-061021-030223>. Epub 2023 May 19. PMID: 37207355
33. Scorletti E., Bhatia L., McCormick K.G., et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: results from the Welcome* study. *Hepatology*. 2014 Oct; 60(4): 1211–1221. <https://doi.org/10.1002/hep.27289>. PMID: 25043514
34. Wang M., Zhang X., Ma L.J., et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate ethanol-induced adipose hyperlipolysis: A mechanism for hepatoprotective effect against alcoholic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Dec; 1863(12): 3190–3201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.026>. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28847514

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кручинина Маргарита Витальевна , д-р мед. наук, доцент, заведующая и ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

Осипенко Марина Федоровна, д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>

Шестов Александр Александрович, канд. хим. наук, доцент Медицинской школы Перельмана Университета Пенсильвании, Филадельфия, Пенсильвания, США. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7214-5057>

Паруликова Марина Владимировна, преподаватель отдела образования и врач-гастроэнтеролог НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН». ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8305-4091>

 Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Margarita V. Kruchinina , Dr. of Sci. (Medicine), Associate Professor, Head and Leading Researcher of the Gastroenterology Laboratory, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

Marina F. Osipenko, Dr. of Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>

Alexander A. Shestov, Cand. of Sci. (Chemistry), Associate Professor, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7214-5057>

Marina V. Parulikova, Lecturer of the Department of Education and gastroenterologist, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8305-4091>



ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
(Сеченовский Университет)