



**Вестник Российского университета дружбы народов.
Серия: МЕДИЦИНА**

2024 Том 28 № 4

Тема номера: ОНКОЛОГИЯ

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4

<http://journals.rudn.ru/medicine>

**Научный журнал
Издается с 1997 г.**

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-61206 от 30.03.2015 г.

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор

КОБАЛАВА Жанна Давидовна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики имени В.С. Моисеева Медицинского института, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

Зместители главного редактора

ФАТХУДИНОВ Тимур Хайсамудинович, д.м.н., профессор, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, г. Москва, Россия

ГУРЬЯНОВА Светлана Владимировна, к.б.н., доцент, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

Члены редакционной коллегии

АБРАМОВ Алексей Юрьевич д.м.н., профессор, директор Медицинского института, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

АЗОВА Мадина Мухамедовна, д.б.н., профессор, кафедра биологии и общей генетики, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

АҚДИС Мубацел, профессор, Научно-исследовательский институт по аллергии и астме, г. Давос, Швейцария

АНИСИМОВ Владимир Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела канцерогенеза и онкогеронтологии, лаборатории канцерогенеза и старения, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Россия

БАХНА Сами, профессор, Университет Луизианны, г. Шреверпорт, США

БЛАГОНРАВОВ Михаил Львович, д.м.н., профессор, кафедра общей патологии и патологической физиологии им. В.А. Фролова, Медицинский институт, РУДН, г. Москва, Россия

БЫКОВ Илья Михайлович, д.м.н., профессор, кафедра фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

ВАЛЕНТА Рудольф, профессор, Венский медицинский университет, г. Вена, Австрия

ВЕСЕЛКИН Николай Петрович, д.м.н., профессор, академик РАН, лаборатория 9, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

ВУКСАНОВИЧ Александр, д.м.н., профессор, профессор Медицинского факультета Университета г. Белград, Белград, Сербия

ГАБИБОВ Александр Габибович, академик РАН, д.х.н., профессор, директор Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

ДЕЕВ Сергей Михайлович, д.б.н., профессор, академик РАН, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

ДРАПКИНА Оксана Михайловна, д.м.н., профессор, академик РАН, директор Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины, г. Москва, Россия

ЕЛЬЧАНИНОВ Андрей Владимирович, д.м.н., профессор, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, г. Москва, Россия

ЕФРЕМОВ Анатолий Васильевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патологической физиологии и клинической патофизиологии, Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск, Россия

КАНОНИКА Вальтер, д.м.н., профессор, Директор Центра персонализированной медицины в исследовательской больнице, г. Роззано, г. Милан, Италия

КОСТИН Андрей Александрович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, кафедра урологии с курсами онкологии, радиологии и андрологии, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

КУСТОВИЧ Аднан, профессор, Имперский колледж Лондона, г. Лондон, Великобритания

МЕРКЭЛИ Бела, профессор, директор Кардиоцентра Университета Земмельвейса, г. Будапешт, Венгрия

НАПАРСТЕК Яков, профессор, Университет Хадасса, г. Иерусалим, Израиль

НОЙХАУС Йохен, д.б.н., профессор, заведующий научно-исследовательской лабораторией кафедры урологии, Лейпцигский университет, г. Лейпциг, Германия

ПОЛЕВЩИКОВ Александр Витальевич, д.б.н., профессор, заведующий отделом иммунологии Института экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия

РЕЙМЮЛЛЕР Райнер, д.м.н., профессор, Медицинский университет, кафедра радиологии, г. Грац, Австрия

РОДИН Сергей Александрович, д.б.н., профессор, старший научный сотрудник отделения хирургических наук Университета г. Уппсала, г. Уппсала, Швеция

РОЩЕВСКИЙ Михаил Павлович, д.м.н., профессор, академик РАН, отдел сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

ТИМАНН Маркус, д.м.н., профессор, Институт гематопатологии, г. Гамбург, Германия

ХАВИНСОН Владимир Хацкелевич, д.м.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

ХЕ Джи, д.м.н., профессор, Онкологический институт и больница, Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза, г. Пекин, Китай



RUDN JOURNAL OF MEDICINE

2024 Volume 28 No. 4

Theme of the issue: ONCOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4

<http://journals.rudn.ru/medicine>

Founded in 1997

Founder: Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Zhanna D. KOBALAVA, MD, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Internal Medicine with a course of cardiology and functional diagnostics named after V.S. Moiseev Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), Moscow, Russia

Deputy Editors - in - Chief

Timur Kh. FATKHUDINOV, MD, Professor, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky National Research Centre of Surgery», Moscow, Russia

Svetlana V. GURYANOVA, Ph.D., Associate Professor, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Members of Editorial Board

Aleksey Y. ABRAMOV, MD, Professor, Director of the Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Mubacel AKDIS, MD, Professor, Research Institute for Allergy and Asthma, Davos, Switzerland

Vladimir N. ANISIMOV, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Carcinogenesis and Oncogerontology and the Laboratory of Carcinogenesis and Aging of the Research Institute of Oncology n.a. N.N. Petrov, St. Petersburg, Russia

Madina M. AZOVA, D. Sc., Professor, Department of Biology and General Genetics, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Sami BAHNA, MD, Professor, University of Louisiana, Shreveport, USA

Mikhail L. BLAGONRAVOV, MD, Professor, Frolov Department of General Pathology and Pathological Physiology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Ilya M. BYKOV, MD, Professor, Head of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Walter CANONICA, MD, Professor, Director of the Center for Personalized Medicine at the Research Hospital Humanitas IRCCS, Rozzano, Milan, Italy

Adnan CUSTOVIC, MD, Professor, Imperial College of London, London, Great Britain

Sergey M. DEEV, Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Oksana M. DRAPKINA, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, Moscow, Russia

Anatoly V. EFREMOV, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Pathological Physiology and Clinical Pathophysiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Andrey V. ELCHANINOV, MD, Professor, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Alexander G. GABIBOV, D. Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Jie HE, Professor, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, China

Jochen NEUHAUS, PhD, Professor, Head of Research Laboratory, Department of Urology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Vladimir Kh. KHAVINSON, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology RAS, St. Petersburg, Russia

Andrei A. KOSTIN, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Urology with courses oncology, radiology and andrology, the Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Bela MERKELY, MD, PhD, Professor and Chairman of Heart and Vascular Center, Rector of the University of Semmelweis, Budapest, Hungary

Yakov NAPARSTEK, MD, Professor, Director of the Hadassah Center for Clinical Immunology and Rheumatology at the Hadassah University Medical Center, Jerusalem, Israel

Alexander V. POLEVSHCHIKOV, D.Sc, Professor, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Rainer RIENMUELLER, MD, Professor Medical University, Department of Radiology, Graz, Austria

Sergey A. RODIN, PhD, Professor, Senior Researcher, Department of Surgical Sciences, Uppsala. University, Uppsala, Sweden

Mikhail P. ROSHCHEVSKY, MD, Professor, RAS Academician, Comparative Cardiology Department, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Markus TIEMANN, MD, Professor, Institute of Hematopathology, Hamburg, German

Rudolph VALENTA, MD, Professor MD, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Nikolai P. VESELKIN, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Laboratory 9, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia

Alexander VUKSANOVICH, MD, Professor, Professor of the Medical Faculty of the University, Belgrade, Serbia

Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: МЕДИЦИНА

ISSN 2313-0261 (Online); 2313-0245 (Print)

Периодичность: 4 выпуска в год (ежеквартально).

Входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ.

Языки: русский, английский.

Материалы журнала размещаются на платформе РИНЦ Российской научной электронной библиотеки, Scopus, Научной электронной библиотеки КиберЛенинка, Directory of Open Access Journals (DOAJ).

Цели, задачи и тематика журнала

Научный рецензируемый медицинский журнал «Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина» выходит ежеквартально с 1997 года.

Цель журнала – интегрировать результаты научных исследований и богатый опыт отечественных и зарубежных специалистов в области клинической медицины и медико-биологических проблем, в первую очередь в области онкологии, физиологии и нейробиологии, аллергологии и иммунологии, медицинской генетики и микробиологии, инфекционных болезней.

Каждый выпуск является тематическим. Тематика каждого выпуска объявляется заранее. Для публикаций принимаются оригинальные статьи, обзоры, а также описание клинических случаев и современных методов диагностики.

Публикации в журнале принимаются по отдельности как на русском или английском языках, так и на двух языках одновременно.

Авторы должны гарантировать, что статья не была опубликована раньше, в том числе частично и на других языках, и не находится на рассмотрении в других научных журналах.

Журнал ориентирован на ученых и преподавателей, аспирантов и молодых ученых, практических врачей, ведущих поисковые работы по разработке новых и по усовершенствованию существующих профилактических, диагностических, лечебных и реабилитационных методов.

На основании решения ВАК Министерства образования и науки РФ журнал входит в «Перечень периодических изданий, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук по специальностям: с 01.02.22 — 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки), 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки), 3.1.18. Внутренние болезни (медицинские науки), 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки); с 22.11.22 — 1.5.5. Физиология человека и животных (медицинские науки), 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки), 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки), 3.1.20. Кардиология (медицинские науки), 3.1.31. Геронтология и гериатрия (медицинские науки), 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские науки), 3.2.7. Аллергология и иммунология (биологические науки)».

Редакционная коллегия журнала приглашает к сотрудничеству ученых и научные коллективы по подготовке специальных тематических выпусков журнала: <http://journals.rudn.ru/medicine/announcement/view/327>

Электронный адрес: medj@rudn.ru

Литературный редактор *К.В. Зенкин*
Компьютерная верстка: *М.В. Рогова*

Почтовый адрес редакции
117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 10
e-mail: medj@rudn.ru

Адрес издательства:
115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3
Тел.: +7 (495) 955-07-16; e-mail: publishing@rudn.ru

Подписано в печать 10.12.2024. Выход в свет 25.12.2024. Формат 60×84/8
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура «Tinos, Roboto».
Усл. печ. л. 13,65. Тираж 500 экз. Заказ № 1716. Цена свободная.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)
117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
Отпечатано в типографии ИПК РУДН
115419, Москва, Россия, ул. Орджоникидзе, д. 3
Тел. +7 (495) 955-08-61; e-mail: publishing@rudn.ru

RUDN Journal of Medicine

ISSN 2313-0261 (Online); 2313-0245 (Print)

Publication frequency: 4 issues per year (quarterly).

Included in the list of peer-reviewed scientific publications of the higher attestation Commission of the Russian Federation.

Languages: Russian, English.

The journal articles are posted at databases: Russian Index of Science Citation, Scopus, Electronic Journals Library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals (DOAJ).

Aim, tasks and topics of the journal

The “RUDN JOURNAL OF MEDICINE” is a quarterly journal that publishes peer-reviewed medical research papers since 1997.

A major goal of the journal is to integrate the results of basic and clinical research and rich experience of domestic and foreign experts in the field of clinical medicine and biomedical problems. Primary areas covered range from oncology, physiology and neurobiology, allergology and immunology, to medical genetics and microbiology, as well as infectious diseases.

Each issue is devoted to a specific medical topic that is announced in advance. We accept original research including important new tools and techniques, reviews, and clinical cases.

Papers may be submitted in Russian and/or English.

Authors must ensure that the article was not published elsewhere before, either as a whole or in part, in Russian or other languages. They should also guarantee that the paper submitted is not under consideration in other scientific journals.

The journal is intended for researchers, lecturers, graduate students and young scientists, practitioners who do research to develop new and improve existing preventive, diagnostic, therapeutic and rehabilitation methods.

The Editorial Board of the journal encourages individual researches and research teams to collaborate in preparing issues devoted to specific topics: <http://journals.rudn.ru/medicine/announcement/view/327>

Contact e-mail: medj@rudn.ru

Review editor *K.V. Zenkin*
Computer design: *M.V. Rogova*

Postal Address of the Editorial Board:

10 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russian Federation
e-mail: medj@rudn.ru

Address of the Publishing House

3 Ordzhonikidze St., 115419 Moscow, Russian Federation
Ph. +7 (495) 955-07-16; e-mail: publishing@rudn.ru

Printing run 500 copies. Open price.

Peoples' Friendship University of Russia Named After Patrice Lumumba (RUDN University)
6 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russian Federation

Printed at RUDN Publishing House:

3 Ordzhonikidze St., 115419 Moscow, Russian Federation
Ph. +7 (495) 955-08-61; e-mail: publishing@rudn.ru

СОДЕРЖАНИЕ**ТЕМА НОМЕРА: ОНКОЛОГИЯ****Jumaniyazova E.D., Lokhonina A.V., Sentyabreva A.V., Kosyreva A.M.**

Molecular genetic signatures of head and neck squamous cell carcinoma and their changes induced by proton irradiation (Молекулярно-генетические сигнатуры плоскоклеточного рака головы и шеи и их изменения, индуцированные протонным облучением)413

Gerashchenko T.S., Patysheva M.R., Fedorenko A.A., Filatova A.P., Vostrikova M.A., Bragina O.D., Fedorov A.A., Iamshchikov P.S., Denisov E.V.

Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer (Изменение траекторий развития моноцитов под действием химиотерапии у больных раком молочной железы)427

Khozyainova A.A., Menyailo M.E., Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobechnikova A.A., Gerashchenko T.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Denisov E.V.

Tumor hybrid cells in non-small cell lung cancer: population structure and contribution to prognosis (Опухолевые гибридные клетки при немелкоклеточном раке легкого: популяционный состав и клиническая значимость)439

Косырева А.М., Джуманиязова Э.Д., Джалилова Д.Ш., Сентябрева А.В., Мирошниченко Е.А., Фетисов Т.И., Лохонина А.В.

Молекулярно-биологические и иммуногистохимические особенности недифференцированных плеоморфных сарком452

Андреев П.Ю., Мошуров И.П., Коротких Н.В., Шишкина В.В., Самойленко Т.В., Горюшкина Е.С., Антакова Л.Н.

Озонотерапия злокачественных новообразований466

ГИСТОЛОГИЯ**Sentyabreva A.V., Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M.**Distribution of β -amyloid and pTau in brain cortex depending on age and mental state (Распределение β -амилоида и pTau в коре головного мозга в зависимости от возраста и психиатрического статуса)488**ХИРУРГИЯ****Protasov A.V., Mekhaeel M.Sh.F., Salem S.M.A.**

The choice of the optimal mesh implant for hernioplasty operations depending on the properties of mesh implants (Выбор оптимального сетчатого имплантата для операций герниопластики в зависимости от свойств сетчатых имплантатов)499

СТОМАТОЛОГИЯ**Кузнецов А.М., Иманова Х.З., Гусаров А.М., Яцкевич О.С., Зорич М.Е., Короткова Н.Л., Копылова У.О., Нагайченко А.М.**

Костная пластика расщелин альвеолярного отростка: к вопросу о современной парадигме лечения508

ФАРМАКОЛОГИЯ

Marchenkova L.A., Safdari A., Uspenskaya E.V.

New approaches to quality control of drugs from the group of branched polymers on the example of dextran.

(Местное применение тимолола малеата в лечении смешанных и глубоких младенческих гемангиом:

сообщение о двух случаях) 537

ГИНЕКОЛОГИЯ

Колесникова Е.В., Осипова Л.К., Жаров А.В.

Факторы риска рецидивирования вульво-вагинальных инфекций 548

CONTENTS

THEME OF THE ISSUE: ONCOLOGY

- Jumaniyazova E.D., Lokhonina A.V., Sentyabreva A.V., Kosyreva A.M.**
Molecular genetic signatures of head and neck squamous cell carcinoma and their changes induced by proton irradiation.....413
- Gerashchenko T.S., Patysheva M.R., Fedorenko A.A., Filatova A.P., Vostrikova M.A., Bragina O.D., Fedorov A.A., Iamshchikov P.S., Denisov E.V.**
Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer.....427
- Khozyainova A.A., Menyailo M.E., Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Gerashchenko T.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Denisov E.V.**
Tumor hybrid cells in non-small cell lung cancer: population structure and contribution to prognosis439
- Kosyreva A.M., Jumaniyazova E.D., Dzhililova D.Sh., Sentyabreva A.V., Miroshnichenko E.A., Fetisov T.I., Lokhonina A.V.**
Molecular-biologic and immunohistochemical features of undifferentiated pleomorphic sarcomas.....452
- Andreev P.Yu., Moshurov I.P., Korotkih N.V., Shishkina V.V., Samoilenko T.V., Goryushkina E.S., Antakova L.N.**
Malignant neoplasms ozone therapy.....466

HISTOLOGY

- Sentyabreva A.V., Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M.**
Distribution of β -amyloid and pTau in brain cortex depending on age and mental state488

SURGERY

- Protasov A.V., Mekhaeel M.Sh.F., Salem S.M.A.**
The choice of the optimal mesh implant for hernioplasty operations depending on the properties of mesh implants499

DENTISTRY

- Kuznetsov A.M., Imanova Kh.Z., Gusarov A.M., Yackevich O.S., Zorich M.E., Korotkova N.L., Nagajchenko A.M.**
Alveolar clefts bone grafting: on the issue of modern treatment paradigm.....508

PHARMACOLOGY

- Marchenkova L.A., Safdari A., Uspenskaya E.V.**
New approaches to quality control of drugs from the group of branched polymers on the example of dextran.....537

GYNECOLOGY

- Kolesnikova E.V., Osipova L.K., Zharov A.V.**
Risk factors for recurrence of vulvovaginal infections.....548



ТЕМА НОМЕРА: ОНКОЛОГИЯ THEME OF THE ISSUE: ONCOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-413-426
EDN GKJBSB

REVIEW
ОБЗОР


Molecular genetic signatures of head and neck squamous cell carcinoma and their changes induced by proton irradiation

Enar D. Jumaniyazova¹  , Alexandra V. Sentyabreva^{1,3} ,
Anna M. Kosyreva^{1,3} , Anastasia V. Lokhonina^{1,2} 

¹ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University, *Moscow, Russian Federation*

² National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, *Moscow, Russian Federation*

³Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, *Moscow, Russian Federation*

 enar2017@yandex.ru

Abstract. Head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is the seventh most common malignancy in the world. The overall incidence of HNSCC is increasing and is projected to increase by about 30 % annually by 2030. Clinically, HNSCC is characterized by an aggressive course: rapid local spread, resistance to various methods of antitumor treatment, and frequent recurrences. Despite improvements in diagnostic and therapeutic approaches over the last two decades, the outcomes of patients with HNSCC have not shown significant improvements, especially for patients with late TNM stage, with an overall five-year survival rate of 50 %. Approximately 75 % of HNSCC patients are treated with radiation therapy either alone or as part of a comprehensive treatment regimen. To date, one of the main ways to improve the efficacy of radiation therapy in HNSCC is considered to be a combination of maximum allowable increase of radiation dose in the target tumor and minimization of such dose in the surrounding healthy tissues. From this point of view, proton therapy (PT) has a pronounced advantage over various types of photon irradiation. Despite the growing interest of scientists in PT, studies aimed at identifying molecular and genetic changes induced by PT are sparsely, while in our opinion they are very important for understanding intracellular mechanisms leading either to tumor cell destruction or to the development of radioresistance. This review summarizes the available knowledge on the changes in the main signaling pathways of HNSCC tumor cells under the influence of PT.

Keywords: head and neck squamous cell cancer, proton therapy, protons, signaling pathways, signaling cascade, molecular genetic signatures

© Jumaniyazova E.D., Sentyabreva A.V., Kosyreva A.M., Lokhonina A.V. 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Funding. This work was supported by the tripartite agreement of the Russian Science Foundation № 24-24-00296 dated 29.12.2023 on the project “The effect of proton therapy on the molecular portrait of the microenvironment of head and neck tumors” of the competition 2023 “Conducting basic scientific research and search scientific research by small individual scientific groups” between RSCF, Lokhonina A.V. and RUDN.

Author contributions. Jumaniyazova E.D. — conception and writing the final manuscript text; Lokhonina A.V. — checking the intellectual content of the manuscript, final approval of the version for publication.; Sentyabreva A.V. — manuscript writing, Kosyreva A.M. — checking the intellectual content of the manuscript. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to G.G. Kazaryan for technical support during the preparation of the manuscript.

Consent for publication — not applicable.

Received 24.07.2024. Accepted 03.09.2024.

For citation: Jumaniyazova ED, Sentyabreva AV, Kosyreva AM, Lokhonina AV. Molecular genetic signatures of head and neck squamous cell carcinoma and their changes induced by proton irradiation. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):413–426. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-413-426. EDN: GKJBSB

Introduction

Head and neck squamous cell cancer (HNSCC) is the seventh most common malignancy in the world. The overall incidence of HNSCC is increasing and is projected to increase by about 30 % annually by 2030 [1, 2]. The most significant risk factors for the development of HNSCC include smoking, alcohol consumption, exposure to environmental pollutants, and infection with viral agents, namely human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus [3], additional predisposing factors include betel nut chewing (a species of tree-like plants of the genus *Areca* of the Palm family, the use of which is common in Southeast Asian countries), malnutrition, poor oral hygiene [4, 5]. Clinically, HNSCC is characterized by an aggressive course: rapid local spread, resistance to various methods of antitumor treatment and frequent recurrences [6]. Despite improvements in diagnostic and therapeutic approaches over the last two decades, mainly due to the respective heterogeneity of these tumors, the outcomes of patients with HNSCC have not shown significant improvements, especially for patients with

late TNM stage, with an overall five-year survival (OS) of 50 % [7]. Therapeutic options for HNSCC include minimally invasive, organ-preserving surgery, radiation therapy (RT), and multimodal treatment strategies. For patients with early-stage HNSCC, both surgery and intensive RT provide comparable results in terms of local disease control and overall survival [8]. After surgery, postoperative RT with or without adjuvant chemotherapy is recommended for patients with risk factors including perineural invasion and/or lymphovascular invasion and when positive resection margins (i.e., resection margins with tumor cells detected in them) are identified. As a rule, a combination of surgery, RT and chemotherapy is required at advanced stages (locally advanced stage, or in the presence of distant metastases) [9]. Approximately 75 % of HNSCC patients are treated with RT as the main or as part of complex treatment [10]. Thus, in the early stages of the disease, RT can replace the need for surgical intervention. In some complex clinical situations, for example, for tumor lesions of the larynx, RT allows

to perform antitumor treatment while preserving the organ, which is a fundamentally important aspect from the psychological point of view for a number of patients [11]. However, the planning and implementation of RT in patients with HNSCC is complicated due to the close proximity of a large number of critical organs at risk (OAR). Even with the introduction of Intensity Modulated Radiation Therapy (IMRT) in the clinic, it is not possible to completely avoid irradiation of nearby organs, which subsequently leads to the development of late postradiation complications [12, 13]. To date, one of the main ways to improve the efficacy of RT in HNSCC is considered to be a combination of maximum permissible increase of radiation dose in the target tumor and minimization of such dose in the surrounding healthy tissues. From this point of view, proton therapy (PT) has a pronounced advantage over various types of photon irradiation. [14, 15]. A number of studies have demonstrated a significant reduction in the radiation dose to OAR with PT compared to IMRT [16–18].

PT is a promising variant of RT, the wide application of which is expected to solve many problems [19]. Protons are positively charged particles that penetrate

tissue to a limited depth and give up most of their energy at the end of their path [20]. This physical phenomenon of protons has been called the Bragg peak [21]. The pronounced peak of ionizing radiation, or Bragg peak, occurring at the end of the protons' run through matter causes that the integral dose is almost always lower and the irradiation of healthy tissues is less than in photon therapy [22]. Due to such a dose distribution in the substance, it is possible to carry out irradiation with high effective doses against the background of a reduced radiation load on the surrounding healthy tissues, which improves the tolerability of treatment and reduces the number of postradiation complications in HNSCC patients.

The main effect of protons on tumor cells is DNA damage, including nucleotide base modifications, a basic sites and single-strand breaks, the latter being the most common type of PT-induced direct damage. In addition to direct damage, PT has an indirect cytotoxic effect through the formation of reactive oxygen species (ROS) [23], which activate caspases to induce apoptosis [24], (Fig.1). In a past review article, we noted the biological effects of PT [25], (Table 1).

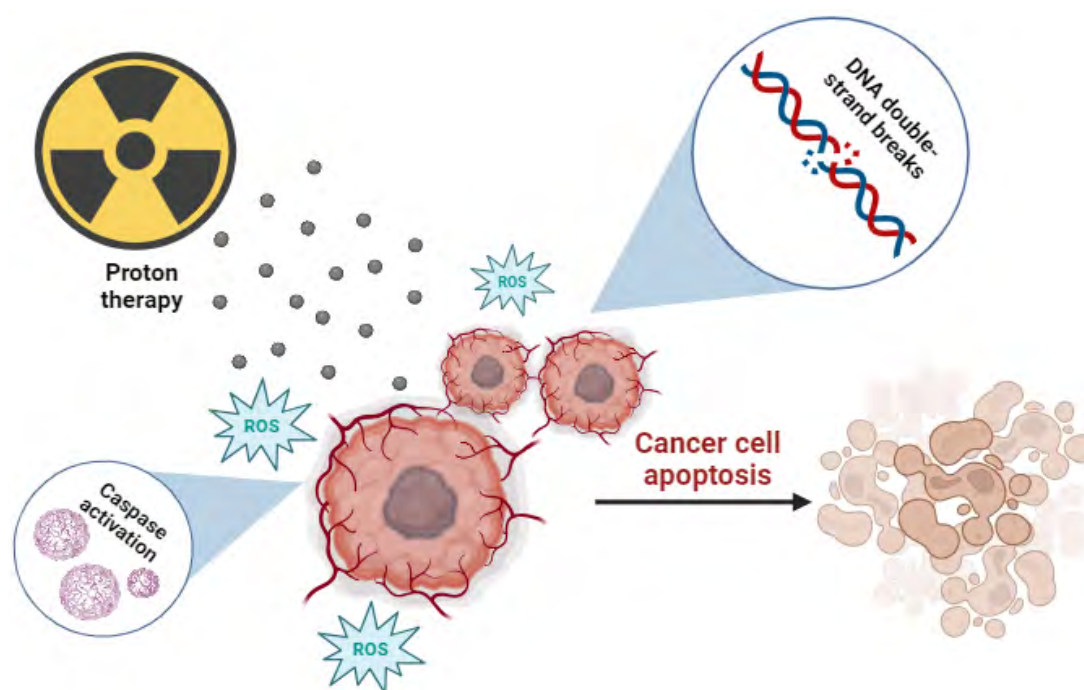


Figure 1. Proton therapy effects on cancer cells

Table 1

Specific features of proton therapy

Evaluation parameters		Peculiarities of proton therapy
Physical properties		Protons emit maximum energy, reaching the "target", i. e. the tumor; while the surrounding tissues (healthy) receive minimal radiation dose [23], [26].
Action on tumor	Cancer cell DNA	Proton irradiation induces clustered DNA damage, with the formation of short DNA fragments that are difficult to repair by the repair mechanism, leading to massive cell death [27].
	Cancer cells as a whole	Proton irradiation leads to the accumulation of ROS, which in turn activate caspases that trigger cancer cell apoptosis [28]. It reduces invasion and migration of cancer cells by inhibiting integrins and matrix metalloproteinases (MMPs) [29].
Tumor microenvironment	Cancer-associated fibroblasts	It reduces protumorigenic properties and induces rapid senescence of cancer-associated fibroblasts [30].
	Macrophages	Proton irradiation stimulates reprogramming of M2 macrophages possessing a pro-tumor phenotype into M1 antitumor ones through activation of NFκB, MAPK and IRF/STAT [31]. It activates the expression of high mobility group box 1 (HMGB1), which is responsible for the activation of antigen-presenting cells [32].
	T-lymphocytes	Proton irradiation activates the recruitment of CD8+ [33], CD4+ and T-reg lymphocytes [32].

Despite the growing interest of scientists in PT, studies aimed at identifying molecular and genetic changes induced by PT are scarce, whereas in our opinion they are very important for understanding the intracellular mechanisms leading to either tumor cell

destruction or the development of radioresistance [34]. In this review, we summarize the available knowledge of the changes in the main signaling pathways of HNSCC tumor cells under the influence of PT (Fig.2).

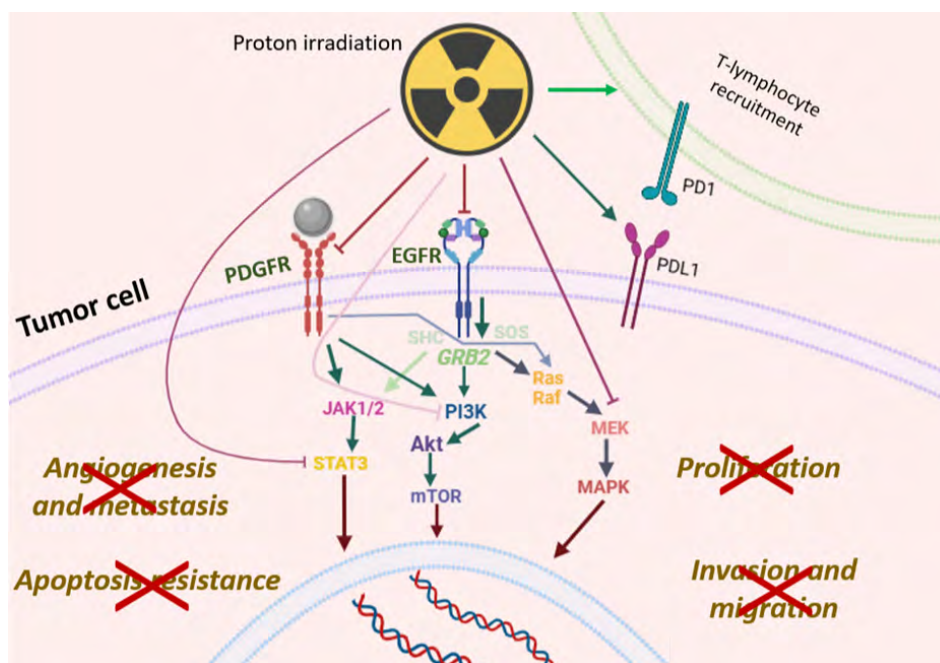


Figure 2. Impact of proton irradiation on cancer cell signaling pathways

P53 signaling pathway

HNSCC is characterized by a high level of genetic instability [35], which is primarily due to inactivating mutations in tumor growth suppressor genes [36]. Like most solid tumors, HNSCC is characterized by mutations in the *TP53* gene, [37] which in “normal” mode of operation provides genomic stability and in case of detecting violations is able to stop the cell cycle and start the process of DNA repair, and in case of impossibility to correct the damage — starts apoptosis [38, 39]. The hallmark of p53 is high sensitivity to DNA damage or oncogene activation in the cell [40]. Inactivating mutations of *TP53* are characteristic of more than 80 % of HPV-negative HNSCC, which necessarily lead to loss of its function [41]. Inactivating mutations in the *TP53* gene are events of early stages of carcinogenesis. The presence of *TP53* mutations in any subtypes of HNSCC is associated with poor overall survival, resistance to therapy, and increased recurrence rates [41]. Talking about RT-induced changes in the *TP53* gene, it is important to note that it is assigned one of the main roles in deciding the “fate” of cancer cells after irradiation. In several studies [42, 43, 44] it has been demonstrated that under the influence of RT, tumor cells die by apoptosis rather than by necrosis or autophagy. Radiation exposure increases the amount of p53 protein in cells, mainly by stimulating its translation and inhibiting its degradation [45].

Activation of the p53-mediated signaling pathway can cause cell cycle arrest followed by DNA repair, which promotes cell survival; if DNA repair is not possible, apoptosis is induced or the cell becomes senescent, which ultimately leads to tumor cell death [44]. Bravata et al. showed on breast cancer cell lines that proton irradiation leads to TP53 pathway activation [46]. Lee et al. demonstrated on the example of three kinds of cancer cells, lewis lung carcinoma cells, hepatoma HepG2 and Molt-4 leukemia cells, that proton irradiation induces an increase in p53 expression with subsequent apoptosis of cancer cells [47]. Taking into the consideration that HNSCC is characterized by a high level of hypoxia (like the above tumors) in the tumor node, similar activation of p53-dependent signaling pathway is likely to occur in this MNs. In

addition, proton irradiation activates caspases and increases the generation of ROS via p53. The increase of ROS can activate p53 and vice versa according to the feedback principle [43].

EGFR signaling pathway

A well-known molecular genetic feature of HNSCC is the overexpression of a receptor with tyrosine kinase activity-epidermal growth factor receptor (EGFR) [48]. Thus, EGFR overexpression is thought to be found in approximately 80 % of HNSCC cases, and in terms of disease course, it is associated with a poor prognosis of the disease [49]. The prevalence of EGFR overexpression has led to the introduction of Cetuximab, a targeting drug that is a monoclonal antibody directed against EGFR, into the antitumor therapy of HNSCC.

HER family ligands including epidermal growth factor, heparin-binding, amphiregulin, transforming growth factor-alpha, epiregulin and beta-cellulin have affinity for EGFR. [50]. Upon binding to one of the ligands, activated EGFR activates various intracellular signaling cascades, e. g., JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK [51]. In cancer cells, these signaling cascades are responsible for the processes of cell proliferation, invasion, migration and metastasis [52].

Despite its transmembrane position, EGFR is able to move into the cell nucleus where it functions as a transcription factor. Such a phenomenon can be induced by ionizing radiation and it is associated with the acquisition of resistance to RT by cancer cells. In turn, EGFR inhibition sensitizes radioresistant cancer cells by modulating DNA repair. Overexpression of other receptor tyrosine kinases including HER2 and MET contribute to resistance to agents targeting EGFR [53, 54].

A study by Park et al. demonstrated the efficacy of combining the EGFR inhibitor Gefinitib with proton irradiation on non-small cell lung cancer cells [55]. Promising results were obtained when oral squamous cell carcinoma’s cells were irradiated with protons: EGFR suppression was revealed [56]. Irradiation with another type of corpuscular irradiation, carbon ions, also led to a decrease in the activity of EGFR and PI3K/AKT/mTOR pathways [57]. In contrast, Stahler et al.

did not observe activation of EGFR and downstream targets AKT and ERK1/2 after carbon ion irradiation in their experiment [58].

MET signaling pathway

The *MET* proto-oncogene encodes RTK and is a regulator of one of the most important signaling cascades of carcinogenesis, primarily causing epithelial-mesenchymal transition (EMT) [59]. In turn, EMT enhances cancer cell migration and invasion and thereby determines the process of metastasis in HNSCC [54]. Although c-MET has several functional domains, it binds to a single ligand-hepatocyte growth factor (HGF) [60]. The binding of HGF to c-MET affects the catalytic activity of RTC, which activates other cell signaling pathways such as RAS/RAF/ERK, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT and NOTCH, resulting in uncontrolled proliferation of cancer cells [61]. In HNSCC, *MET* mutations are infrequent, occurring in approximately 2–13 % of cases, whereas *MET* copy number increase and overexpression of its ligand HGF are common [62] and are associated with poor prognosis and poor overall survival [63]. Increased expression of c-MET is associated with metastasis to lymph nodes in HNSCC, and overexpression of HGF is associated with resistance to anoikis (a type of cell death) [64]. Activation of c-Met promotes increased expression of plexin containing domain 2 through activation of ERK1/2-ELK1 signaling. This leads to cancer cell plasticity through the induction of epithelial-mesenchymal transition and an increase in the number of stem cells in the tumor, resulting in RT resistance of HNSCC. Inactivation of c-Met by knockdown or an inhibitory pharmacological agent not only reverses the EMT process, but also diminishes the CD44+CD133 — cancer stem cells (CSCs) population in radioresistant HNSCC, which significantly slows tumor progression [65].

In view of the fact that EGFR and c-MET activate common downstream components of signaling cascades such as MAPK and PI3K/Akt/mTOR, the MET signaling cascade may be considered as a promising target for the treatment of HNSCC in cetuximab-resistant patients [54]. In addition, this signaling pathway is

believed to interact with other signaling pathways such as STAT and Wnt, contributing to tumor progression and resistance to antitumor agents and RT [66]. In writing this review, we did not find any studies on how this signaling cascade is altered after proton irradiation. However, there are reports indicating that c-Met is overexpressed in most HPV-negative HNSCC cell lines after ionizing irradiation.

PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

Disorders in the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade in HNSCC are common, occurring in 90 % of cases [67]. The first constituent member of the signaling cascade-PI3K, which belongs to a class of enzymes that are essential for cell growth, differentiation, and survival-is activated by RTKs (e. g., as mentioned above, such as EGFR). Other members of the pathway include mTORC1, mTORC2 and Akt. mTORC2 is required for phosphorylation of Akt and activation of other signaling molecules of the PI3K pathway [68]. Phosphorylated Akt activates mTOR or inhibits Bad, caspase 9 and other proteins, thereby regulating cell proliferation, differentiation, apoptosis and migration. PI3K is thought to phosphorylate phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and convert it to another form, phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate [69]. Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate can be dephosphorylated by phosphatase and tensin homolog, which in turn blocks the PI3K/AKT/mTOR pathway [70, 71].

Activation of this signaling cascade in HNSCC cancer cells leads to the development of resistance to antitumor therapies, especially RT [72], which is associated with the induction of DNA repair [73]. After PT, there is a decrease in AKT phosphorylation followed by inhibition of signaling pathways, leading to decreased radioresistance [74]. Carbon ion irradiation resulted in decreased PI3K/AKT/mTOR activity in non-small cell lung cancer cells [57]. The study conducted on the cell line of glioblastoma multiforme U87 showed that proton irradiation of tumor cells under conditions of acute hypoxia leads to activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [75].

JAK/STAT signaling pathway

Another signaling pathway associated with the malignancy of HNSCC is JAK/STAT. A transmembrane protein called Janus kinase (JAK) perceives information from outside the cell and directs the signal inside the cell by phosphorylating STAT, which is a transcription factor. Activation of this signaling cascade is associated with resistance to various anticancer treatment approaches—chemotherapy, RT, and targeted therapy [76, 77]. It is unusual that activation of the participants of this signaling cascade is associated not only with changes in cancer cells directly, but also in the tumor microenvironment. For example, STAT3 activation leads to changes in the tumor microenvironment: it acquires immunosuppressive potential due to increased synthesis of cytokines TGF- β 1, IL-6, IL-10, and VEGF, which, in turn, ensures tumor escape from recognition and lysis by cytotoxic T-lymphocytes [78]. *In vitro* inhibition of STAT3 has been shown to be associated with a less pronounced development of immunosuppressive potential of the HNSCC tumor microenvironment [79]. In contrast, STAT5 activation observed in HNSCC correlates with increased cancer cell proliferation, invasion and EMT activity [80]. In our recent study on transcriptomic changes of HNSCC after PT, we observed suppression of STAT5 activity [81].

MAPK signaling pathway

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade has an important regulatory function in cancer cells. Such processes as proliferation of cancer cells, their subsequent differentiation, metastasis, and in addition the processes of angiogenesis and resistance to antitumor treatment are caused by the activation of the MAPK signaling pathway [82]. The MAPK signaling pathway includes RAS (H/K/NRAS), RAF (A-/B-/C-RAF), mitogen-activated protein kinase (MEK, MEK1/2), extracellular signal regulated kinases (ERK, ERK1/2), adaptor molecules (GRB2, SHC1/2/3/4) and dual specificity phosphatases (DUSP3/5/6/7/9), which are negative regulators of ERK [83]. It has been demonstrated that activation of several kinases, including BRAF,

KRAS, HRAS and ERK1/2, induces carcinogenesis and stimulates cancer cell invasion [84].

In HNSCC, mutations affecting members of the MAPK signaling pathway occur in about 18 % of cases [85]. These mutations are predominantly localized in BRAF, HRAS, KRAS, and ERK genes [86]; most of the mutations of the MAPK signaling pathway in HNSCC are inducers of carcinogenesis. High intratumoral expression of p-MAPK1/3 (p-ERK1/2) in HNSCC patients correlates with low survival rates [87].

Hyperexpression of one of the participants of the p38/MAPK signaling pathway, MAP2K6, in patients with HNSCC is associated with resistance to RT and poor prognosis of the disease [88]. In a study by Meerz et al., MAPK activation was detected in 3-D cell cultures of HNSCC after proton irradiation. In addition, the authors demonstrated radiosensitization of HNSCC cells when combining PT with selective inhibitors of key members of the MAPK pathway — for ERK1/2 (Ulixertinib); for JNK 1/2/3 (SP600125); for p38 α / β / γ / δ (Ralimetinib). The most pronounced radiosensitization effect was demonstrated by a selective ERK1/2 inhibitor [89]. Another work devoted to the effects of proton irradiation on the cell line of colorectal cancer, which revealed the inhibitory effect of PT on MAPK phosphorylation in cancer cells, is also noteworthy [90].

NOTCH signaling pathway

The NOTCH signaling cascade starts with 4 receptors (NOTCH1–4) to which 5 ligands (JAG1 and 2 and DLL1, 3 and 4) can bind. After ligand binding to the NOTCH receptor, the γ -secretase complex releases an intracellular NOTCH domain called NICD. NICD moves into the cell nucleus, which activates transcription of NOTCH target genes -HES and HEY [91]. A large-scale genomic analysis conducted in 2015 revealed that NOTCH 1–3 mutations are present in 17 % of HPV-positive and 26 % of HPV-negative HNSCC cases [41, 92].

An increase in the activity of NOTCH signaling pathway participants was observed in HNSCC cells, and their inhibition leads to a decrease in proliferation and invasion of cancer cells [91]. Activation of the

signaling pathway through NOTCH1 by Wnt-signaling stabilizes the population of CSCs, which is associated with frequent recurrences and active metastasis. Hovinga et al. demonstrated that Notch inhibition significantly improves response to radiation by reducing proliferation and self-renewal of CSCs in tumor explants [93]. In addition, survival of CSCs is maintained by activation of Akt and STAT3, which are almost always activated in cancer cells. These together account for tumor radioresistance [94]. On human glioma cell lines it was shown that carbon ion irradiation suppresses Notch signaling at all levels of transcription and translation of proteins participating in this pathway [95]. Proton boron capture therapy in GBM cells induces a Notch signaling activation, able to regulate cell fate through the modulation of autophagy/apoptosis transition [96].

PDGF/PDGFR signaling pathway

The peculiarity of this signaling pathway is that simultaneous expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and platelet derived growth factor receptor (PDGFR) is observed in cancer cells, which creates an autocrine loop that promotes aggressive tumor behavior. The PDGF ligand family includes several members: PDGFA, PDGFB, PDGFC, and PDGFD, which form homo- and heterodimers [97]. Upon ligand binding to the receptor, intracellular tyrosine kinases are activated and form multiple binding sites for downstream signaling molecules, thereby activating various signaling pathways such as PI3K/Akt/mTOR signaling cascades, MAPK signaling cascade, JAK/STAT and Notch signaling cascade [98].

The PDGF/PDGFR signaling pathway has been assigned a major role in tumor progression [99]. PDGF has been found to have a stimulatory effect on malignant cell transformation, cancer cell migration, and cancer cell survival [100, 98]. PDGF overexpression promotes tumor cell growth [101] and induces angiogenesis [102], affecting cells in the tumor microenvironment, thereby provoking tumor progression and dissemination [103, 104]. In addition, there is evidence that increased PDGF activity in tumors is associated with resistance to drug treatment, which is associated with impaired blood flow

in tumors due to increased interstitial fluid pressure [105]. Aebbersold et al. found that more than half of tumor samples from 95 patients with oropharyngeal cancer stained positive for PDGF-BB, and this was associated with an increased risk of metastasis [106]. After proton irradiation suppression of this signaling pathway was observed in HNSCC cells [81].

PD-1/PD-L1 signaling pathway

The PD-1/PD-L1 signaling pathway controls the induction and maintenance of immune tolerance in the tumor microenvironment [107]. PD-L1 is expressed by tumor cells and endows them with the ability to avoid an anti-tumor response by inhibiting activation of T cells (which express the PD1 receptor), reducing cytokine production, and inducing cytolysis of T cells. [108, 109]. Primary tumors and metastases, particularly in HNSCC, and even different regions of the same tumor node can differ significantly in PD-L1 expression levels [110, 111, 112]. There are conflicting data in the literature regarding the prognostic value of PD-L1 expression in HNSCC. A meta-analysis evaluating PD-L1 expression and the association with survival in HNSCC patients, found no significant difference in overall survival between PD-L1-positive and -negative patients [113]. Currently five monoclonal antibodies targeting PD-1 and PD-L1 have been approved by the FDA. Two of them target PD-L1, Atezolizumab and Durvalumab, and Nivolumab, Pembrolizumab and Cemiplimab target PD-1.

Proton irradiation of the KYSE450 (esophageal squamous cell carcinoma) cell line increased PD-L1 expression [114]. The combination of RT with immunotherapy for the treatment of HNSCC has long attracted the attention of researchers. When RT is combined with immune checkpoint inhibitors, it can potentiate the synergistic effects, where RT contributes to the normalization of the tumor vascular system, enhance the expression of leukocyte adhesion molecules on endothelial cells, and stimulate the secretion of chemokines that attract CD8⁺ T cells [115]. And a recent study revealed a synergistic effect of combining proton irradiation and immunotherapy on mouse oral cancer cell lines [116].

Conclusion

PT is a promising option for RT of HNSCC, minimizing the number of post-radiation complications and significantly improving the quality of life of patients undergoing antitumor treatment. However, radioresistance leads to treatment ineffectiveness in some cases. In the course of writing this review article, we encountered the fact that the described molecular-genetic signatures of this malignancy are not few, but they lack specificity, and the number of works devoted to the description of PT effects at the level of intracellular signaling pathways is limited. This determines the urgent need to search for molecular genetic biomarkers to predict response to PT. The understanding of molecular genetic changes induced by PT in tumor cells of HNSCC will allow to create effective combinations of antitumor therapies to avoid radioresistance.

References/Библиографический список

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660
- Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022;233(9):780–786. doi: 10.1038/s41415-022-5166-x
- IARC. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans. *IARC Monographs*; 2018. 14 p.
- Johnson DE, Burtneq B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3
- Sun Z, Sun X, Chen Z, Du J, Wu Y. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(1):19. doi: 10.1007/s10989-021-10334-5.
- Georgopoulos R, Liu JC. Examination of the patient with head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):409–21. doi: 10.1016/j.soc.2015.03.003
- Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist*. 2010;15(9):994–1001. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0289
- Guan Z, Liu J, Zheng L. Effect of radiotherapy on head and neck cancer tissues in patients receiving radiotherapy: a bioinformatics analysis-based study. *Sci Rep*. 2024;14(1):6304. doi: 10.1038/s41598-024-56753-4
- Nissi L, Suilamo S, Kytö E, Vaittinen S, Irjala H, Minn H. Recurrence of head and neck squamous cell carcinoma in relation to high-risk treatment volume. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2021;27:139–146. doi: 10.1016/j.ctro.2021.01.013
- Alfouzan AF. Radiation therapy in head and neck cancer. *Saudi Med J*. 2021;42(3):247–254. doi: 10.15537/smj.2021.42.3.20210660
- Borras JM, Barton M, Grau C, Corral J, Verhoeven R, Lemmens V, van Eycken L, Henau K, Primic-Zakelj M, Strojjan P, Trojanowski M, Dyzmann-Sroka A, Kubiak A, Gasparotto C, Defourny N, Malicki J, Dunscombe P, Coffey M, Lievens Y. The impact of cancer incidence and stage on optimal utilization of radiotherapy: Methodology of a population based analysis by the ESTRO-HERO project. *Radiother Oncol*. 2015;116(1):45–50. doi: 10.1016/j.radonc.2015.04.021
- Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C, Miles EA, Miah AB, Newbold K, Tanay M, Adab F, Jefferies SJ, Scrase C, Yap BK, A'Hern RP, Sydenham MA, Emson M, Hall E; PARSPORT trial management group. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):127–36. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70290-4
- Rosenthal DI, Chambers MS, Fuller CD, Rebuena NC, Garcia J, Kies MS, Morrison WH, Ang KK, Garden AS. Beam path toxicities to non-target structures during intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;72(3):747–55. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.01.012
- Newhauser W. Proton and Charged Particle Radiotherapy. *Medical Physics*. 2008;35(35). doi: 10.1118/1.2907963
- Beddok A, Vela A, Calugaru V, Tessonnier T, Kubes J, Dutheil P, Gerard A, Vidal M, Goudjil F, Florescu C, Kammerer E, Benezery K, Haurault J, Poortmans P, Bourhis J, Thariat J; GORTEC, the 3 French proton centers. Proton therapy for head and neck squamous cell carcinomas: A review of the physical and clinical challenges. *Radiother Oncol*. 2020;147:30–39. doi: 10.1016/j.radonc.2020.03.006
- Taheri-Kadkhoda Z, Björk-Eriksson T, Nill S, Wilkens JJ, Oelfke U, Johansson KA, Huber PE, Münter MW. Intensity-modulated radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma: a comparative treatment planning study of photons and protons. *Radiat Oncol*. 2008;3:4. doi: 10.1186/1748-717X-3-4
- Simone CB 2nd, Ly D, Dan TD, Ondos J, Ning H, Belard A, O'Connell J, Miller RW, Simone NL. Comparison of intensity-modulated radiotherapy, adaptive radiotherapy, proton radiotherapy, and adaptive proton radiotherapy for treatment of locally advanced head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2011;101(3):376–82. doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.028
- van de Water TA, Bijl HP, Schilstra C, Pijls-Johannesma M, Langendijk JA. The potential benefit of radiotherapy with protons in head and neck cancer with respect to normal tissue sparing: a systematic review of literature. *Oncologist*. 2011;16(3):366–77. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0171
- Nuyts S, Bollen H, Ng SP, Corry J, Eisbruch A, Mendenhall WM, Smee R, Strojjan P, Ng WT, Ferlito A. Proton Therapy for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Early Clinical Experience and Current Challenges. *Cancers (Basel)*. 2022;14(11):2587. doi: 10.3390/cancers14112587
- Liu H, Chang JY. Proton therapy in clinical practice. *Chin J Cancer*. 2011;30(5):315–26. doi: 10.5732/cjc.010.10529
- Bragg WH, Kleeman R. On the ionization curves of radium. *J Philos Mag*. 1904;6:726–738. doi: 10.1080/14786440409463246
- Byun HK, Han MC, Yang K, Kim JS, Yoo GS, Koom WS, Kim YB. Physical and Biological Characteristics of Particle Therapy for Oncologists. *Cancer Res Treat*. 2021;53(3):611–620. doi: 10.4143/crt.2021.066
- Vitti ET, Parsons JL. The Radiobiological Effects of Proton Beam Therapy: Impact on DNA Damage and Repair. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):946. doi: 10.3390/cancers11070946

24. Alan Mitterer R, Wang Y, Shah J, Gordon S, Fager M, Butter PP, Jun Kim H, Guardiola-Salmeron C, Carabe-Fernandez A, Fan Y. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. *Sci Rep*. 2015;5:13961. doi: 10.1038/srep13961
25. Jumaniyazova E, Smyk D, Vishnyakova P, Fatkhudinov T, Gordon K. Photon- and Proton-Mediated Biological Effects: What Has Been Learned? *Life (Basel)*. 2022;13(1):30. doi: 10.3390/life13010030
26. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):737–47. doi: 10.1038/nrc1451
27. Frame CM, Chen Y, Gagnon J, Yuan Y, Ma T, Dritschilo A, Pang D. Proton induced DNA double strand breaks at the Bragg peak: Evidence of enhanced LET effect. *Front Oncol*. 2022;12:930393. doi: 10.3389/fonc.2022.930393
28. Miszczyk J, Rawojc K, Borkowska AM, Panek A, Swakon J, Galas A, Ahmed MM, Prasanna PGS. Therapeutic proton irradiation results in apoptosis and caspase-3 activation in human peripheral blood lymphocytes. *Transl Cancer Res* 2018;7(4):879–889. doi:10.21037/tcr.2018.06.14
29. Ogata T, Teshima T, Kagawa K, Hishikawa Y, Takahashi Y, Kawaguchi A, Suzumoto Y, Nojima K, Furusawa Y, Matsuura N. Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(1):113–120. doi:10.1158/0008-5472.113.65.1
30. Grinde MT, Vik J, Camilio KA, Martinez-Zubiaurre I, Hellevik T. Ionizing radiation abrogates the pro-tumorigenic capacity of cancer-associated fibroblasts co-implanted in xenografts. *Sci Rep*. 2017;7:46714. doi: 10.1038/srep46714
31. Genard G, Wera AC, Huart C, Le Calve B, Penninckx S, Fattaccioli A, Tabarrant T, Demazy C, Ninane N, Heuskin AC, Lucas S, Michiels C. Proton irradiation orchestrates macrophage reprogramming through NFκB signaling. *Cell Death Dis*. 2018;9(7):728. doi: 10.1038/s41419-018-0757-9
32. Mirjolet C, Nicol A, Limagne E, Mura C, Richard C, Morgand V, Rousseau M, Boidot R, Ghiringhelli F, Noel G, Burckel H. Impact of proton therapy on antitumor immune response. *Sci Rep*. 2021;11(1):13444. doi: 10.1038/s41598-021-92942-1
33. Lupu-Plesu M, Claren A, Martial S, N'Diaye PD, Lebrigand K, Pons N, Ambrosetti D, Peyrottes I, Feuillade J, Héroult J, Dufies M, Doyen J, Pagès G. Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis*. 2017;6(7): e354. doi: 10.1038/oncsis.2017.56
34. Wang L, Fossati P, Paganetti H, Ma L, Gillison M, Myers JN, Hug E, Frank SJ. The Biological Basis for Enhanced Effects of Proton Radiation Therapy Relative to Photon Radiation Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Part Ther*. 2021;8(1):3–13. doi: 10.14338/IJPT-20-00070.1
35. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):335–9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.015
36. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):269–282. doi: 10.1038/nrc.2018.11
37. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysyk Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):133–143. doi: 10.1038/cdd.2017.174
38. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):89–102. doi: 10.1038/nrc.2017.109
39. Kaiser AM, Attardi LD. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):93–103. doi: 10.1038/cdd.2017.171
40. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):104–113. doi: 10.1038/cdd.2017.169
41. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576–582. doi:10.1038/nature14129
42. Di Pietro C, Piro S, Tabbi G, Ragusa M, Di Pietro V, Zimmiti V, Cuda F, Anello M, Consoli U, Salinaro ET, Caruso M, Vancheri C, Crimi N, Sabini MG, Cirrone GA, Raffaele L, Privitera G, Pulvirenti A, Giugno R, Ferro A, Cuttone G, Lo Nigro S, Purrello R, Purrello F, Purrello M. Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy. *Apoptosis*. 2006;11(1):57–66. doi: 10.1007/s10495-005-3346-1
43. Lee KB, Lee JS, Park JW, Huh TL, Lee YM. Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Exp Mol Med*. 2008;40(1):118–29. doi: 10.3858/em.2008.40.1.118
44. Chun SY, Nam KS, Lee KS. Proton Beam Induces P53-mediated Cell Cycle Arrest in HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biotechnol Bioproc. E*. 2020;25:141–148. doi:10.1007/s12257-019-0390-1
45. Lee CL, Blum JM, Kirsch DG. Role of p53 in regulating tissue response to radiation by mechanisms independent of apoptosis. *Transl. Cancer Res*. 2013;2(5):412–421. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.09.01
46. Bravatà V, Cammarata FP, Minafra L, Pisciotta P, Scazzone C, Manti L, Savoca G, Petringa G, Cirrone GAP, Cuttone G, Gilardi MC, Forte GI, Russo G. Proton-irradiated breast cells: molecular points of view. *J Radiat Res*. 2019;60(4):451–465. doi: 10.1093/jrr/rrz032
47. Lee KB, Kim KR, Huh TL, Lee YM. Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways. *Int J Oncol*. 2008;33(6):1247–56. doi:10.3892/ijo_00000115.
48. Chung CH, Germain A, Subramaniam RM, Heilmann AM, Fedorchak K, Ali SM, Miller VA, Palermo RA, Fakhry C. Genomic alterations in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/ERBB2) in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2017;39(1): E15-E19. doi: 10.1002/hed.24587
49. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(2):228–240. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.008
50. Xu MJ, Johnson DE, Grandis JR. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):463–473. doi: 10.1007/s10555-017-9687-8
51. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med*. 2019;51(1):1–14. doi: 10.1038/s12276-018-0202-2
52. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(1):3–20. doi: 10.1002/1878-0261.12155
53. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, Tavassoli M. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019;10(8):540. doi: 10.1038/s41419-019-1769-9
54. Madoz-Gúrpide J, Zazo S, Chamizo C, Casado V, Caramés C, Gavín E, Cristóbal I, García-Foncillas J, Rojo F. Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent

- or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med*. 2015;13:282. doi: 10.1186/s12967-015-0633-7
55. Park HJ, Oh JS, Chang JW, Hwang SG, Kim JS. Proton Irradiation Sensitizes Radioresistant Non-small Cell Lung Cancer Cells by Modulating Epidermal Growth Factor Receptor-mediated DNA Repair. *Anticancer Res*. 2016;36(1):205–12
56. Juvkam IS, Zlygosteva O, Sitarz M, Thiede B, Sørensen BS, Malinen E, Edin NJ, Søland TM, Galtung HK. Proton Compared to X-Irradiation Induces Different Protein Profiles in Oral Cancer Cells and Their Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23):16983. doi: 10.3390/ijms242316983
57. Ogata T, Teshima T, Inaoka M, Minami K, Tsuchiya T, Isono M, Furusawa Y, Matsuura N. Carbon ion irradiation suppresses metastatic potential of human non-small cell lung cancer A549 cells through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway. *J Radiat Res*. 2011;52(3):374–9. doi: 10.1269/jrr.10102
58. Stahler C, Roth J, Cordes N, Taucher-Scholz G, Mueller-Klieser W. Impact of carbon ion irradiation on epidermal growth factor receptor signaling and glioma cell migration in comparison to conventional photon irradiation. *Int J Radiat Biol*. 2013;89(6):454–61. doi: 10.3109/09553002.2013.766769
59. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3(1 Suppl): S7-S19. doi: 10.1177/1758834011422556
60. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(4):309–25. doi: 10.1023/a:1023768811842
61. Khedkar HN, Chen LC, Kuo YC, Wu ATH, Huang HS. Multi-Omics Identification of Genetic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Therapeutic Efficacy of HNC018 as a Novel Multi-Target Agent for c-MET/STAT3/AKT Signaling Axis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12):10247. doi: 10.3390/ijms241210247
62. Cho YA, Kim EK, Heo SJ, Cho BC, Kim HR, Chung JM, Yoon SO. Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer*. 2016;7(15):2197–2206. doi: 10.7150/jca.16686
63. Rothenberger NJ, Stabile LP. Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling in Head and Neck Cancer and Implications for Treatment. *Cancers (Basel)*. 2017;9(4):39. doi: 10.3390/cancers9040039
64. Szturz P, Raymond E, Abitbol C, Albert S, de Gramont A, Faivre S. Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;111:39–51. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.004
65. Lang L, Chen F, Li Y, Shay C, Yang F, Dan H, Chen ZG, Saba NF, Teng Y. Adaptive c-Met-PLXDC2 Signaling Axis Mediates Cancer Stem Cell Plasticity to Confer Radioresistance-associated Aggressiveness in Head and Neck Cancer. *Cancer Res Commun*. 2023;3(4):659–671. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-22-0289
66. Liu D, Zhong M, Zhan D, Zhang Y, Liu S. Roles of the HGF/Met signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Focus on tumor immunity (Review). *Oncol Rep*. 2020;44(6):2337–2344. doi: 10.3892/or.2020.7799
67. Marquard FE, Jücker M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochem Pharmacol*. 2020;172:113729. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113729
68. Vander Broek R, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies. *Oral Dis*. 2015;21(7):815–25. doi: 10.1111/odi.12206
69. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606–19. doi: 10.1038/nrg1879
70. Zhang P, Steinberg BM. Overexpression of PTEN/MMAC1 and decreased activation of Akt in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res*. 2000;60(5):1457–62
71. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13375–8. doi: 10.1074/jbc.273.22.13375
72. Su YC, Lee WC, Wang CC, Yeh SA, Chen WH, Chen PJ. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway as a Radiosensitization in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15749. doi: 10.3390/ijms232415749
73. Glorieux M, Dok R, Nuyts S. The influence of PI3K inhibition on the radiotherapy response of head and neck cancer cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):16208. doi: 10.1038/s41598-020-73249-z
74. Lee KS, Lee DH, Chun SY, Nam KS. Metastatic potential in MDA-MB-231 human breast cancer cells is inhibited by proton beam irradiation via the Akt/nuclear factor- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2014;10(2):1007–12. doi: 10.3892/mmr.2014.2259
75. Bravatà V, Tinganelli W, Cammarata FP, Minafra L, Calvaruso M, Sokol O, Petringa G, Cirrone GAP, Scifoni E, Forte GI, Russo G. Hypoxia Transcriptomic Modifications Induced by Proton Irradiation in U87 Glioblastoma Multiforme Cell Line. *J Pers Med*. 2021;11(4):308. doi: 10.3390/jpm11040308
76. Geiger JL, Grandis JR, Bauman JE. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol*. 2016;56:84–92. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.022
77. Avalle L, Camporeale A, Morciano G, Carocchia N, Ghetti E, Orecchia V, Viavattene D, Giorgi C, Pinton P, Poli V. STAT3 localizes to the ER, acting as a gatekeeper for ER-mitochondrion Ca^{2+} fluxes and apoptotic responses. *Cell Death Differ*. 2019;26(5):932–942. doi: 10.1038/s41418-018-0171-y
78. Bu LL, Yu GT, Wu L, Mao L, Deng WW, Liu JF, Kulkarni AB, Zhang WF, Zhang L, Sun ZJ. STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC. *J Dent Res*. 2017;96(9):1027–1034. doi: 10.1177/0022034517112435
79. Albesiano E, Davis M, See AP, Han JE, Lim M, Pardoll DM, Kim Y. Immunologic consequences of signal transducers and activators of transcription 3 activation in human squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(16):6467–76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4058
80. Koppikar P, Lui VW, Man D, Xi S, Chai RL, Nelson E, Tobey AB, Grandis JR. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7682–90. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1328
81. Jumaniyazova ED, Vishnyakova PA, Chirkova MV, Karpulevich EA, Eremina IZ, Gordon KB, Kaprin AD, Fatkhudinov TH. Study of head and neck squamous cell carcinoma transcriptome after proton therapy. *Bull Siberian Med*. 2024;1(23):37–47. doi:10.20538/1682-0363-2024-1-37-47
82. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020;9(1):198. doi: 10.3390/cells9010198
83. Barbosa R, Acevedo LA, Marmorstein R. The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Mol Cancer Res*. 2021;19(3):361–374. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0687
84. Samatar AA, Poulidakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(12):928–42. doi: 10.1038/nrd4281
85. Ngan HL, Liu Y, Fong AY, Poon PHY, Yeung CK, Chan SSM, Lau A, Piao W, Li H, Tse JSW, Lo KW, Chan SM, Su YX, Chan JYK, Lau CW, Mills GB, Grandis JR, Lui VWY. MAPK pathway mutations

in head and neck cancer affect immune microenvironments and ErbB3 signaling. *Life Sci Alliance*. 2020;3(6): e201900545. doi: 10.26508/lsa.201900545

86. Zhang L, MacIsaac KD, Zhou T, Huang PY, Xin C, Dobson JR, Yu K, Chiang DY, Fan Y, Pelletier M, Wang Y, Jaeger S, Krishnamurthy Radhakrishnan V, JeBailey L, Skewes-Cox P, Zhang J, Fang W, Huang Y, Zhao H, Zhao Y, Li E, Peng B, Huang A, Dranoff G, Hammerman PS, Engelman J, Bitter H, Zeng YX, Yao Y. Genomic Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma Reveals TME-Based Subtypes. *Mol Cancer Res*. 2017;15(12):1722–1732. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0134

87. Theocharis S, Kotta-Loizou I, Klijanienko J, Giaginis C, Alexandrou P, Dana E, Rodriguez J, Patsouris E, Sastre-Garau X. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) expression and activation in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6455–65. doi: 10.1007/s13277-014-1853-9

88. Li Z, Li N, Shen L. MAP2K6 is associated with radiation resistance and adverse prognosis for locally advanced nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6905–6912. doi: 10.2147/CMAR.S184689

89. Meerz A, Deville SS, Müller J, Cordes N. Comparative Therapeutic Exploitability of Acute Adaptation Mechanisms to Photon and Proton Irradiation in 3D Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Cultures. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1190. doi: 10.3390/cancers13061190

90. Ha BG, Park JE, Cho HJ, Lim YB, Shon YH. Inhibitory effects of proton beam irradiation on integrin expression and signaling pathway in human colon carcinoma HT29 cells. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2621–8. doi: 10.3892/ijo.2015.2942

91. Fukusumi T, Califano JA. The NOTCH Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*. 2018;97(6):645–653. doi: 10.1177/0022034518760297

92. Nowell CS, Radtke F. Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(3):145–159. doi: 10.1038/nrc.2016.145

93. Hovinga KE, Shimizu F, Wang R, Panagiotakos G, Van Der Heijden M, Moayedpardazi H, Correia AS, Soulet D, Major T, Menon J, Tabar V. Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells*. 2010;28(6):1019–29. doi: 10.1002/stem.429

94. Yahyanejad S, Theys J, Vooijs M. Targeting Notch to overcome radiation resistance. *Oncotarget*. 2016;7(7):7610–28. doi: 10.18632/oncotarget.6714

95. Kumar V, Vashishta M, Kong L, Lu JJ, Wu X, Dwarakanath BS, Guha C. Carbon Ion Irradiation Downregulates Notch Signaling in Glioma Cell Lines, Impacting Cell Migration and Spheroid Formation. *Cells*. 2022;11(21):3354. doi: 10.3390/cells11213354

96. Cammarata FP, Torrisi F, Vicario N, Bravatà V, Stefano A, Salvatorelli L, D'Aprile S, Giustetto P, Forte GI, Minafra L, Calvaruso M, Richiusa S, Cirrone GAP, Petringa G, Broggi G, Cosentino S, Scopelliti F, Magro G, Porro D, Libra M, Ippolito M, Russo G, Parenti R, Cuttone G. Proton boron capture therapy (PBCT) induces cell death and mitophagy in a heterotopic glioblastoma model. *Commun Biol*. 2023;6(1):388. doi: 10.1038/s42003-023-04770-w

97. Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(3):273–83. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.03.003

98. Lin LH, Lin JS, Yang CC, Cheng HW, Chang KW, Liu CJ. Overexpression of Platelet-Derived Growth Factor and Its Receptor Are Correlated with Oral Tumorigenesis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2360. doi: 10.3390/ijms21072360

99. Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*. 2013;11:97. doi: 10.1186/1478-811X-11-97

100. Farooqi AA, Siddik ZH. Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape. *Cell Biochem Funct*. 2015;33(5):257–65. doi: 10.1002/cbf.3120

101. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*. 2003;3(5):439–43. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00089-8

102. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242–5. doi: 10.1126/science.277.5323.242

103. Pandey P, Khan F, Upadhyay TK, Seungjoon M, Park MN, Kim B. New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother*. 2023;161:114491. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114491

104. Kondratyuk RB, Grekov IS, Seleznev EA. Microenvironment influence on the development of epithelial-mesenchymal transformation in lung cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2022;26(3):325–337. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337

105. Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):806–13. doi: 10.1038/nrc1456

106. Aebersold DM, Froehlich SC, Jonczy M, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Djonov V. Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factors A and B in oropharyngeal cancers treated by curative radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2002;63(3):275–83. doi: 10.1016/s0167-8140(02)00131-7

107. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727–742

108. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21(1):24–33. doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009

109. Qiao XW, Jiang J, Pang X, Huang MC, Tang YJ, Liang XH, Tang YL. The Evolving Landscape of PD-1/PD-L1 Pathway in Head and Neck Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:1721. doi: 10.3389/fimmu.2020.01721

110. Chen TC, Wu CT, Wang CP, Hsu WL, Yang TL, Lou PJ, Ko JY, Chang YL. Associations among pretreatment tumor necrosis and the expression of HIF-1 α and PD-L1 in advanced oral squamous cell carcinoma and the prognostic impact thereof. *Oral Oncol*. 2015;51(11):1004–1010. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.08.011

111. Scognamiglio T, Chen YT. Beyond the Percentages of PD-L1-Positive Tumor Cells: Induced Versus Constitutive PD-L1 Expression in Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2018;12(2):221–229. doi: 10.1007/s12105-017-0857-3

112. Kwon MJ, Rho YS, Nam ES, Cho SJ, Park HR, Min SK, Seo J, Choe JY, Kim ES, Park B, Hong M, Min KW. Clinical implication of programmed cell death-1 ligand-1 expression in tonsillar squamous cell carcinoma in association with intratumoral heterogeneity, human papillomavirus, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2018;80:28–39. doi: 10.1016/j.humpath.2018.03.025

113. Yang WF, Wong MCM, Thomson PJ, Li KY, Su YX. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2018;86:81–90. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.016

114. Du J, Kageyama SI, Hirata H, Motegi A, Nakamura M, Hirano Y, Okumura M, Yamashita R, Tsuchihara K, Hojo H, Hirayama R, Akimoto T. Comparative analysis of the immune responses in cancer cells irradiated with X-ray, proton and carbon-ion beams.

Biochem Biophys Res Commun. 2021;585:55–60. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.11.004

115. Ko EC, Formenti SC. Radiation therapy to enhance tumor immunotherapy: a novel application for an established modality. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(7):936–939. doi: 10.1080/09553002.2019.1623429


116. Rykkelid AM, Sinha PM, Folefac CA, Horsman MR, Sørensen BS, Søland TM, Schreurs OJF, Malinen E, Edin NFJ. Combination of proton- or X-irradiation with anti-PDL1 immunotherapy in two murine oral cancers. *Sci Rep*. 2024;14(1):11569. doi: 10.1038/s41598-024-62272-z

Молекулярно-генетические сигнатуры плоскоклеточного рака головы и шеи и их изменения, индуцированные протонным облучением

Э.Д. Джуманиязова¹  , А.В. Сентябрева^{1,3} ,
А.М. Косырева^{1,3} , А.В. Лохонина^{1,2} 

¹Научно-исследовательский Институт молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, г. Москва, Российская Федерация

³Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация
 enar2017@yandex.ru

Аннотация. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает седьмое место в десятке наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире. Отмечается рост общей заболеваемости ПРГШ, и прогнозируется, что к 2030 году она будет увеличиваться примерно на 30 % ежегодно. Клинически ПРГШ характеризуется агрессивным течением: быстрым локальным распространением, резистентностью к различным методам противоопухолевого лечения и частыми рецидивами. Несмотря на усовершенствования диагностических и терапевтических подходов за последние два десятилетия, исходы пациентов с ПРГШ, особенно с поздними стадиями заболевания, не улучшились - их общая пятилетняя выживаемостью составляет 50 %. Примерно 75 % пациентов с ПРГШ назначается лучевая терапия в качестве самостоятельного или в составе комплексного лечения. На сегодняшний день одним из основных путей повышения эффективности лучевой терапии при ПРГШ считается сочетание максимально допустимого повышения дозы облучения в опухоли-мишени при минимизации ее в окружающих здоровых тканях. С этой точки зрения протонная терапия (ПТ) обладает выраженным преимуществом по сравнению с различными видами фотонного облучения. Несмотря на растущий интерес ученых к ПТ, исследований, направленных на выявление молекулярно-генетических изменений, индуцированных ПТ, недостаточно; тогда как, на наш взгляд, они очень важны для понимания внутриклеточных механизмов, ведущих либо к уничтожению опухолевых клеток, либо к развитию радиорезистентности. В данном обзоре обобщены имеющиеся знания об изменениях основных сигнальных путей опухолевых клеток ПРГШ под действием ПТ.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, протонная терапия, протоны, сигнальные пути; сигнальный каскад; молекулярно-генетические сигнатуры

Информация о финансировании. Работа выполнена при поддержке трехстороннего соглашения Российского научного фонда № 24-24-00296 от 29.12.2023 по проекту «Влияние протонной терапии на молекулярный портрет микроокружения опухолей головы и шеи» конкурса 2023 года «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами» между РНФ, Лохониной А.В. и РУДН.

Вклад авторов. Джуманиязова Э.Д. — концепция и написание рукописи, составление иллюстрации; Лохонина А.В. — проверка интеллектуального содержимого рукописи; Сентябрева А.В. — написание рукописи, Косырева А.М. — проверка интеллектуального содержимого рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарности. Коллектив авторов приносит благодарность Казаряну Г.Г. за техническую поддержку в процессе подготовки рукописи.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 24.07.2024. Принята 03.09.2024.

Для цитирования: *Jumaniyazova E.D., Sentyabreva A.V., Kosyreva A.M., Lokhonina A.V.* Molecular genetic signatures of head and neck squamous cell carcinoma and their changes induced by proton irradiation // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 413–426. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-413-426. EDN: GKJBSB

Corresponding author: Jumaniyazova Enar Denisovna — PhD student, assistant at the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Medical Institute of the Russian Peoples' Friendship University, researcher at the Laboratory of Molecular Cell Pathophysiology of the Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya st., 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: enar2017@yandex.ru
Jumaniyazova E.D. ORCID 0000-0002-8226-0433
Sentyabreva A.V. ORCID 0000-0001-5064-219X
Kosyreva A.M. ORCID 0000-0002-6182-1799
Lokhonina A.V. ORCID 0000-0001-8077-2307

Ответственный за переписку: Джуманиязова Э.Д. — аспирант, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института Российского университета дружбы народов, стажер-исследователь лаборатории молекулярной патофизиологии клетки Научно-исследовательского института молекулярной и клеточной медицины Российского Университета дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: enar2017@yandex.ru











Джуманиязова Э.Д. SPIN 1780-5326, ORCID 0000-0002-8226-0433
Сентябрева А.В. SPIN 6966-9959, ORCID 0000-0001-5064-219X
Косырева А.М. SPIN 5421-5520, ORCID 0000-0002-6182-1799
Лохонина А.В. SPIN 4521-2250, ORCID 0000-0001-8077-2307



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-427-438
EDN GNCAUM


ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer

Tatiana S. Gerashchenko¹  , Marina R. Patysheva¹ , Anastasia A. Fedorenko^{1,2} ,
Anastasia P. Filatova¹ , Maria A. Vostrikova¹ , Olga D. Bragina¹ ,
Anton A. Fedorov¹ , Pavel S. Iamshchikov¹ , Evgeny V. Denisov¹ 

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, *Tomsk, Russian Federation*

² National Research Tomsk State University, *Tomsk, Russian Federation*

 t_gerashchenko@oncology.tomsk.ru

Abstract. Relevance. Monocytes are circulating immune cells which are traditionally divided into three subsets. The contribution of each subset to breast cancer pathogenesis is controversial. Moreover, there is no data regarding the programming of monocyte subsets towards antitumor activity induced by chemotherapy. **Aim.** To study the trajectories of monocyte subsets and transcriptomic changes in blood monocytes during neoadjuvant chemotherapy (NAC). **Materials and Methods.** Mononuclear cells were purified from the peripheral blood of nine triple-negative breast cancer (TNBC) patients before NAC and on the 3rd and 21st day after the first NAC cycle (AC regimen). Total cell concentration and viability (Calcein/DRAQ7) were assessed by flow cytometry. Single-cell RNA sequencing was performed on a Genolab M platform (GeneMind Biosciences) using the 10x Genomics technology for fixed samples. Data were analyzed using Seurat, SingleR, and the dynverse R package for trajectories. **Results and Discussion.** The trajectory analysis indicated that monocytes were clustered into three subsets: classical, non-classical, and intermediate. Classical monocytes were characterized by high expression of *CD14*, *CSF3R*, *S100A8*, *S100A9*, *VCAN*, *LYZ*, *SELL*, and *GRN* genes, whereas non-classical monocytes expressed *FCGR3A*, *MTSS1*, *TCF7L2*, *CSF1R*, *SPN*, *EVL*, and *LYN*. The developmental trajectories of monocytes were significantly affected by chemotherapy. Transcriptionally, classical monocytes were subdivided into two clusters: one characterized by proliferative signals and the other by stress signals. By day 21st after NAC, developmental trajectories of monocytes and their subset composition were observed to recover. Chemotherapy promoted the pro-inflammatory activity of monocytes. **Conclusion.** Peripheral blood monocytes of TNBC patients are capable of recovering their subset composition after NAC by the 21st day after the first cycle of chemotherapy.

Keywords: breast cancer, single-cell RNA seq (scRNA seq), monocytes, chemotherapy, developmental trajectories

© Gerashchenko T.S., Patysheva M.R., Fedorenko A.A., Filatova A.P., Vostrikova M.A., Bragina O.D., Fedorov A.A., Iamshchikov P.S., Denisov E.V., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Funding. This project was supported by the Russian Science Foundation, grant number 22–75–10128.

Author contributions. Gerashchenko T.S. — methodology, investigation, visualization, writing original draft and editing; project administration; funding acquisition; Patysheva M.R. — investigation, methodology, conceptualization, writing and editing; Fedorenko A.A. — methodology, data curation; Filatova A.P. — software, formal analysis, visualization; Vostrikova M.A. — resources, data curation; Bragina O.D. — resources, data curation; Fedorov A.A. — methodology, data curation; Iamshchikov P.S. — software, formal analysis; Denisov E.V. — writing and editing. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was approved by the review board of the Cancer Research Institute, Tomsk NRMC on 29 August 2022 (protocol № 16). The procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration (1964, amended in 1975 and 1983).

Acknowledgements. The study was carried out using equipment of the Tomsk Regional Common Use Center and the Core Facility of Medical Genomics at the Tomsk NRMC.

Consent for publication. All patients signed informed consent for voluntary participation and personal data processing. Received 17.04.2024. Accepted 15.05.2024.

For citation: Gerashchenko TS, Patysheva MR, Fedorenko AA, Filatova AP, Vostrikova MA, Bragina OD, Fedorov AA, Iamshchikov PS, Denisov EV. Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):427–438. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-427-438. EDN: GNCAUM

Introduction

Monocytes are immune effector cells belonging to the myeloid lineage of leukocytes. They are primarily generated from a common myeloid progenitor (CMP) in the bone marrow, a source they share with neutrophils and conventional dendritic cells (DCs). In inflammatory conditions, such as cancer, monocytes can be produced and released extramedullary by the spleen, a large peripheral reservoir of monocytes [1]. Monocytes comprise approximately 10 % of circulating blood cells and contribute to innate immunity by phagocytosis, secretion of mediators, recruitment of lymphocytes, etc. However, the primary function of monocytes is to migrate to tissue and mediate immune defense, mostly by differentiating into tissue-resident macrophages [2–4].

Based on their morphology and surface expression of CD14 and CD16 receptors, monocytes are divided into three main subsets: classical (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺ CD16⁺), and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺) [5]. Classical monocytes constitute 90 % of the circulating monocyte pool, whereas the

remaining 10 % consist of intermediate and non-classical subsets [6]. Functionally, monocyte subsets significantly differ from each other. Classical monocytes have immunoregulatory properties, as they can migrate to the site of inflammation to maintain or resolve it. In the blood, they mostly exhibit pro-inflammatory activity, producing TNF α , IL-6, IL-1 β , and other cytokines [7]. Non-classical monocytes can strongly adhere to the endothelium and thus are involved in patrolling and repair of vasculature [8]. They have a longer lifespan lasting seven days, compared to classical monocytes which circulate in the blood for approximately a day [9]. Classical monocytes are thought to differentiate into non-classical through an intermediate state triggered by signals from the vascular endothelium [10–12]. Microarray and flow cytometry data demonstrate that intermediate monocytes share the vast majority of gene transcripts and proteins with classical and non-classical monocytes, thereby representing a bridge linking the two subsets [6].

As macrophage precursors, monocytes are known to be critical regulators of the antitumor immune

response and tissue regenerations [9]. They orchestrate immune reactions in the tumor microenvironment, affecting disease outcomes and anticancer therapy efficiency [3]. However, the involvement of monocyte subsets in cancer varies. Thus, classical monocytes contribute to phagocytosis, promotion of angiogenesis, remodeling of the extracellular matrix, recruitment of lymphocytes, and their differentiation into macrophages and DCs in cancer tissue [13]. Monocyte-derived macrophages mostly provide tumor-supporting activity [1,3]. On the other hand, the role of non-classical monocytes in cancer formation is less clear. They are able to extravasate during inflammation and display anti-inflammatory properties [9]. Nonetheless, their role is widely described as protective as they can scavenge endothelium-derived cellular debris, pathogens, and even cancer cells [14]. Higher non-classical monocyte percentages correlate with a favorable overall survival in lung cancer, while the prevalence of classical monocytes correlates with shorter overall survival [15]. In a mouse model of melanoma, a high concentration of non-classical monocytes in the lung vasculature is linked to reduced tumor metastasis to the lungs [16]. Although the intermediate state of monocytes is fluid, these cells are also believed to play a protective role. There is data about their involvement in the inhibition of cancer metastasis by promoting NK cell activation through FOXO1 and interleukin-27 [10].

The initial monocyte ratio is an important parameter of antitumor immunity. Due to the diverse activities of monocyte subsets, they may specifically impact tumor progression. However, their functionality may be altered by cancer treatment, especially chemotherapy. It is known that monocytes are reprogrammed by treatment, which can change their total amount, subset composition, subsequent differentiation to macrophages, and other characteristics [3]. However, there is still no data on how the subset differentiation and transcriptional profiles of monocytes are affected during chemotherapy. Here we applied single-cell sequencing of blood mononuclear cells to reveal, in high resolution, the development trajectories and transcriptional changes in monocytes of TNBC patients undergoing chemotherapy.

Materials and methods

Patients

Nine patients with triple-negative breast cancer (TNBC), treated at the Cancer Research Institute of the Tomsk NRMC between February 2022 and June 2023, were enrolled in the study. All patients had histologically confirmed TNBC (invasive ductal carcinoma of the IA-III B stage) and received neoadjuvant chemotherapy (NAC). All patients received eight cycles of chemotherapy comprising four rounds of adriamycin with cyclophosphamide followed by four rounds of platina and taxanes. The detailed clinical information is given in Table 1.

Table 1

Patient cohort details

Case ID	Age	Stage	TNM	ER expression	PR expression	HER2 expression	Ki67, %
1	64	IIA	T2N0M0	0	0	1+	13
2	69	IIA	T1N1M0	0	0	1+	70
3	63	IIA	T2N0M0	0	0	0	70
4	48	IIA	T2N0M0	2+	2+	0	95
5	53	IIIB	T4N1M0	0	0	0	90
6	55	II	T2N1M0	0	3+	0	80
7	40	IIA	T2N0M0	0	0	0	30
8	42	IIA	T2N0M0	0	0	0	90
9	31	IIA	T2N0M0	0	0	2+	80

Note: ER – estrogen receptor, PR – progesterone receptor, HER2 – tyrosine-protein kinase erbB-2 receptor, Ki67 – protein, tumor proliferation marker.

Blood samples were collected before the first cycle of adriamycin with cyclophosphamide and then on the 3rd and 21st days after the first full course of NAC, with informed consent signed by patients. All experiments were performed following the guidelines and regulations of the Local Committee for Medical Ethics of the Cancer Research Institute of Tomsk NRMC, and according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonisation's Good Clinical Practice Guidelines (ICH GCP) with written informed consent from all subjects. The study was approved by the review board of the Cancer Research Institute of the Tomsk NRMC on 29 August 2022 (the approval protocol #16).

PBMC isolation and storage

Mononuclear cells were purified from peripheral venous blood using Ficoll density gradient centrifugation. Total cell concentration and viability (Calcein/DRAQ7) were assessed by flow cytometry (Cytotflex, Beckman Coulter). The total number of live blood cells in an aliquot was up to 8×10^6 cells. Cell suspensions were frozen in 90 % fetal bovine serum (FBS) + 10 % DMSO freezing medium (Helicon, Russia) for seven days at -80°C , then transferred to liquid nitrogen for long-term storage at -196°C (up to six months). At the time of the experiment, collected single-cell suspensions from the biobank were thawed and fixed following the Fixation of Cells & Nuclei for Chromium Fixed RNA protocol Profiling CG000478 | Rev A. The tubes containing cell suspensions were stored short-term at $+4^\circ\text{C}$ until single-cell library preparation.

Construction of single-cell RNA libraries and sequencing

Fixed samples ($n=15$) were hybridized with probes and pooled in two pools according to the Chromium Next GEM Single Cell Fixed RNA Sample Preparation User Guide (10x Genomics CG000527 | Rev D). Single-cell emulsions were obtained using Chromium X. RNA Gene expression libraries were produced following the manufacturer's recommendations. Quality control was performed on Qsep 400 (BiOptic Inc., China). A total of 311 to 6,388 cells were targeted per sample, with a minimum of 9,648 reads/cell. Libraries were sequenced using Genolab M (GeneMind, China), with paired-end sequencing and dual indexing, in the following regime: 28 cycles, 10 cycles, 10 cycles, and 90 cycles for Read 1, i7 index, i5 index, and Read 2, respectively.

Data processing, cluster annotation, and data integration

Count matrices were obtained using the cell ranger multipipeline (version 7.0.0, 10x Genomics). The raw count data were imported into R (version 4.1.2) and analyzed with the Seurat R package (version 5.0.0) [17].

Low-quality cells in each sample were identified and excluded from the analysis based on thresholds for the number of genes and UMIs, which were determined visually using VlnPlot. Cells with a high mitochondrial content ($>10\%$) were also excluded.

Following quality control, all samples were merged into an integrated Seurat object. Gene expression counts were normalized using the SCTransform Seurat function. SCTransform also identified highly variable genes, which were used to generate principal components (PCs). Data integration of different samples was performed using the Harmony package. After integration, dimensionality reduction and cell clustering were performed using the RunUMAP, FindNeighbors (top 30 PCA vectors), and FindClusters (resolution 1.0) functions. Trajectory inference was calculated using the MST method implemented in the dynverse R package (version 0.1.2). The starting point was defined automatically by the expression of two marker genes, CD14 and CD11b. The heatmap was plotted using the plot_heatmap function from the dynverse R package. The top 20 features were selected automatically [18].

Results and Discussion

Single-cell RNA sequencing identifies three distinct monocyte clusters in breast cancer patients

We conducted single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) of 15 mononuclear cell samples from nine breast cancer patients (some probes were presented only in one or two time point) undergoing the first cycle of chemotherapy. Blood samples were collected across three time points: before chemotherapy and then 3 and 21 days after chemotherapy. To study monocyte development and transcriptional changes during NAC, we isolated the monocyte cluster from mononuclear cells using Seurat functions. The UMAP visualization identified a cluster of monocytes with three subsets (Fig. 1). We analyzed 5,721 monocyte cells in total, among them 4,426 were classical monocytes (CD14^{++} , CD16^{-}), 331 — intermediate monocytes ($\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{+}$), and 964 — non-classical monocytes (CD16^{+} , CD14^{-}). Intermediate and non-classical monocyte counts in

the blood of breast cancer patients reached 22 %, exceeding the 15 % seen in healthy donors [6, 9, 19]. It is consistent with previous data on higher levels of CD16 monocytes in the blood of cancer patients [20, 21]

Monocytes develop from the classical to the non-classical phenotype through an intermediate form

To explore the trajectory of monocyte differentiation in breast cancer patients, we conducted scRNA-seq analysis of peripheral blood mononuclear cells before chemotherapy (Fig. 2). Based on the expression of canonical monocyte development markers CD11b, CD14, and CD16, trajectory analysis indicated the starting differentiation point among classical monocytes (Fig. 2A). Both classical and non-classical monocytes divided into several clusters with an intermediate subset in between (Fig. 2B). We defined seven distinct transcriptional profiles in classical monocytes and two profiles in non-classical monocytes (Fig. 2B).

Transcriptional patterns of classical and non-classical monocyte subsets differed from each other significantly. Classical monocytes were characterized by high expression of *CD14*, *CSF3R*, *S100A8*, *S100A9*, *VCAN*, *LYZ*, *SELL*, *GRN*, and some other genes (Fig. 2C). Non-classical monocytes expressed *FCGR3A* (CD16 protein), *MTSS1*, *TCF7L2*, *CSF1R*, *SPN*, *EVL*, *LYN*, while lacking some classical monocyte markers: *CD14*, *CSF3R*, *S100A8*, *S100A9*, and others. The intermediate

subset showed more similarities with the classical phenotype, despite exhibiting a decreased expression of classical markers accompanied by an expression of non-classical marker genes, such as *CSF1R*, *SPN*, and *EVL* (Fig. 2C). No specific transcription markers of the intermediate subset were detected.

We found that monocyte populations were characterized by differential expression of myeloid markers. Thus, classical monocytes uniquely expressed a set of neutrophil-associated genes: *CSF3R* (receptor for granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF-R), *S100A8*, *S100A9*, *SELL*, which highlighted their similarity to common myeloid progenitor cells. In contrast, non-classical monocytes highly expressed the macrophage lineage receptor *CSF1R* gene (macrophage colony-stimulating factor receptor). This may indicate that classical monocytes belong to the early developmental period, as monocytes diverge from neutrophils at the myeloblast stage in the bone marrow. Meanwhile, *CSF1R* expression in non-classical monocytes suggests their similarity to macrophages and their terminal position in the developmental lineage. Notably, prior studies using flow cytometry and microarray analysis have identified high expression of *CSF3R* in the classical subset and *CSF1R* in the non-classical subset of blood monocytes [6, 22]. In addition, the expression of *SELL* (*CD62L*), which characterizes the degree of monocyte maturation from progenitors to fully differentiated cells, has been observed only in the classical subset [23] (Fig. 2C).

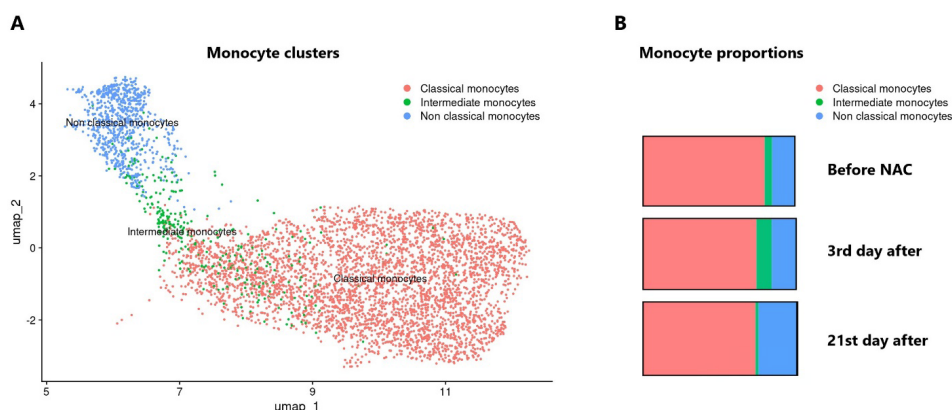


Figure 1. A. UMAP visualization of monocyte clustering. Monocyte subsets are labeled in colors of the corresponding UMAP clusters. Each dot on the UMAP represents a single cell. B. Percentages of monocytes at three time points: before NAC, the 3rd day after NAC, and the 21st day after NAC

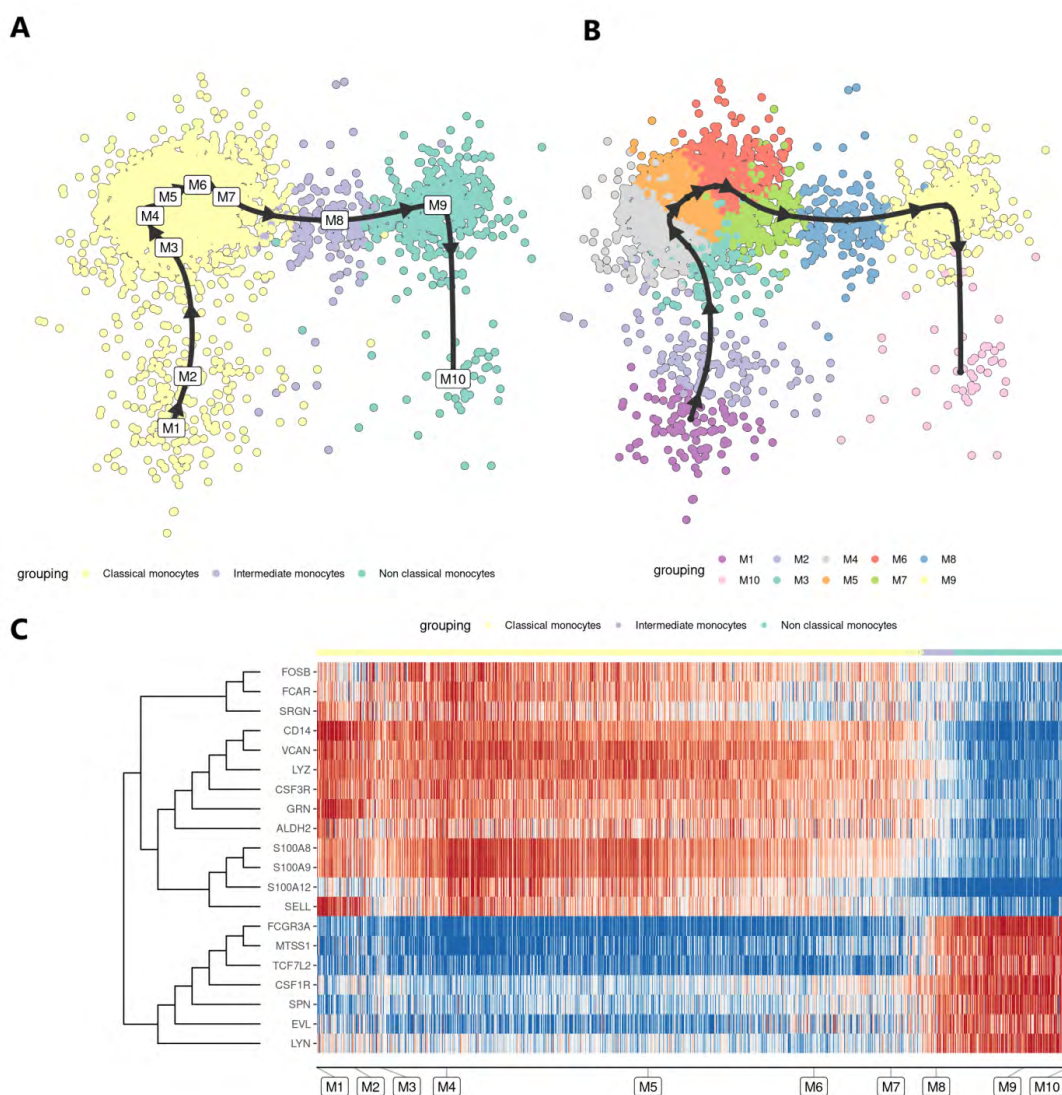


Figure 2. Monocyte assay using blood samples from TNBC patients before chemotherapy. **A.** Developmental trajectory of monocytes. **B.** Clustering of monocyte subsets; **C.** Heatmap of differentially expressed genes (DEGs, logFC > 0.25) in M1-M10 clusters of classical, intermediate and non-classical monocyte subsets

Our data shows a transcriptional shift in the monocytes' profile, confirming that the developmental trajectory of monocyte subsets proceeds from classical to non-classical. Additionally, a study of monocyte kinetics demonstrated that three monocyte subsets differentiate sequentially, beginning from the classical phenotype, and are circulate simultaneously at different stages of maturation [24].

Chemotherapy disrupts the monocyte developmental trajectory and divides it into two transcriptionally distinct branches

Administration of adriamycin and cyclophosphamide in TNBC patients led to a decrease in both the relative blood monocyte count and the percentage of classical monocytes (Fig. 1B). Although monocytes are mature cells not undergoing further differentiation, chemotherapy is known to activate monocyte migration into the tissue,

promote their differentiation to M2 macrophages, and alter cytokine secretion patterns [25–27]. Our data indicated that chemotherapy significantly affected the transcriptional profiles of monocytes alongside their developmental trajectories.

Overall, conventional developmental trajectories were disrupted. Monocytes, starting from the classical subset, separated into two expressional clusters. Each matured independently, giving rise to the corresponding non-classical forms (Fig. 3A, B). The first cluster (groups M1-M5) demonstrated a proliferative activation and was characterized by high expression of genes mediating proliferation (*NR4A3*,

MAP3KB), metabolic processes (*ATP13A3*, *SLC7A5*), regulation of transcription (*ZNF331*), and inhibition of B cells (*SAMSN1*). Meanwhile, the second cluster of monocytes (groups M6-M8) showed a response to environmental stress. The monocytes actively expressed genes associated with apoptosis (*FOS*), downregulation of cellular proliferation (*DUSP1*), tumor suppression (*KLF6*), and cellular motility (*S100A4*). The first, proliferative cluster likely represents a pool of renewed monocyte populations emerging from the bone marrow, whereas the second cluster of monocytes in a stressed state comprises chemotherapy-altered cells.

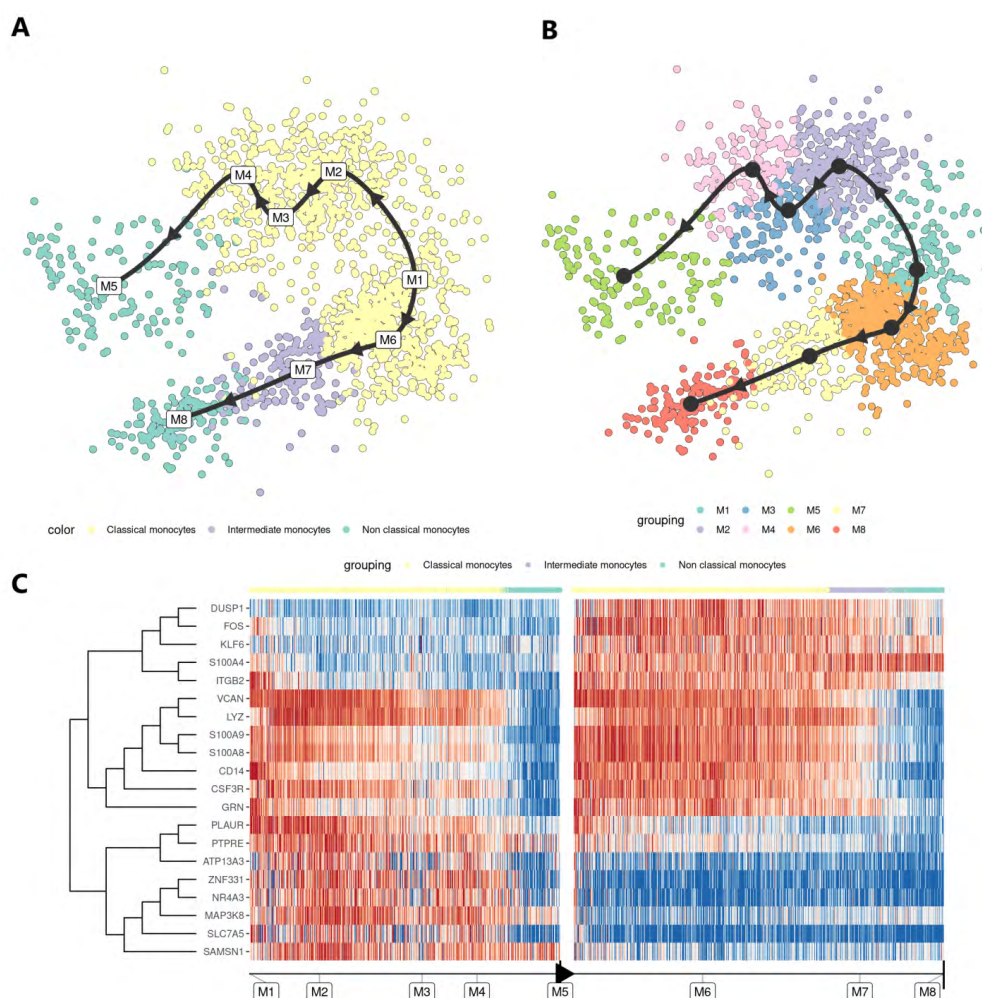


Figure 3. Monocyte assay using blood samples of TNBC patients on the 3rd day after the 1st course of chemotherapy. **A.** Developmental trajectory of monocytes. **B.** Clustering of monocyte subsets. **C.** Heatmap of differentially expressed genes (DEGs, logFC > 0.25) in M1-M8 clusters of classical, intermediate and non-classical monocyte subsets

Monocyte subset composition recovers by 21 days after chemotherapy administration

By day 21 after adriamycin and cyclophosphamide administration, the subset composition of monocytes recovered and was close to normal (the time point before NAC). The developmental trajectory unfolded directly from the classical subset through the intermediate state to the non-classical subset (Fig. 4A, B). It likely occurred due to the short lifespan of monocytes in peripheral blood and the potential for enhanced renewal of the circulating monocyte pool from bone marrow progenitors. However, we observed that intermediate monocytes did not have such a renewal potential. Their relative number significantly decreased from 5 % at baseline to 2 % after NAC (Fig. 1B).

Transcriptional profiles of classical and non-classical monocytes began to return to normal as well (Fig. 4C). Interestingly, a set of genes, including *LYZ*, *VCAN*, *CD14*, *S100A8*, *S100A9*, *CSF3R*, *S100A12*, and

GRN, was highly expressed by classical monocytes before chemotherapy and during the 1st cycle of treatment. *MTSS1*, *RHOC*, *TCF7L2*, and *CSF1R* were non-classical markers, which were expressed before treatment and recovered by the 21st day after chemotherapy. As markers of monocyte subsets, these genes demonstrated a stable expression during treatment. On the other hand, genes like *CD36*, *SELL*, *TREM1*, and *PXN* in classical monocytes and *IFITM2*, *LRRC25*, *LST1*, and *MS4A7* in non-classical monocytes had fluid expression patterns that changed throughout treatment. It is worth noting that on the 21st day after NAC, classical monocytes were enriched in *TREM*, a pro-inflammatory gene that amplifies immune responses, while non-classical monocytes overexpressed *IFITM2* and *LRRC25* associated with interferon production and inflammatory response [28–30]. We hypothesize that both classical and non-classical monocytes enhance their pro-inflammatory activity after chemotherapy.

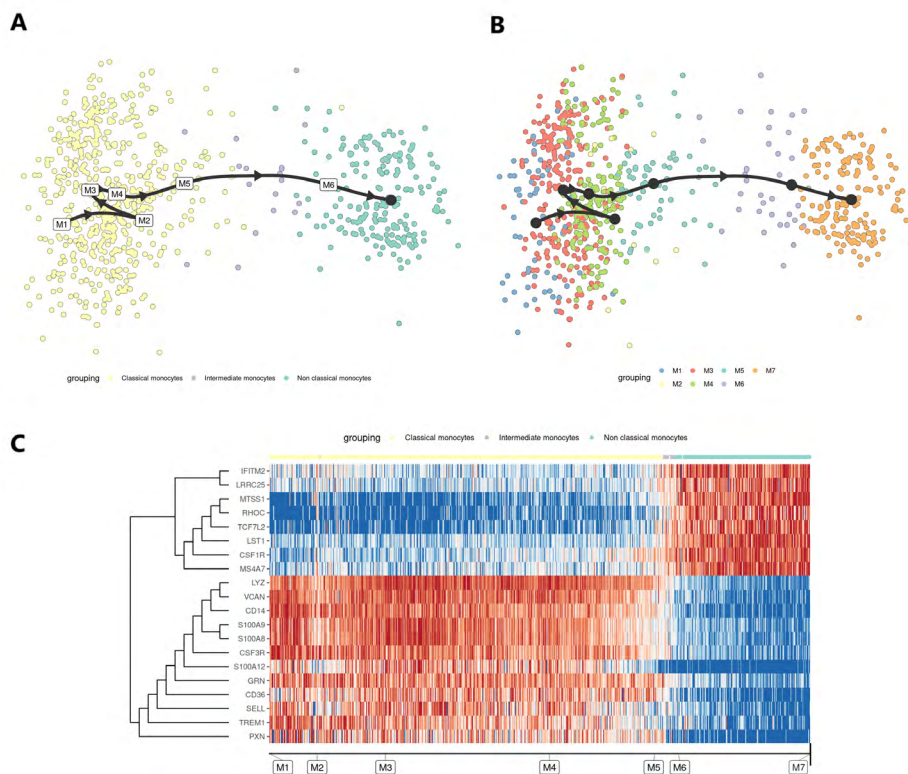


Figure 4. Monocyte assay using blood samples from TNBC patients on the 21st day after the 1st cycle of chemotherapy. **A.** Developmental trajectory of monocytes. **B.** Clustering of monocyte subsets. **C.** Heatmap of differentially expressed genes (DEGs, logFC > 0.25) in M1-M7 clusters of classical, intermediate and non-classical monocyte subsets

Conclusion











Systemic chemotherapy is a cytotoxic treatment that affects both circulating monocytes and their progenitor cells in the bone marrow. In TNBC patients, administration of the first cycle of NAC resulted in a splitting of the classical monocyte pool into two clusters, with a prevalence of proliferative signals in the first cluster and stress response activation in the second. The subset composition recovered by the 21st day post-treatment, accompanied by an activation of pro-inflammatory monocyte activity. This study revealed changes in the developmental trajectory and transcriptional profile of monocytes during the first cycle of NAC. However, it remains unclear how a complete chemotherapy course, typically including 4–8 cycles, can impact the biology of monocytes. Further studies are required to clarify the transcriptional dynamics and fate of monocyte subsets throughout the entire course of NAC treatment.

References/Библиографический список

- Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595–613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
- Grinberg MV, Lokhonina AV, Vishnyakova PA, Makarov AV, Kananykhina EY, Eremina IZ, Glinkina VV, Elchaninov AV, Fatkhudinov TK. Migration, proliferation and cell death of regenerating liver macrophages in an experimental model. *RUDN Journal of Medicine*. 2023;27(4):449–458. doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-4-449-458
- Patysheva M, Frolova A, Larionova I, Afanas'ev S, Tarasova A, Cherdyntseva N, Kzhyshkowska J. Monocyte programming by cancer therapy. *Frontiers in immunology*. 2022;13:994319. doi:10.3389/fimmu.2022.994319
- Ugel S, Canè S, De Sanctis F, Bronte V. Monocytes in the Tumor Microenvironment. *Annual review of pathology*. 2021;16:93–122. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013058
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16): e74–80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
- Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5): e16–31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
- Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparily F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *International reviews of immunology*. 2014;33(6):470–89. doi:10.3109/08830185.2014.902453
- Buscher K, Marcovecchio P, Hedrick CC, Ley K. Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2017;4:80. doi:10.3389/fcvm.2017.00080
- Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of leukocyte biology*. 2019;106(2):309–322. doi:10.1002/jlb.4ri0818-311r
- Wang R, Bao W, Pal M, Liu Y, Yazdanbakhsh K, Zhong H. Intermediate monocytes induced by IFN- γ inhibit cancer metastasis by promoting NK cell activation through FOXO1 and interleukin-27. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2022;10(1) doi:10.1136/jitc-2021-003539
- Kiss M, Caro AA, Raes G, Laoui D. Systemic Reprogramming of Monocytes in Cancer. *Frontiers in oncology*. 2020;10:1399. doi:10.3389/fonc.2020.01399
- Gamrekelashvili J, Giagnorio R, Jussofie J, Soehnlein O, Duchene J, Briseño CG, Ramasamy SK, Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, Ishifune C, Hinkel R, Radtke F, Strobl LJ, Zimmer-Strobl U, Napp LC, Bauersachs J, Haller H, Yasutomo K, Kupatt C, Murphy KM, Adams RH, Weber C, Limbourg FP. Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nature communications*. 2016;7:12597. doi:10.1038/ncomms12597
- Miyake K, Ito J, Takahashi K, Nakabayashi J, Brombacher F, Shichino S, Yoshikawa S, Miyake S, Karasuyama H. Single-cell transcriptomics identifies the differentiation trajectory from inflammatory monocytes to pro-resolving macrophages in a mouse skin allergy model. *Nature communications*. 2024;15(1):1666. doi:10.1038/s41467-024-46148-4
- Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annual review of immunology*. 2019;37:439–456. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053119
- Ohkuma R, Fujimoto Y, Ieguchi K, Onishi N, Watanabe M, Takayanagi D, Goshima T, Horiike A, Hamada K, Ariizumi H, Hirasawa Y, Ishiguro T, Suzuki R, Iriguchi N, Tsurui T, Sasaki Y, Homma M, Yamochi T, Yoshimura K, Tsuji M, Kiuchi Y, Kobayashi S, Tsunoda T, Wada S. Monocyte subsets associated with the efficacy of anti-PD-1 antibody monotherapy. *Oncology letters*. 2023;26(3):381. doi:10.3892/ol.2023.13967
- Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, Herrley E, Rasquinha N, McArdle S, Wu R, Peluso E, Metzger D, Ichinose H, Shaked I, Chodaczek G, Biswas SK, Hedrick CC. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (New York, NY)*. 2015;350(6263):985–90. doi:10.1126/science.aac9407
- Hao Y, Stuart T, Kowalski MH, Choudhary S, Hoffman P, Hartman A, Srivastava A, Molla G, Madad S, Fernandez-Granda C, Satija R. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. *Nature biotechnology*. 2024;42(2):293–304. doi:10.1038/s41587-023-01767-y
- Cannoodt R. Inferring, interpreting and visualising trajectories using a streamlined set of packages. March 29, 2019. <https://dynverse.github.io/dyno>. Accessed February 13, 2024.
- Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*. 2020;92(1): e12883. doi:10.1111/sji.12883


20. Schauer D, Starlinger P, Reiter C, Jahn N, Zajc P, Buchberger E, Bachleitner-Hofmann T, Bergmann M, Stift A, Gruenberger T, Brostjan C. Intermediate monocytes but not TIE2-expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PLoS one*. 2012;7(9): e44450. doi:10.1371/journal.pone.0044450
21. Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, Khuntikeo N, Okada S, McGrath MS, Wongkham S. Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clinical and experimental immunology*. 2010;161(3):471–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04200.x
22. Metcalf TU, Wilkinson PA, Cameron MJ, Ghneim K, Chiang C, Wertheimer AM, Hiscott JB, Nikolich-Zugich J, Haddad EK. Human Monocyte Subsets Are Transcriptionally and Functionally Altered in Aging in Response to Pattern Recognition Receptor Agonists. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2017;199(4):1405–1417. doi:10.4049/jimmunol.1700148
23. Ito Y, Nakahara F, Kagoya Y, Kurokawa M. CD62L expression level determines the cell fate of myeloid progenitors. *Stem cell reports*. 2021;16(12):2871–2886. doi:10.1016/j.stemcr.2021.10.012
24. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D, Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(7):1913–1923. doi:10.1084/jem.20170355
25. Geller MA, Bui-Nguyen TM, Rogers LM, Ramakrishnan S. Chemotherapy induces macrophage chemoattractant protein-1 production in ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2010;20(6):918–25. doi:10.1111/IGC.0b013e3181e5c442
26. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LT, Goedemans R, Jha V, Nortier JW, Welters MJ, Kroep JR, van der Burg SH. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer research*. 2013;73(8):2480–92. doi:10.1158/0008-5472.can-12-3542
27. Valdés-Ferrada J, Muñoz-Durango N, Pérez-Sepulveda A, Muñoz S, Coronado-Arrázola I, Acevedo F, Soto JA, Bueno SM, Sánchez C, Kalergis AM. Peripheral Blood Classical Monocytes and Plasma Interleukin 10 Are Associated to Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer Patients. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1413. doi:10.3389/fimmu.2020.01413
28. Friedlová N, Zavadil Kokáš F, Hupp TR, Vojtěšek B, Nekulová M. IFITM protein regulation and functions: Far beyond the fight against viruses. *Frontiers in immunology*. 2022;13:1042368. doi:10.3389/fimmu.2022.1042368
29. Sheng G, Chu H, Duan H, Wang W, Tian N, Liu D, Sun H, Sun Z. LRRc25 Inhibits IFN- γ Secretion by Microglia to Negatively Regulate Anti-Tuberculosis Immunity in Mice. *Microorganisms*. 2023;11(10). doi:10.3390/microorganisms11102500
30. Juric V, Mayes E, Binnewies M, Lee T, Canaday P, Pollack JL, Rudolph J, Du X, Liu VM, Dash S, Palmer R, Jahchan NS, Ramoth Á J, Lacayo S, Mankikar S, Nornig M, Brassell C, Pal A, Chan C, Lu E, Sriram V, Streuli M, Krummel MF, Baker KP, Liang L. TREM1 activation of myeloid cells promotes antitumor immunity. *Science translational medicine*. 2023;15(711): eadd9990. doi:10.1126/scitranslmed.add9990

Изменение траекторий развития моноцитов под действием химиотерапии у больных раком молочной железы

Т.С. Геращенко¹  , М.Р. Патышева¹ , А.А. Федоренко^{1,2} ,
А.П. Филатова¹ , М.А. Вострикова¹ , О.Д. Брагина¹ ,
А.А. Федоров¹ , П.С. Ямщиков¹ , Е.В. Денисов¹ 

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Российская Федерация

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

 t_gerashchenko@oncology.tomsk.ru

Аннотация. *Актуальность.* Моноциты — циркулирующие иммунные клетки, которые традиционно делятся на три субпопуляции. Вклад каждой субпопуляции в патогенез рака молочной железы до сих пор остается противоречивым. Кроме того, отсутствуют данные о программировании субпопуляций моноцитов в сторону противоопухолевой активности по действию химиотерапии. *Цель.* Изучить траектории развития субпопуляций моноцитов крови и их транскриптомные

изменения в ходе неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). *Материалы и методы.* Мононуклеарные клетки были получены из периферической крови девяти пациенток с трижды негативным раком молочной железы (TNBC) до начала НАХТ, на 3-й и 21-й день после первого цикла неoadъювантной химиотерапии (режим AC). Концентрация и жизнеспособность клеток (Calcein/DRAQ7) была оценена методом проточной цитометрии. Секвенирование РНК единичных клеток проводили на платформе Genolab M (GeneMind Biosciences) с использованием технологии 10x Genomics для фиксированных образцов. Данные были проанализированы с помощью Seurat, SingleR и пакета dypverse R для определения траекторий развития. *Результаты и обсуждение.* Анализ траекторий развития показал, что моноциты группируются в три субпопуляции: классические, неклассические и промежуточные. Классические моноциты характеризуются высокой экспрессией генов *CD14*, *CSF3R*, *S100A8*, *S100A9*, *VCAN*, *LYZ*, *SELL* и *GRN*, тогда как неклассические экспрессировали *FCGR3A*, *MTSS1*, *TCF7L2*, *CSF1R*, *SPN*, *EVL* и *LYN* гены. Химиотерапия существенно влияет на траектории развития моноцитов. На основании транскриптомного анализа установлено, что субпопуляция классических моноцитов подразделяется на два кластера: один характеризуется активацией сигнальных путей пролиферации, другой — активацией стрессовых сигналов, связанных с активацией апоптоза, снижением клеточной пролиферации и подвижности. К 21-му дню после неoadъювантной химиотерапии наблюдается восстановление траекторий развития моноцитов и их субпопуляционного состава. Химиотерапия способствует повышению провоспалительной активности моноцитов. *Выводы.* Моноциты периферической крови больных ТНРМЖ способны восстанавливать свой субпопуляционный состав к 21-му дню после первого цикла химиотерапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, секвенирование РНК единичных клеток (scRNA seq), моноциты, химиотерапия, траектории развития

Информация о финансировании. Данный проект был поддержан Российским Научным Фондом, грант № 22–75–10128.

Вклад авторов: Геращенко Т.С. — планирование и проведение эксперимента, подготовка рисунков, подготовка и редактирование рукописи, руководство проектом, поиск источников финансирования; Патышева М.Р. — разработка концепции исследования, планирование и проведение экспериментов, редактирование рукописи; Федоренко А.А. — проведение экспериментов, обработка данных; Филатова А.П. — биоинформатическая обработка данных, построение рисунков; Вострикова М.А. — набор материала, обработка данных; Брагина О.Д. — набор материала, обработка данных; Федоров А.А. — проведение экспериментов, обработка данных; Ямщиков П.С. — биоинформатический анализ данных; Денисов Е.В. — рецензирование и редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ 29 августа 2022 г. (протокол № 16). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией (1964 г., с изменениями от 1975 и 1983 гг.).

Благодарности. Работы проводились на оборудовании Томского регионального центра коллективного пользования (ТРЦКП) и центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ. Информированное согласие на публикацию. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Поступила 17.04.2024. Принята 15.05.2024.

Для цитирования: Gerashchenko T.S., Patysheva M.R., Fedorenko A.A., Filatova A.P., Vostrikova M.A., Bragina O.D., Fedorov A.A., Iamshchikov P.S., Denisov E.V. Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 427–438. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-427-438. EDN: GNCAUM

Corresponding author: Gerashchenko Tatiana S. — PhD, MD, Researcher, Laboratory of Cancer Progression Biology Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, 634009, Kooperativny Street 5, Tomsk, Russian Federation.

E-mail: t_gerashchenko@oncology.tomsk.ru

Gerashchenko T.S. ORCID 0000-0002-7283-0092

Patysheva M.R. ORCID 0000-0003-2865-7576

Fedorenko A.A. ORCID 0000-0003-3297-1680

Filatova A.P. ORCID 0000-0002-0693-2314

Vostrikova M.A. ORCID 0000-0002-0256-5342

Bragina O.D. ORCID 0000-0001-5281-7758

Fedorov A.A. ORCID 0000-0002-5121-2535

Iamshchikov P.S. ORCID 0000-0002-0646-6093

Denisov E.V. ORCID 0000-0003-2923-9755

Ответственный за переписку: Геращенко Татьяна Сергеевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ, Российская Федерация, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5. E-mail: t_gerashchenko@oncology.tomsk.ru

Геращенко Т.С. SPIN 7900-9700, ORCID 0000-0002-7283-0092

Патьшева М.Р. SPIN 5714-4611, ORCID 0000-0003-2865-7576

Федоренко А.А. SPIN 8092-0070, ORCID 0000-0003-3297-1680

Филатова А.П. ORCID 0000-0002-0693-2314

Вострикова М.А. ORCID 0000-0002-0256-5342

Брагина О.Д. SPIN 7961-5918, ORCID 0000-0001-5281-7758










Федоров А.А. SPIN 1315-8100, ORCID 0000-0002-5121-2535

Ямщиков П.С. SPIN 9624-3257, ORCID 0000-0002-0646-6093

Денисов Е.В. SPIN 9498-5797, ORCID 0000-0003-2923-9755

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-439-451
EDN GPDHAPОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Tumor hybrid cells in non-small cell lung cancer: population structure and contribution to prognosis

Anna A. Khozyainova , Maxim E. Menyailo ✉, Maria S. Tretyakova ,
Ustinia A. Bokova , Anastasia A. Korobeynikova , Tatiana S. Gerashchenko ,
Evgeny O. Rodionov , Sergey V. Miller , Evgeny V. Denisov 

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation
✉ max89me@yandex.ru

Abstract. *Relevance.* Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer-related mortality worldwide due to the high recurrence and metastasis rates. It is generally accepted that metastases and recurrences are formed by tumor cells with a highly invasive, stem and chemoresistant phenotype. Tumor hybrid cells (THCs) formed by the fusion of tumor cells with a wide range of normal cells: macrophages, fibroblasts, mesenchymal stem cells, etc. are considered to be potential metastasis and recurrence-initiating cells. However, the phenotypic diversity of THCs, and their association with disease progression remain poorly understood. *The aim* of the study was to characterize the population composition of THCs in NSCLC and its association with clinicopathological characteristics, metastasis and recurrence. *Materials and Methods.* A total of 50 patients with NSCLC were included. Fresh frozen samples of tumor tissue obtained during resection and morphologically verified were used to analyze types and number of THCs. THCs were analyzed by flow cytometry in primary tumors using markers for tumor cells, cancer stem cells, leukocytes, macrophages and fibroblasts. *Results and Discussion.* THCs were detected in all NSCLC patients. Most THCs demonstrated leukocyte, macrophage and stem characteristics. The number and frequency of THCs depended on neoadjuvant chemotherapy. THCs with leukocyte and stem cell markers (pan-CK⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺) were associated with locoregional recurrence, whereas THCs with macrophage and stem cell markers (EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺CD163⁺) — with distant metastases. *Conclusion.* This study is the first to comprehensively describe the population composition of THCs in NSCLC, their association with clinicopathological characteristics, neoadjuvant chemotherapy and disease prognosis. Detection of prognostically relevant THCs could be an effective approach for predicting the risk of metastasis and recurrence of NSCLC and the basis for the development of therapy focused on the prevention of cancer progression.

Keywords: tumor fusion, tumor hybrid cells, non-small cell lung cancer, flow cytometry, metastasis, recurrence

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation (grant № 22–75–00120).

© Khozyainova A.A., Menyailo M.E., Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Gerashchenko T.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Denisov E.V., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Author contributions. All authors have made significant contributions to the concept and manuscript preparation, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was approved by the Local Committee for Medical Ethics of the Cancer Research Institute, Tomsk NRMC (17 June 2016, № 8).

Acknowledgements. The authors thank Dr. Aleksandra Pershina for valuable comments in the flow cytometry processing. The work was carried out on The Core Facility “Medical Genomics” (Tomsk NRMC).

Consent for publication. All patients gave voluntary informed consent to participate in the study and personal data processing according with the World Medical Association Declaration of Helsinki (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Received 19.04.2024. Accepted 15.05.2024.

For citation: Khozyainova AA, Menyailo ME, Tretyakova MS, Bokova UA, Korobeynikova AA, Gerashchenko TS, Rodionov EO, Miller SV, Denisov EV. Tumor hybrid cells in non-small cell lung cancer: population structure and contribution to prognosis. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):439–451. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-439-451. EDN: GPDHAP

Introduction

Lung cancer claims over a million lives around the world every year and is the leading cause of cancer-related mortality [1]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85 % of all lung cancer cases [2]. The relative 5-year survival rate for NSCLC does not exceed 35 % [3]. Among patients without signs of tumor spread the value reached 65 % [3]. While among patients with lymph nodes or distant organ metastases the value was 37 % and 9 %, respectively. Thus, predicting and preventing the risk of NSCLC progression is an urgent task for modern oncology.

The main players in metastasis are considered to be abnormally motile cells of the primary tumor that have undergone epithelial-mesenchymal transition [4, 5, 6]. Deprived of intercellular contacts, such cells are able to penetrate into surrounding tissues and blood and lymphatic vessels, thereby ensuring spreading throughout the body [5]. Considering that most metastatic “seeds” die while circulating in the bloodstream, and their successful reaching the distal organ does not guarantee further development of metastases, it becomes obvious that true metastasis-initiating cells must have a certain phenotype that allows them to successfully overcome both

mechanical stress and escape from the immunological surveillance [7].

Recurrences are most likely caused by populations of tumor cells and cancer stem cells that are capable of self-renewal and regeneration and are resistant to chemotherapy and radiation therapy [8]. However, consensus on the classification criteria, origin and clinical significance of recurrence-initiating cells has not been reached.

In recent years, there has been increasing evidence that metastases and recurrences can be formed by tumor hybrid cells (THCs) [9–11]. The phenomenon of hybrid cells is widely known in normal physiological processes, for example, in wound regeneration and healing, and osteoclastogenesis. However, these cells are also found in pathological conditions, for example, in cancer [12, 13]. Tumor cells are capable of merging with both themselves and various immune cells: leukocytes (macrophages, dendritic cells, and lymphocytes), fibroblasts, mesenchymal stem, and other cells [14]. THCs acquire new properties that are not typical for parental cells, such as increased proliferation and migration, drug resistance, decreased apoptosis, and evasion of immune surveillance

[15–17]. THCs are found in a variety of malignancies and are associated with poor prognosis [18].

However, the phenotypic diversity of THCs remains poorly understood. In addition, most of the data have been obtained *in vitro* models and are valid for THCs of macrophage origin. In this regard, this study was aimed to characterize the population composition of THCs in NSCLC and its association with clinicopathological characteristics, metastasis and recurrence.

Materials and methods

The study included 50 patients with NSCLC treated at the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (Table 1). Fresh frozen samples of tumor tissue obtained during resection and morphologically verified were used to analyze types and number of THCs.

All patients gave voluntary informed consent to participate in the study and personal data processing according with the World Medical Association Declaration of Helsinki (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Preparation of cell suspension

Cell suspension was prepared from fresh frozen tumor samples. Tumor material was washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and placed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), serum-free culture medium, in which the tissue was minced with a scalpel into 1–2 mm fragments. Next, tumor fragments along with the medium were transferred into C-Tubes (Miltenyi Biotec, Germany) and mechanically homogenized using a gentleMACS Octo Dissociator device (Miltenyi Biotec, Germany). After homogenization, the resulting suspension was passed through a 70 µm cell filter (NEST Biotechnology, China).

The filtered cell suspension was centrifuged for 3 minutes at 300 rcf, the supernatant was removed, and the sediment was dissolved in PBS immediately before staining with an antibody cocktail.

Table 1
Clinicopathological characteristics of non-small cell lung cancer patients

Characteristics		N (%)
Age	62.5 ± 9.3	50 (100)
Sex	Male	39 (78)
	Female	11 (22)
Tumor size	T1	7 (14)
	T2	20 (40)
	T3	16 (32)
	T4	7 (14)
Lymphogenous metastasis	N0	23 (46)
	N1	14 (28)
	N2	13 (26)
Distant metastasis	Yes	19 (38)
	No	31 (62)
Stage	1	10 (20)
	2	12 (24)
	3	26 (52)
	4	2 (4)
Grade	G1	5 (10)
	G2	36 (72)
	G3	9 (18)
Locoregional recurrence	Yes	38 (76)
	No	12 (24)
Histologic type	Adenocarcinoma	25 (50)
	Squamous cell carcinoma	25 (50)
Neoadjuvant chemotherapy	Yes	20 (40)
	No	30 (60)
Smoking	Yes	40 (80)
	No	10 (20)

Flow cytometry

Markers of parental cells which were used to determine the number and types of THCs are presented in Table 2.

Table 2

Markers and antibodies used to identify tumor hybrid cells

Marker (manufacturer)	Dye	Antibody clone	Description
Live-or-Die (Biotium, Turkey)	405/545	–	Viability marker
CD45 (Beckman Coulter, USA)	APC-Alexa Fluor 700	J33	Leukocyte common antigen [19]
Pan-cytokeratin (pan-CK, Miltenyi Biotec, Germany)	FITC	REA831	Tumor cell marker [20]
CD326 (Elabscience, China)	Elab Fluor Violet 450	9C4	Tumor cell marker [21]442
S100A4 (BioLegend, USA)	PerCP Cy 5.5	NJ-4F3	Fibroblast marker [22]
FAP (eBioscience, USA)	Super Bright 600	F11–24	Fibroblast marker [23]
CD44 (BD, USA)	APC H7	C26	Cancer stem cell marker [24]
CD73 (Elabscience, China)	PE	AD2	Cancer stem cell marker [25]
CD68 (Elabscience, China)	Elab Fluor 647	Y1/82A	Macrophage marker [26]
CD163 (eBioscience, USA)	Super Bright 645	GHI/61	M2 macrophage marker [27]

The tumor cell suspension was stained with 85 μ l solution contained of “Live-or-Die” dye and PBS, vortexed and incubated for 10 minutes. Then, monoclonal antibodies against CD45, CD163, FAP, CD44, CD73, and EPCAM were added and incubated for 15 minutes in dark. The cell suspension was then washed twice to remove unbound antibodies using a 0.5 % PBS+BSA (Bovine Serum Albumin) solution for 10 minutes at 2000 rpm. The precipitate was incubated with fixation buffer from the Flow Cytometry Fixation/Permeabilization Kit (Biotium, USA) for 20 minutes. After washing twice 5 minutes at 2200 rpm with PBS and 2 % BSA, a permeabilization buffer from the Flow Cytometry Fixation/Permeabilization Kit (Biotium, USA) was added, which was mixed with antibodies to pan-cytokeratin, CD68 and S100A4. After 30 minutes of incubation in dark, the cell suspension was washed twice in 0.5 % PBS+BSA for 5 minutes at 2200 rpm. The supernatant was discarded, 100 μ l of PBS was added to the cell pellet, mixed and analyzed on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA). To improve the accuracy of the results, take into account nonspecific antibody binding and adjust color compensation, FMO (Fluorescence Minus One) controls and unstained controls were used. The results were

analyzed using the CytExpert program (Beckman Coulter, USA). The number of events attributed using selected markers to THCs was assessed. Data were extrapolated to 10000 cells. The gating strategy is shown in Fig. 1. Based on the forward (FSC) and side scatter (SSC) light parameters, an area with cells was selected and singlets were separated using a strategy for excluding doublets by area and height (FSC-A vs. FSC-H). Based on the fluorescence intensity of the “Live-or-Die” reagent, an area with living cells was selected, which were further gated by antibodies fluorescence intensity against markers of the target populations.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS Statistics v23 software (IBM, USA). The nonparametric Mann-Whitney test was used for two independent samples; data were presented as median (Me) and interquartile range (Q1–Q3). Association of overall, metastatic-free and recurrence-free survival with THCs was analyzed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. Association of clinicopathological characteristics and metastasis and recurrence frequency with THCs with were assessed using the Pearson’s χ^2 test Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

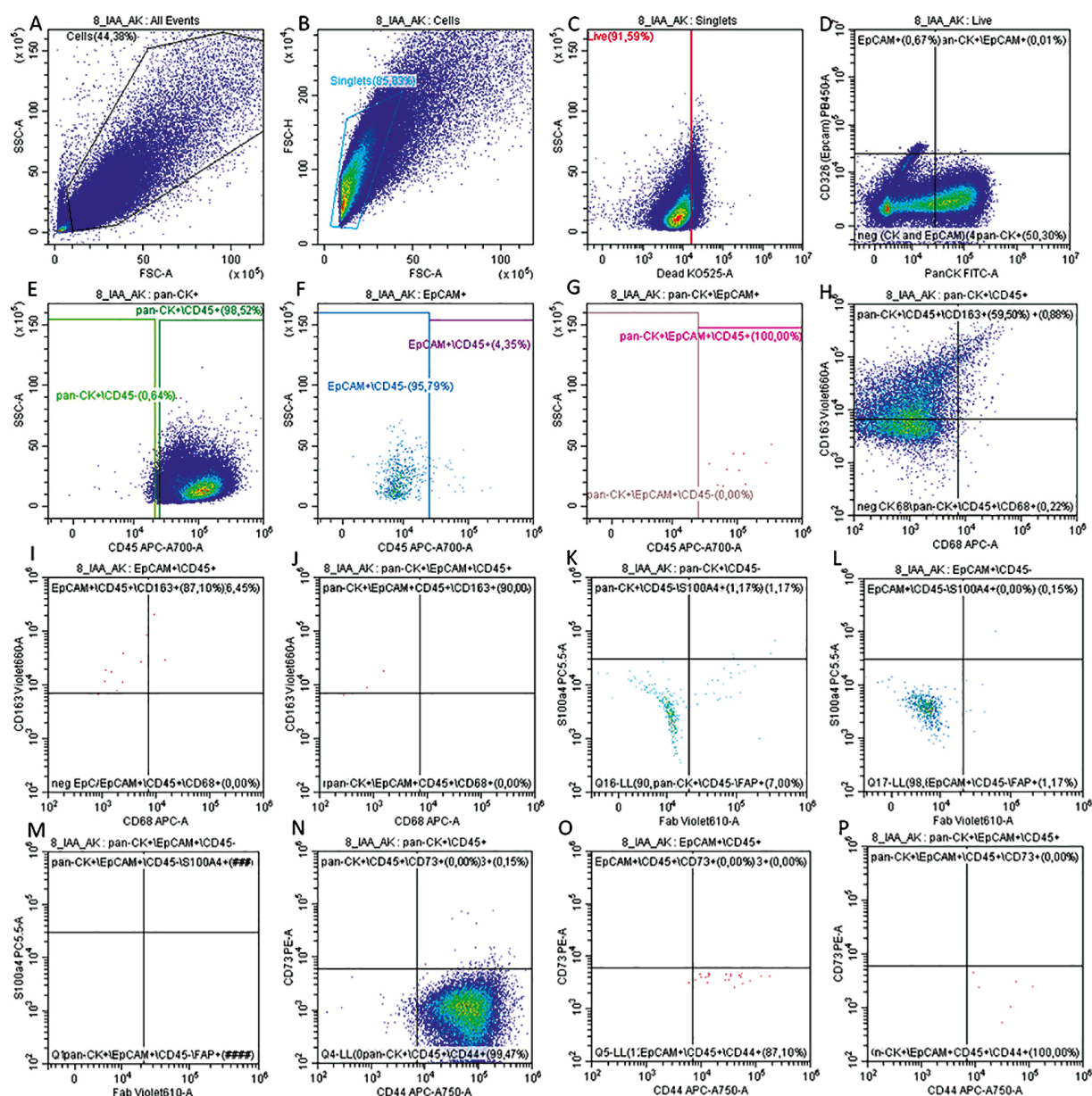


Figure 1. The flow cytometry algorithm for tumor hybrid cells identification

Note: **A** – Forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) dot plot of cells; **B** – Singlets separation on the FSC-A/FSC-H histogram; **C** – Cell viability, as visualized by “Live-or-Dye” staining: positive cells are dead, negative cells are alive; **D** – Identification of pan-CK⁺, EpCAM⁺ and pan-CK⁺EpCAM⁺ cells; **E** – Identification of pan-CK⁺CD45⁺ and pan-CK⁺CD45⁻ cells; **F** – Identification of EpCAM⁺CD45⁺ and EpCAM⁺CD45⁻ cells; **G** – Identification of pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺ and pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁻ cells; **H** – Identification of pan-CK⁺CD45⁺CD68⁺, pan-CK⁺CD45⁺CD163⁺ and pan-CK⁺CD45⁺CD68⁺CD163⁺ cells; **I** – Identification of EpCAM⁺CD45⁺CD68⁺, EpCAM⁺CD45⁺CD163⁺ and EpCAM⁺CD45⁺CD68⁺CD163⁺ cells; **J** – Identification of pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD68⁺, pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD163⁺ and pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD68⁺CD163⁺ cells; **K** – Identification of pan-CK⁺CD45⁻FAP⁺, pan-CK⁺CD45⁻S100A4⁺ and pan-CK⁺CD45⁻FAP⁺S100A4⁺ cells; **L** – Identification of EpCAM⁺CD45⁻FAP⁺, EpCAM⁺CD45⁻S100A4⁺ and EpCAM⁺CD45⁻FAP⁺S100A4⁺ cells; **M** – Identification of pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁻FAP⁺, pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁻S100A4⁺ and pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁻FAP⁺S100A4⁺ cells; **N** – Identification of pan-CK⁺CD45⁺CD44⁺, pan-CK⁺CD45⁺CD73⁺ and pan-CK⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺ cells; **O** – Identification of EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺, EpCAM⁺CD45⁺CD73⁺ and EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺ cells; **P** – Identification of pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺, pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD73⁺ and pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺ cells.

Results and Discussion

THCs were detected in all NSCLC patients. In total, six populations and 84 subpopulations of THCs were identified. At the same time, 76 subpopulations were represented by at least one cell

in one patient (Table 1, Supplement). Associations with clinicopathological characteristics, metastasis and recurrence were identified for 25 subpopulations of THCs (Table 3).

Table 3

Tumor hybrid cells populations and subpopulations associated with clinical features of NSCLC

THC populations	THC subpopulations	Abbreviations
THCs with leukocyte features	pan-CK ⁺ CD45 ⁺	TL1
	EpCAM ⁺ CD45 ⁺	TL2
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁺	TL3
THCs with macrophage features	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD163 ⁺	TM1
	EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD163 ⁺	TM2
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD68 ⁺ CD163 ⁺	TM3
	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD68 ⁺	TM4
THCs with fibroblast features	EpCAM ⁺ CD45 ⁻ S100A4 ⁺	TF1
	pan-CK ⁺ CD45 ⁻ FAP ⁺ S100A4 ⁺	TF3
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁻ S100A4 ⁺	TF4
THCs with stem and leukocyte features	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺	TLS1
	EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺	TLS2
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺	TLS3
	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD73 ⁺	TLS4
	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD73 ⁺	TLS5
	EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD73 ⁺	TLS6
THCs with stem and macrophage features	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD163 ⁺	TMS1
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD68 ⁺ CD163 ⁺	TMS2
	EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD163 ⁺	TMS3
	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD73 ⁺ CD68 ⁺	TMS4
	pan-CK ⁺ EpCAM ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD68 ⁺ CD163 ⁺	TMS5
	pan-CK ⁺ CD45 ⁺ CD44 ⁺ CD68 ⁺	TMS6
THCs with stem and fibroblast features	pan-CK ⁺ CD45 ⁻ CD44 ⁺ S100A4 ⁺	TFS1
	pan-CK ⁺ CD45 ⁻ CD44 ⁺ FAP ⁺ S100A4 ⁺	TFS2
	pan-CK ⁺ CD45 ⁻ CD73 ⁺ FAP ⁺ S100A4 ⁺	TFS3

Tumor hybrid cells types, number and frequency in NSCLC

THCs with markers of leukocytes and macrophages, as well as THCs with stem, leukocyte and macrophage features were abundant (Table 4).

Table 4
Top 10 tumor hybrid cells subpopulations in NSCLC

THC subpopulations	Number of cells, Me (Q1-Q3)
TL1	1236 (453–2810)
TLS1	843 (340–2405)
TM1	285 (106–449)
TMS1	221 (87–427)
TF1	18 (1–38)
TFS1	10 (0–27)
TL2	9 (4–27)
TLS2	7 (2–16)
TL3	3 (0–11)
TM2	3 (0–8)

Note: Me, median.

In lung adenocarcinoma (LUAD), the number of THCs carrying markers of leukocytes (TL2 and TL3 subpopulations) and macrophages (TM2), as well as THCs with stem and leukocyte features (TLS2, TLS3) were higher than in lung squamous cell carcinoma (LUSC; $p < 0.05$, Table 5). In addition, THCs carrying leukocyte (TL2, TL3) and macrophage markers (TM2) and THCs with stem and leukocyte features (TLS2) were higher in NSCLC patients without neoadjuvant chemotherapy (NACT) than in therapy-naïve cases ($p < 0.05$, Table 5). Interestingly, THCs with leukocyte (TL2) and macrophage markers (TM2, TM1) and THCs carrying stem and leukocyte markers (TLS2) were lower in smokers than in non-smoking patients ($p < 0.05$, Table 5).

Table 5
Tumor hybrid cells number in NSCLC depending on clinicopathologic parameters, neoadjuvant chemotherapy, distant metastasis, and recurrence

	TL2	TL3	TM2	TM1	TLS2	TLS3	TFS1
LUAD	16 (8–42)	5 (2–18)	5 (1–20)	27 (1–112)	12 (4–35)	5 (0–15)	0 (0–4)
LUSC	6 (2–11)	1 (0–4)	1 (0–3)	61 (6–160)	5 (2–10)	1 (0–3)	1 (0–4)
p	0.00315	0.0135	0.0018	0.592	0.0100	0.0349	0.464
NACT+	7 (2–10)	0 (0–2)	1 (0–3)	56 (6–133)	3 (1–9)	0 (0–5)	2 (0–9)
NACT–	14 (6–38)	5 (2–17)	5 (1–11)	28 (1–119)	10 (4–32)	4 (0–16)	0 (0–2)
p	0.0111	0.0006	0.0080	0.713	0.01142	0.0025	0.055
Smoking +	8 (4–13)	3 (0–9)	1 (0–5)	0 (0–6)	6 (0–35)	3 (0–9)	1 (0–32)
Smoking–	20 (14–58)	4 (0–9)	9 (3–30)	1 (1–4)	13 (2–94)	1 (0–5)	0 (0–20)
p	0.008	0.91	0.0112	0.0167	0.0087	0.43	0.051
MTS+	8 (5–21)	5 (1–17)	0 (0–0)	22 (6–114)	6 (3–18)	3 (0–92)	2 (0–31)
MTS–	9 (4–27)	2 (0–6)	0 (0–1)	51 (2–179)	8 (2–15)	1 (0–50)	15 (0–236)
p	0.667	0.065	0.285	0.703	0.681	0.050	0.0217
Rec+	11 (8–27)	0 (0–8)	0 (0–0)	2 (0–60)	9 (5–11)	0 (0–7)	0 (0–4)
Rec–	8 (4–25)	3 (0–11)	0 (0–1)	0 (0–9)	6 (2–19)	3 (0–10)	1 (0–4)
p	0.433	0.160	0.380	0.017	0.785	0.20	0.490

Note: LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma; NACT, neoadjuvant chemotherapy; MTS, distant metastasis; Rec, locoregional recurrence; +/-, yes/no; p, significance level.

THC with leukocyte (TL1) and macrophage features (TM1) and THCs carrying leukocyte and macrophage and stem cell markers (TLS1 and TMS1) were frequently detected in NSCLC patients.

THC with fibroblast features (TF1) were often observed in smokers compared to non-smoking patients (84.6 % (22) versus 50.0 % (6); $p = 0.024$).

In NACT-treated patients, the frequency of THCs with leukocyte (TL3) and macrophage (TM3) features and THCs with stem, leukocyte and macrophage markers (TLS3, TLS4, TLS5, TMS2, TMS3) was lower than in patients without NACT ($p < 0.05$, Table 6). In contrast, THCs carrying markers of fibroblasts (TF3) and THCs with stem and fibroblast (TFS2) features was frequently detected in patients with NACT than in therapy-naïve cases ($p < 0.05$, Table 6).

Table 6

Tumor hybrid cells frequency in NSCLC depending on neoadjuvant chemotherapy

THC subpopulations	NACT+	NACT-	p
TL3	28.6 (10)	66.7 (10)	0.012
TM3	21.1 (4)	51.6 (16)	0.032
TLS3	29.4 (10)	62.5 (10)	0.026
TLS4	17.6 (3)	51.5 (17)	0.021
TLS5	8.3 (1)	50.0 (19)	0.01
TMS2	21.1 (4)	51.6 (16)	0.032
TMS3	10.0 (1)	47.5 (19)	0.03
TF3	65.2 (15)	18.5 (5)	0.01
TFS2	65.0 (13)	23.3 (7)	0.003

Note: NACT, neoadjuvant chemotherapy; p, significance level.

Tumor hybrid cells associated with NSCLC distant metastasis and recurrence

Patients with distant metastases demonstrated an increase in the number of THCs with stem and leukocyte features (TLS3) ($p < 0.05$, Table 5). In addition, TLS5, TMS3 and TMS4 subpopulations were most frequent in metastatic patients than in patients without metastases ($p < 0.05$, Fig. 2 A).

In contrast, patients without distant metastases demonstrated an increase in the number of THCs carrying stem cell and fibroblast markers (TFS1) ($p < 0.05$, Table 5). Non-metastatic patients also had

a high frequency of TFS3 and TF4 THCs than cases with metastases ($p < 0.05$, Fig. 2 A).

Patients with locoregional recurrence demonstrated an increase in the number of THCs with macrophage markers (TM1; $p < 0.05$, Table 5). TM4, TLS4, and TMS6 subpopulations were also most frequent in recurrent patients than in cases without recurrence ($p < 0.05$, Fig. 2 B).

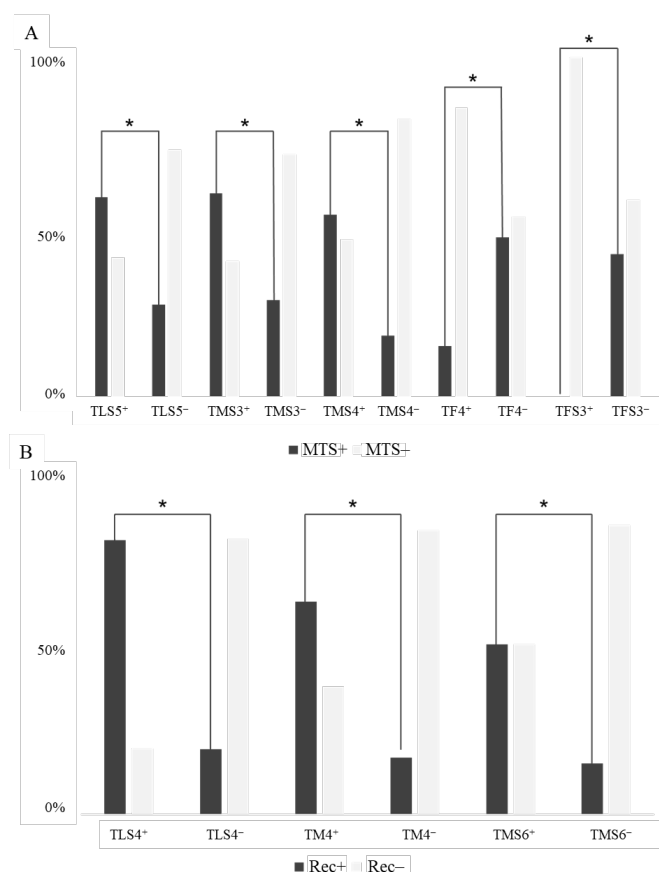


Figure 2. Frequency of distant metastasis (A) and recurrence (B) in NSCLC patients with (+) and without (-) different THC populations

Note: *, $p < 0.05$.

It is important to note that the TMS3 subpopulation was an independent predictor of distant metastases, whereas TLS4 — locoregional recurrence when taking into account clinicopathological parameters. At the same time, the prognostic significance of the TMS4 and TLS5 subpopulations remained only for male patients

(TMS4, $p = 0.041$) and highly graded tumors (TLS5, $p = 0.033$) (data not shown).

Tumor hybrid cells associated with survival of NSCLC patients

Poor overall survival (OS) rates were associated with THCs carrying stem and macrophage markers (TMS3 and TMS5) and THCs with stem and leukocyte features (TLS6) ($p < 0.05$, Fig. 3).

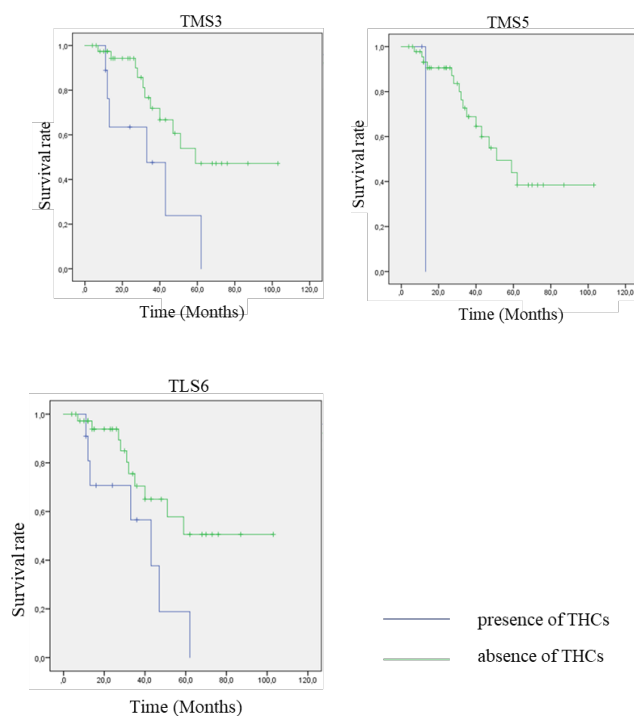


Figure 3. Overall survival of NSCLC patients depending on the presence of different tumor hybrid cells populations

Note: TMS3, EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺CD163⁺; TMS5, pan-CK⁺EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺CD68⁺CD163⁺; TLS6, EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺.

Considering clinicopathological characteristics, the prognostic significance of TMS3 was valid only for grade 2 ($p = 0.021$), TMS5—smokers ($p = 0.011$), TLS6—LUAD ($p = 0.032$) and TMS4—male smokers ($p = 0.042$).

Despite significant advances in NSCLC diagnosis of and therapy, the prevention of metastasis and recurrence still remains an unresolved problem. Even with timely diagnosis, most patients demonstrate disease progression

in the postoperative period [28–30]. In this regard, the identification of metastasis- and recurrence-initiating cells and the development of approaches for their elimination is a priority task of modern oncology. A number of studies have shown that THCs may be one of the potential players in metastasis and recurrence [17, 18, 31]. Here, we first describe population composition of THCs in NSCLC and analyze their association with clinicopathological characteristics, metastasis and recurrence.

Regardless of the histological type, the majority of THCs harbor leukocyte and macrophage features. However, the number of THCs with markers of leukocytes and macrophages and THCs with stem features is significantly higher in LUAD than in LUSC. The number and frequency of THCs depend on NACT. Hybrid cells with leukocyte and macrophage characteristics and THCs with stem, leukocyte and macrophage markers are prevalent in patients without NACT. Distant metastases and recurrence are associated with THCs. Hybrid cells carrying stem and macrophage markers (EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺CD163⁺) are associated with distant metastases regardless of clinicopathological characteristics. Locoregional recurrence is associated with THCs with stem and leukocyte features (pan-CK⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺).

Previous study showed that NSCLC patients have giant KRT8/18/19⁺ or EpCAM⁺ and CD14⁺CD45⁺ hybrid cells of macrophage origin in the bloodstream, which are associated with shorter overall and disease-free survival [32]. Another study demonstrated that merging of mesenchymal stem cells and lung cancer cells leads to the formation of THCs with stem and epithelial-mesenchymal transition features and increased motility [33]. It has been also shown that cancer cells fuse with M2 macrophages, and such cells demonstrate stem-like characteristics (CD44⁺CD24⁻) and contribute to breast cancer metastasis [34].

However, the main limitation of this study is the use of a limited set of markers, which does not allow the phenotypic diversity of THCs to be fully characterized. Accordingly, future research should be based on the use of high-throughput methods, for example, single-cell sequencing, as shown previously in other cancers [35, 36], which will allow not only to assess the diversity of THCs in detail, but also to

understand the mechanisms of their formation and interaction with other tumor, immune and stromal cells.

Conclusion











Taken together, this study provides a detailed characterization of THC population composition in NSCLC that depends on neoadjuvant chemotherapy and is associated with locoregional recurrence and distant metastases.


References/Библиографический список

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446–454. doi: [10.1038/nature25183](https://doi.org/10.1038/nature25183)
- Howlander N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, Mariotto AB, Lowy DR, Feuer EJ. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med*. 2020;383(7):640–649. doi: [10.1056/NEJMoa1916623](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916623)
- Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018;13(1):395–412. doi: [10.1146/annurev-pathol-020117-043854](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854)
- Huang Z, Zhang Z, Zhou C, Liu L, Huang C. Epithelial–mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. *MedComm*. 2022;3(2): e144. doi: <https://doi.org/10.1002/mco2.144>
- Kondratyuk RB, Grekov IS, Seleznev EA. Microenvironment influence on the development of epithelialmesenchymal transformation in lung cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2022;26(3):325–337. (in Russian). [Кондратьев Р.Б., Греков И.С., Селезнев Е.А. Влияние микроокружения на развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации в раке легкого // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2022. Т. 26. № 3. С. 325–337]. doi: [10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337](https://doi.org/10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337)
- Menyailo ME, Tretyakova MS, Denisov EV. Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Identifying Metastatic Seeds. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1696. doi: [10.3390/ijms21051696](https://doi.org/10.3390/ijms21051696)
- Aramini B, Masciale V, Grisendi G, Bertolini F, Maur M, Guaitoli G, Chrystel I, Morandi U, Stella F, Dominici M, Haider KH. Dissecting Tumor Growth: The Role of Cancer Stem Cells in Drug Resistance and Recurrence. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4):976. doi: [10.3390/cancers14040976](https://doi.org/10.3390/cancers14040976)
- Ye X, Huang X, Fu X, Zhang X, Lin R, Zhang W, Zhang J, Lu Y. Myeloid-like tumor hybrid cells in bone marrow promote progression of prostate cancer bone metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*. 2023;16(1):46. doi: [10.1186/s13045-023-01442-4](https://doi.org/10.1186/s13045-023-01442-4)
- Montalbán-Hernández K, Cantero-Cid R, Casalvilla-Dueñas JC, Avendaño-Ortiz J, Marín E, Lozano-Rodríguez R, Terrón-Arcos V, Vicario-Bravo M, Marciano C, Saavedra-Ambrosy J, Prado- J, Valentín J, Pérez de Diego R, Córdoba L, Pulido E, del Fresno C, Dueñas M, López-Collazo E. Colorectal Cancer Stem Cells Fuse with Monocytes to Form Tumor Hybrid Cells with the Ability to Migrate and Evade the Immune System. *Cancers*. 2022;14(14):3445. doi: [10.3390/cancers14143445](https://doi.org/10.3390/cancers14143445)
- Scemama A, Lunetto S, Tailor A, Di Cio S, Ambler L, Coetzee A, Cottom H, Khurram SA, Gautrot J, Biddle A. Hybrid cancer stem cells utilise vascular tracks for collective streaming invasion in a metastasis-on-a-chip device. *bioRxiv*. 2024;2024.01.02.573897. doi: [10.1101/2024.01.02.573897](https://doi.org/10.1101/2024.01.02.573897)
- Dörnen J, Sieler M, Weiler J, Keil S, Dittmar T. Cell Fusion-Mediated Tissue Regeneration as an Inducer of Polyploidy and Aneuploidy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1811. doi: [10.3390/ijms21051811](https://doi.org/10.3390/ijms21051811)
- Sutton TL, Walker BS, Wong MH. Circulating Hybrid Cells Join the Fray of Circulating Cellular Biomarkers. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2019;8(4):595–607. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.002>
- Tretyakova MS, Subbalakshmi AR, Menyailo ME, Jolly MK, Denisov EV. Tumor Hybrid Cells: Nature and Biological Significance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:814714. doi: [10.3389/fcell.2022.814714](https://doi.org/10.3389/fcell.2022.814714)
- Zhang LN, Huang YH, Zhao L. Fusion of macrophages promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion through activating epithelial-mesenchymal transition and Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2019;676:108137. doi: [10.1016/j.abb.2019.108137](https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108137)
- Lartigue L, Merle C, Lagarde P, Delespaul L, Lesluyes T, Le Guellec S, Pérot G, Leroy L, Coindre JM, Chibon F. Genome remodeling upon mesenchymal tumor cell fusion contributes to tumor progression and metastatic spread. *Oncogene*. 2020; 39(21):4198–4211. doi: [10.1038/s41388-020-1276-6](https://doi.org/10.1038/s41388-020-1276-6)
- Gast CE, Silk AD, Zarour L, Riegler L, Burkhart JG, Gustafson KT, Parappilly MS, Roh-Johnson M, Goodman JR, Olson B, Schmidt M, Swain JR, Davies PS, Shastri V, Iizuka S, Flynn P, Watson S, Korkola J, Courtneidge SA, Fischer JM, Jaboin J, Billingsley KG, Lopez CD, Burchard J, Gray J, Coussens LM, BC, Wong MH. Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Sci Adv*. 2018;4(9): eaat7828. doi: [10.1126/sciadv.aat7828](https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7828)
- Aguirre LA, Montalbán-Hernández K, Avendaño-Ortiz J, Marín E, Lozano R, Toledano V, Sánchez-Maroto L, Terrón V, Valentín J, Pulido E, Casalvilla JC, Rubio C, Diekhorst L, Laso-García F, Del Fresno C, Collazo-Lorduy A, Jiménez-Munarriz B, Gómez-Campelo P, Llanos-González E, Fernández-Velasco M, Rodríguez-Antolín C, Pérez de Diego R, Cantero-Cid R, Hernández-Jimenez E, Álvarez E. Rosas R, Dies López-Ayllón B, de Castro J, Wculek SK, Cubillos-Zapata C, Ibáñez de Cáceres I, Díaz-Agero P, Gutiérrez Fernández M, Paz de Miguel M, Sancho D, Schulte L, Perona R, Belda-Iniesta C, Boscá L, López-Collazo E. Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1773204. doi: [10.1080/2162402x.2020.1773204](https://doi.org/10.1080/2162402x.2020.1773204)
- Ye N, Cai J, Dong Y, Chen H, Bo Z, Zhao X, Xia M, Han M. A multi-omic approach reveals utility of CD45 expression in prognosis and novel target discovery. *Frontiers in Genetics*. 2022;13: 928328. doi: [10.3389/fgene.2022.928328](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.928328)
- Chen Y, Cui T, Yang L, Mireskandari M, Knoesel T, Zhang Q, Pacyna-Gengelbach M, Petersen I. The diagnostic value of cytokeratin 5/6, 14, 17, and 18 expression in human non-small cell lung cancer. *Oncology*. 2011;80(5–6):333–40. doi: [10.1159/000329098](https://doi.org/10.1159/000329098)
- Kim Y, Kim HS, Cui ZY, Lee HS, Ahn JS, Park CK, Park K, Ahn MJ. Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res*. 2009;29(5):1817–22.

22. Han C, Liu T, Yin R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts. *Biomarker Research*. 2020;8(1):64. doi: 10.1186/s40364-020-00245-w
23. Kahounová Z, Kurfürstová D, Bouchal J, Kharashvili G, Navrátil J, Remšík J, Šimečková Š, Študent V, Kozubík A, Souček K. The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry A*. 2018;93(9):941–951. doi: 10.1002/cyto.a.23101
24. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, Blandszun AR, Yevsa T, Fricke S, Kossatz-Boehlert U. Cancer Stem Cells — Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280
25. Ma XL, Hu B, Tang WG, Xie SH, Ren N, Guo L, Lu RQ. CD73 sustained cancer-stem-cell traits by promoting SOX9 expression and stability in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1):1–16. doi: 10.1186/s13045-020-0845-z
26. Rakaee M, Busund LR, Jamaly S, Paulsen EE, Richardsen E, Andersen S, Al-Saad S, Bremnes RM, Donnem T, Kilvaer TK. Prognostic Value of Macrophage Phenotypes in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer Assessed by Multiplex Immunohistochemistry. *Neoplasia*. 2019;21(3):282–293. doi: 10.1016/j.neo.2019.01.005
27. Shabo I, Midtbö K, Andersson H, Åkerlund E, Olsson H, Wegman P, Gunnarsson C, Lindström A. Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction. *BMC Cancer*. 2015;15(1):922. doi: 10.1186/s12885-015-1935-0
28. Pfannschmidt J. Editorial on “Long-term survival outcome after postoperative recurrence of non-small cell lung cancer: who is ‘cured’ from postoperative recurrence?”. *J Thorac Dis*. 2018;10(2):610–613. doi: 10.21037/jtd.2018.01.02
29. Sekihara K, Hishida T, Yoshida J, Oki T, Omori T, Katsumata S, Ueda T, Miyoshi T, Goto M, Nakasone S, Ichikawa T, Matsuzawa R, Aokage K, Goto K, Tsuboi M. Long-term survival outcome after postoperative recurrence of non-small-cell lung cancer: who is ‘cured’ from postoperative recurrence? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2017;52(3):522–528. doi: 10.1093/ejcts/ezx127
30. Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;145(1):75–81. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.09.030
31. Chitwood CA, Dietzsch C, Jacobs G, McArdle T, Freeman BT, Banga A, Noubissi FK, Ogle BM. Breast tumor cell hybrids form spontaneously in vivo and contribute to breast tumor metastases. *APL Bioeng*. 2018;2(3):031907. doi: 10.1063/1.5024744
32. Manjunath Y, Mitchem JB, Suvilesh KN, Avella DM, Kimchi ET, Staveley-O’Carroll KF, Deroche CB, Pantel K, Li G, Kaifi JT. Circulating Giant Tumor-Macrophage Fusion Cells Are Independent Prognosticators in Patients With NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020;15(9):1460–1471. doi: https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.04.034
33. Xu MH, Gao X, Luo D, Zhou XD, Xiong W, Liu GX. EMT and acquisition of stem cell-like properties are involved in spontaneous formation of tumorigenic hybrids between lung cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e87893. doi: 10.1371/journal.pone.0087893
34. Ding J, Jin W, Chen C, Shao Z, Wu J. Tumor associated macrophage^x cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. *PLoS one*. 2012;7(7): e41942. 10.1371/journal.pone.0041942
35. Menyailo ME, Zainullina VR, Khozyainova AA, Tashireva LA, Zolotareva SY, Gerashchenko TS, Alivanov VV, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Tarabanovskaya NA, Popova NO, Choinzonov EL, Cherdyntseva NV, Perelmuter VM, Denisov EV. Heterogeneity of Circulating Epithelial Cells in Breast Cancer at Single-Cell Resolution: Identifying Tumor and Hybrid Cells. *Advanced Biology*. 2023;7(2):2200206. doi: 10.1002/adbi.202200206
36. Anderson AN, Conley P, Klocke CD, Sengupta SK, Robinson TL, Fan Y, Jones JA, Gibbs SL, Skalet AH, Wu G, Wong MH. Analysis of uveal melanoma scRNA sequencing data identifies neoplastic-immune hybrid cells that exhibit metastatic potential. *bioRxiv*. 2023;10. doi: 10.1101/2023.10.24.563815

Опухолевые гибридные клетки при немелкоклеточном раке лёгкого: популяционный состав и клиническая значимость

А.А. Хозяинова , М.Е. Меняйло  , М.С. Третьякова , У.А. Бокова ,
 А.А. Коробейникова , Т.С. Геращенко , Е.О. Родионов ,
 С.В. Миллер , Е.В. Денисов 

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр,
 г. Томск, Российская Федерация
 max89me@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований. Основными причинами смертности от НМРЛ являются рецидивы и отдаленные

метастазы. Принято считать, что метастазы и рецидивы формируются опухолевыми клетками, обладающими высоким инвазивным и химиорезистентным фенотипом. По последним данным, такими клетками могут быть опухолевые гибридные клетки, формирующиеся в результате слияния опухолевых клеток с широким спектром нормальных клеток: макрофагами, фибробластами, мезенхимальными, стволовыми клетками и т.д. Однако состав, фенотипическое разнообразие ОГК и их связь с клинико-патологическими параметрами и прогрессированием НМРЛ остаются плохо изученными. Цель настоящего исследования — охарактеризовать популяционный состав опухолевых гибридных клеток при НМРЛ и его связь с клинико-патологическими параметрами, метастазированием и рецидивированием. Материалы и методы. В исследование было включено 50 пациентов с НМРЛ. Использовались морфологически верифицированные свежемороженые образцы опухолевой ткани, полученные при резекции легкого по поводу НМРЛ. Опухолевые гибридные клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием маркеров опухолевых клеток, опухолевых стволовых клеток, лейкоцитов, макрофагов и фибробластов. Результаты и обсуждение. Опухолевые гибридные клетки были обнаружены у всех пациентов НМРЛ. Большинство опухолевых гибридных клеток были с лейкоцитарными, макрофагальными и стволовыми признаками. Количество и частота опухолевых гибридных клеток зависели от неоадьювантной химиотерапии. Опухолевые гибридные клетки с маркерами стволовости и лейкоцитов (pan-CK⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺) были связаны с локорегионарными рецидивами, тогда как ОГК с маркерами стволовости и макрофагов (EpCAM⁺CD45⁺CD44⁺CD73⁺CD163⁺) — с гематогенными метастазами. Выводы. Впервые комплексно описан популяционный состав опухолевых гибридных клеток при НМРЛ и его ассоциация с клинико-патологическими характеристиками, неоадьювантной химиотерапией и прогнозом. Выявление прогностически значимых опухолевых гибридных клеток может быть потенциальным подходом для предсказания риска метастазирования и рецидивирования НМРЛ и основанием для подбора терапии, направленной на снижение вероятности прогрессирования данного заболевания.

Ключевые слова: опухолевые гибридные клетки, немелкоклеточный рак легкого, проточная цитофлуориметрия, метастазирование, рецидивирование

Информация о финансировании. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22–75–00120).

Вклад авторов: Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и рукописи, прочитали и утвердили окончательную версию перед публикацией.

Этическое утверждение — Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (17 июня 2016 г., протокол № 8).

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Благодарности — Авторы благодарят к.б.н. А.Г. Першину за ценные комментарии при обработке данных методом проточной цитофлуориметрии. Работа выполнялась на базе ЦКП «Медицинская геномика» (Томский НИМЦ).

Информированное согласие на публикацию — у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных.

Поступила 19.04.2024. Принята 15.05.2024.

Для цитирования: Khozyainova A.A., Menyailo M.E., Tretyakova M.S., Bokova U.A., Korobeynikova A.A., Gerashchenko T.S., Rodionov E.O., Miller S.V., Denisov E.V. Chemotherapy-induced developmental trajectories of monocytes in breast cancer // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 439–451. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-439-451. EDN: GPDHAP

Corresponding author: Maxim Evgenievich Menyailo — PhD, MD, Researcher of the Laboratory of Cancer Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 634009, Kooperativny Street, 5, Tomsk, Russian Federation. E-mail: max89me@yandex.ru

Khozyainova A.A. ORCID 0000-0002-5475-5981

Menyailo M.E. ORCID 0000-0003-4630-4934

Tretyakova M.S. ORCID 0000-0002-5040-931X

Bokova U.A. ORCID 0000-0003-2179-5685

Korobeynikova A.A. ORCID 0000-0002-2633-9884

Gerashchenko T.S. ORCID 0000-0002-7283-0092

Rodionov E.O. ORCID 0000-0003-4980-8986

Miller S.V. ORCID 0000-0002-5365-9840

Denisov E.V. ORCID 0000-0003-2923-9755

Ответственный за переписку: Максим Евгеньевич Меняйло — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии Томского НИМЦ, Российская Федерация, 634009, Томск, пер. Кооперативный, д. 5. E-mail: max89me@yandex.ru

Хозяинова А.А. SPIN 4201-0611, ORCID 0000-0002-5475-5981

Меняйло М.Е. SPIN 6929-4298, ORCID 0000-0003-4630-4934

Третьякова М.С. SPIN 5207-8330, ORCID 0000-0002-5040-931X

Бокова У.А. SPIN 3546-0527, ORCID 0000-0003-2179-5685

Коробейникова А.А. SPIN 5523-8156, ORCID 0000-0002-2633-9884

Герашченко Т.С. SPIN 7900-9700, ORCID 0000-0002-7283-0092

Родионов Е.О. SPIN 7650-2129, ORCID 0000-0003-4980-8986

Миллер С.В. SPIN 6510-9849, ORCID 0000-0002-5365-9840









Денисов Е.В. SPIN 9498-5797, ORCID 0000-0003-2923-9755

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465

EDN GTLLVX

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Молекулярно-биологические и иммуногистохимические особенности недифференцированных плеоморфных сарком


А.М. Косырева^{1,2} , Э.Д. Джуманиязова¹  ,
Д.Ш. Джалилова^{1,2} , А.В. Сентябрева^{1,2} ,
Е.А. Мирошниченко^{1,2} , Т.И. Фетисов³ , А.В. Лохонина^{1,4} 

¹Научно-исследовательский Институт молекулярной и клеточной медицины Российского университета дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, г. Москва, Российская Федерация

⁴Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, г. Москва, Российская Федерация

 enar2017@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Недифференцированная плеоморфная саркома (НПС) является одним из наиболее распространенных подтипов сарком мягких тканей. Полиморфизм опухолевых клеток и высокая степень злокачественности обуславливают агрессивный потенциал НПС. В связи с редкостью встречаемости и высокой гетерогенностью НПС количество исследований, описывающих клеточный состав и молекулярно-биологические характеристики, весьма ограничено. *Цель работы* — оценка клеточного состава и экспрессии генов НПС. *Материалы и методы.* В исследовании проанализировали биоматериал от 10 пациентов с НПС. В исследовании использовали первичные антитела к CD163 (маркер M2 макрофагов) и Fibroblast activation protein (FAP — маркер фибробластов) и вторичные Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP. HRP-метки вторичных антител проявляли с помощью ДАВ. Для оценки микроокружения использовали антитела для автоматизированного ИГХ стейнера BOND-III: CD68-маркер макрофагов, CD19-маркер В-лимфоцитов, CD56-маркер нейроэндокринных опухолей, белок мета-

© Косырева А.М., Джуманиязова Э.Д., Джалилова Д.Ш., Сентябрева А.В., Мирошниченко Е.А., Фетисов Т.И., Лохонина А.В., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

стазирования, Ki67 антигену-маркер пролиферации, Bcl-2-онкопротеину. Окрашивание на автоматизированном ИГХ стейнере BOND-III проводили по стандартным протоколам. В гомогенизированных образцах опухолевой ткани и перитуморальной области с количеством клеток 10^6 /мл с целью оценки микроокружения опухоли и окружающей ткани проводили цитофлуориметрическое исследование относительного количества CD14+ и CD16+ моноцитов, CD68+ макрофагов, CD86+ M1 макрофагов, CD163+ и CD206+ M2 макрофагов, CD4+ Т-лимфоцитов хелперов и CD45+ лейкоцитов на приборе MACSQuant Analyzer. Методом ПЦР в образцах опухолевой ткани и перитуморальной области определяли уровни экспрессии мРНК *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2*, и *EGFR*. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo, а для обратной транскрипции — MMLV RT Kit. Реакцию амплификации с детектированием в режиме реального времени проводили на Real-Time амплификаторе DTrime. *Результаты и обсуждение.* Для НПС характерна экспрессия CD56, FAP, CD68. Среди клеток микроокружения в НПС преобладают макрофаги и CD16-моноциты. В опухолевых клетках НПС увеличен уровень экспрессии *EGFR* по сравнению с перитуморальной областью. Уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в опухолях имеют индивидуальные различия и не являются специфическими для НПС. *Выводы.* В ходе исследования были проанализированы клеточный состав и экспрессия генов в образцах НПС. Для оценки клинической значимости каждого из маркеров необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, недифференцированные плеоморфные саркомы, микроокружение опухоли, клеточный состав, экспрессия генов

Информация о финансировании. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-65-00003). Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1356 от 7.10.2021 (идентификатор РФ 0951.61321X0012, № 15.СИН.21.0011).

Вклад авторов. А.М. Косырева — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание первого варианта рукописи; Э.Д. Джуманиязова — анализ полученных данных, написание окончательного варианта текста рукописи; А.В. Лохонина — концепция и дизайн исследования, проверка интеллектуального содержимого рукописи; Д.Ш. Джалилова, А.В. Сентябрева, Е.А. Мирошниченко — проведение эксперимента; Т.И. Фетисов — сбор клинического биоматериала. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось в соответствии с решением Этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва.









Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) и обработку персональных данных.

Поступила 06.08.2024. Принята 03.09.2024.

Для цитирования: Косырева А.М., Джуманиязова Э.Д., Джалилова Д.Ш., Сентябрева А.В., Мирошниченко Е.А., Фетисов Т.И., Лохонина А.В. Молекулярно-биологические и иммуногистохимические особенности недифференцированных плеоморфных сарком // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 452–465. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465. EDN: GTLLVX


Molecular-biologic and immunohistochemical features of undifferentiated pleomorphic sarcomas

Anna M. Kosyreva^{1,2} , Enar D. Jumaniyazova¹  ,
Dzhuliia Sh. Dzhaliilova^{1,2} , Alexandra V. Sentyabreva^{1,2} ,
Ekaterina A. Miroshnichenko^{1,2} , Timur I. Fetisov³ , Anastasia V. Lokhonina^{1,4} 

¹ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University, Moscow, Russian Federation

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

⁴ National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, Russian Federation
 enar2017@yandex.ru

Abstract. Relevance. Undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) is one of the most common subtypes of soft tissue sarcomas. The polymorphism of tumor cells and high degree of malignancy account for the aggressive potential of UPS. Due to the rarity of occurrence and high heterogeneity of UPS, the number of studies describing the cellular composition and molecular-biological characteristics is very limited. Objective is to assess the cellular composition and gene expression of UPS. **Materials and Methods.** Biomaterial from 10 patients with UPS was analyzed in the study. In this study we used primary antibodies to CD163 (marker of M2 macrophages) and Fibroblast activation protein (FAP — marker of fibroblasts) and secondary Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP were used. HRP-tagged secondary antibodies were manifested using DAB. Antibodies for automated BOND-III IHC stainer were used to evaluate the microenvironment: CD68—marker of macrophages, CD19—marker of B-lymphocytes, CD56—marker of neuroendocrine tumors, metastasis protein, Ki67 antigen-proliferation marker, Bcl-2—oncogene. Staining on an automated BOND-III IHC stainer was performed according to standard protocols. In homogenized samples of tumor tissue and peritumoral area with the number of cells 10⁶/ml in order to assess the microenvironment of the tumor and surrounding tissue, cytofluorimetric study of the relative number of CD14+ and CD16+ monocytes, CD68+ macrophages, CD86+ M1 macrophages, CD163+ and CD206+ M2 macrophages, CD4+ helper T-lymphocytes and CD45+ leukocytes was performed on the MACS Quant Analyzer device. The mRNA expression levels of *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2*, and *EGFR* were determined in tumor tissue and peritumoral samples by PCR. The RNA Solo RNA kit was used for RNA isolation, and the MMLV RT Kit was used for reverse transcription. The amplification reaction with real-time detection was performed on a DTprime Real-Time Amplifier. **Results and Discussion.** The expression of CD56, FAP, CD68 is characteristic for UPS. Among the cells of the microenvironment, macrophages and CD16-monocytes predominate in UPS. *EGFR* expression level is increased in tumor cells of the UPS compared to the peritumoral region. The expression levels of *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF*, and *MMP2* in tumors have individual differences and are not specific to the UPS. **Conclusion.** In our study, we analyzed the cellular composition and gene expression in UPS samples. Further follow-up of patients is necessary to evaluate the clinical significance of each marker.

Keywords: soft tissue sarcomas, undifferentiated pleomorphic sarcomas, tumor microenvironment, cellular composition, gene expression

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-65-00003). This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1356 dated 7.10.2021 (RF identifier 0951.61321X0012, No. 15.SIN.21.0011))

Author contributions. A.M. Kosyreva — conception and design of the study, analyzing the data obtained, writing the first draft of the manuscript; E.D. Jumaniyazova — analyzing the obtained data, writing the final manuscript text; A.V. Lokhonina — conception and design of the study, verification of the intellectual content of the manuscript; D. Sh. Dzhaliilova, A.V. Sentyabreva, E.A. Miroshnichenko-

conducting an experiment; T.I. Fetisov- clinical biomaterial collection. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. Authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted in accordance with the decision of the Ethical committee of the N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication. All patients provided voluntary informed consent to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), the processing of personal data and consent to publication.

Received 06.08.2024. Accepted 03.09.2024.

For citation: Kosyreva AM, Jumaniyazova ED, Dzhililova DSh, Sentyabreva AV, Miroshnichenko EA, Fetisov TI, Lokhonina AV. Molecular-biologic and immunohistochemical features of undifferentiated pleomorphic sarcomas. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):452–465. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-452-465. EDN: GTLLVX

Введение

Саркомы мягких тканей (СМТ) представляют гетерогенную группу злокачественных новообразований (ЗНО), первично возникающих в мягких тканях и имеющих мезенхимальное происхождение. Среди всех диагностированных случаев ЗНО на СМТ приходится не более 1 % [1] [Siegel и др., 2023].

Классификация ВОЗ 2020 года признает более 70 гистологических и молекулярных подтипов СМТ, для каждого из которых характерны особенности клинического течения и прогноза. Недифференцированная плеоморфная саркома (НПС), которую когда-то называли злокачественной фиброзной гистиоцитомой, является одним из наиболее распространенных подтипов СМТ [2, 3]. Полиморфизм опухолевых клеток и высокая степень злокачественности обуславливают агрессивный потенциал НПС [4]. Как правило, пациентам с НПС на первом этапе лечения предлагается хирургическая резекция, при необходимости с последующей химио- и лучевой терапией. Для пациентов, у которых хирургическое вмешательство невозможно, рекомендуется назначение лучевой терапии или химиотерапии. Однако эффективность противоопухолевого лечения остается неудовлетворительной, а 5-летняя выживаемость составляет 30—50 % [5].

В связи с редкостью встречаемости и высокой гетерогенностью НПС количество исследований, описывающих клеточный состав и молекулярно-биологические характеристики данного подтипа СМТ, весьма ограничено.

Цель исследования: оценка клеточного состава и экспрессии генов НПС.

Материалы и методы

Пациенты

Биопсийный материал опухолевой и перитуморальной ткани (расположенной на расстоянии 1 см от границы опухоли) пациентов получали из ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследовании проанализировали биоматериал от 10 пациентов, полученный в ходе хирургического этапа лечения, информация о пациентах представлена в Таблице 1. У всех пациентов была диагностирована и гистологически верифицирована недифференцированная плеоморфная саркома мягких тканей. Данное исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, всеми пациентами было подписано письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 1/ Table 1

**Общая характеристика пациентов/
General characteristics of patients**

Параметры / Parameters	Пациенты, n (%) / Patients, n (%)
Общее количество / Total number	10 (100 %)
Пол / Gender	
Мужчины / Men Женщины / Women	7 (70 %) 3 (30 %)
Возраст (годы) / Age (years)	
Медиана / Median Диапазон / Range	64 59–82
T стадия / T stage	
1	1 (10 %)
2	8 (80 %)
3	0 (0 %)
4	1 (10 %)
N стадия / N stage	
0	10 (100 %)
1	0 (0 %)
M стадия / M stage	
0	8 (80 %)
1	2 (20 %)
Локализация / Localization	
Верхняя конечность / Upper extremity Нижняя конечность / Lower extremity	5 (50 %) 5 (50 %)
Эпизод заболевания / Disease episode	
Впервые выявленная опухоль / Tumor detected for the first time Рецидив / Recurrence	4 (40 %) 6 (60 %)

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Фрагменты опухоли фиксировали в 10 % забуференном формалине, проводили по спиртам возрастающей концентрации, заливали в гистомикс, изготавливали гистологические срезы, монтировали их на стекла для иммуногистохимического исследования Super-Frost. Гистологические срезы депарафинизировали по стандартному протоколу и демаскировали в цитратном буфере pH 6,0 с 0,5 % Твин-20 при 100 °С. После промывки в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,2) блоки-

ровали эндогенную пероксидазу 3 % раствором H₂O₂, затем блокировали белковым буфером (PBS с 0,1 % бычьим сывороточным альбумином) при комнатной температуре в течение 30 минут для минимизации неспецифического связывания антител. Использовали первичные антитела к CD163 (ab182422) (маркер M2 макрофагов) и Fibroblast activation protein (FAP — маркер фибробластов) (ab28246) и вторичные Caprine-Anti-Rabbit IgG HRP (SAA544Rb19, CloudClone). HRP-метки вторичных антител проявляли с помощью DAB.

Для оценки микроокружения использовали антитела для автоматизированного ИГХ стейнера BOND-III:

- CD68 (514H12) общий панмакрофагальный маркер;
- CD19 (BT51E) маркер В-лимфоцитов;
- CD56 (CD564) маркер нейроэндокринных опухолей, белок метастазирования;
- Ki67 антигену (MM1) маркер пролиферации;
- Vcl-2 онкопротеину.

Окрашивание на автоматизированном ИГХ стейнере BOND-III проводили по стандартным протоколам.

Проточная цитофлуориметрия

В гомогенизированных образцах опухолевой ткани и перитуморальной области с количеством клеток 10⁶/мл с целью оценки микроокружения опухоли и окружающей ткани проводили цитофлуориметрическое исследование относительного количества CD14+ и CD16+ моноцитов, CD68+ макрофагов, CD86+ M1 макрофагов, CD163+ и CD206+ M2 макрофагов, CD4+ Т-лимфоцитов хелперов и CD45+ лейкоцитов на приборе MACSQuant® Analyzer («Miltenyi Biotec», Германия) с использованием следующих антител («Miltenyi Biotec», Германия): anti-Human CD4-FITC; anti-Human CD163-APC; anti-Human CD16-PE; anti-Human CD68-PE-Vio-770; anti-Human CD45-VioBlue; anti-Human CD14-FITC; anti-Human CD86-PE; anti-Human CD206-PerCPVio700. Гейтирование выполняли с использованием анти-CD14 и анти-CD45 моноклональных антител.

ПЦР-РВ

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в образцах опухолевой ткани и перитуморальной области определяли уровни экспрессии мРНК генов *HIF1A*, *VEGF*, *MMP2*, *ARG1*, *NOS2* и *EGFR*. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo, а для обратной транскрипции — MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Реакцию амплификации с детектированием в режиме реального времени проводили на Real-Time амплификаторе

DTprime («ДНК-Технология», Россия). Относительную концентрацию мРНК указанных генов рассчитывали методом прямого сравнения данных по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ — начальная концентрация мРНК гена в ПЦР-смеси, $[B]_0$ — начальная концентрация мРНК *GAPDH* в ПЦР-смеси, E — эффективность реакции (принимали равной 1,98), $\Delta C(T)$ — разность пороговых циклов *GAPDH* и искомого гена.

Таблица 2/ Table 2

Последовательности используемых праймеров/Sequences of used primers

Ген Gene	Последовательность Sequence	
GAPDH	Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
ARG1	Forward	TCATCTGGGTGGATGCTCACAC
	Reverse	GAGAATCCTGGCACATCGGGAA
HIF1-A	Forward	GCCCATTCCGCGTCTGAGT
	Reverse	ACTTGTGGGTGCTGGCACTG
MMP2	Forward	CGCTACGATGGAGGCGCTAA
	Reverse	GGGGCAGCCATAGAAGGTGT
NOS2	Forward	GCTCTACACCTCCAATGTGACC
	Reverse	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG
EGFR	Forward	CCCCCTGACTCCGTCCAGTA
	Reverse	CCCAACTGCGTGAGCTTGT
VEGF	Forward	GGGCAGAATCATCACGAAGT
	Reverse	GGTGAGGTTTGATCCGCATA

Статистические методы

Статистический анализ полученных данных проводили в программе «Statistica 8.0». Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха Me ($LQ(25\%)$; $UQ(75\%)$). Для установления достоверности различий между показателями, в зависимости от характера распределения полученных данных, использовали критерии множественного

сравнения Краскела — Уоллиса, Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С помощью ИГХ исследования была оценена экспрессия белков, отвечающих за пролиферацию (Ki-67), апоптоз (Bcl2), маркеров макрофагов (CD68, CD163), В-лимфоцитов (CD19), белка клеточной адгезии (CD56), маркера фибробластов (FAP).

Таблица 3/ Table 3

ИГХ исследование уровня экспрессии белков, отвечающих за пролиферацию (Ki-67), апоптоз (Bcl-2), маркеров макрофагов (CD68, CD163), В-лимфоцитов (CD19), белка клеточной адгезии (CD56), маркера фибробластов (FAP) в опухолевом узле плеоморфных сарком/

IGC study of the expression level of proteins responsible for proliferation (Ki-67), apoptosis (Bcl-2), markers of macrophages (CD68, CD163), B-lymphocytes (CD19), cell adhesion protein (CD56), fibroblast marker (FAP) in the tumor node of pleomorphic sarcomas

№	Ki-67	Bcl-2	CD68	CD19	CD56	CD163	FAP
1	<<30 %	+	<30 %	Единичные Single	+++	Отр Neg	+++
2	30 %	+	30 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	+
3	>50 %	+	~30	Единичные Single	+++	Отр Neg	+
4	<30 %	+++	<30 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	+
5	>50 %	+++	~30–50 %	Отр Neg	+	Отр Neg	+
6	>50 %	+++	~30–50 %	Отр Neg	Отр Neg	Отр Neg	±
7	30–50 %	+	~30–50 %	Отр Neg	+	+	Отр Neg
8	<30 %	+++	30–50 %	Отр Neg	+	Единичные Single	+++
9	<30 %	+	<30 %	+	+	Отр Neg	+
10	<30 %	Отр Neg	30–50 % Гигантские клетки Giant cells	Отр Neg	+++	Отр Neg	Отр Neg

Примечания: Отр – отрицательная реакция.

Note: Neg – negative reaction

Согласно ИГХ исследованию из 10 образцов плеоморфных сарком 4 характеризовалось высокой экспрессией Ki-67 (более 30 % Ki-67+ клеток в препарате) (Рис. 1А), тогда как в 6 образцах уровень экспрессии Ki-67 был ниже 30 % (Рис. 1Б). В 4 образцах плеоморфных сарком выявлялся высокий уровень экспрессии Bcl-2 (Рис. 1В), низкая экспрессия Bcl-2 обнаружена в 4 образцах (Рис. 1Г) и в одном образце Bcl-2-положительные клетки не выявлялись (Рис. 1Д).

Экспрессия Ki-67 является одним из самых надежных индикаторов пролиферативной активности раковых клеток. Ki-67 представляет собой ядерный антиген, экспрессирующийся во всех фазах клеточного цикла, за исключением G0. Как и для других ЗНО, высокий уровень экспрессии Ki-67 при СМТ коррелирует с неблагоприятным прогно-

зом [6]. Кроме этого, высокий уровень экспрессии Ki-67 в образцах СМТ значительно коррелирует с частотой локальных рецидивов [7]. ЗНО с индексом Ki-67 > 20 % характеризуются быстрым метастазированием и низкими показателями общей выживаемости [8].

Другим оцениваемым ИГХ-маркером явился белок В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), являющийся ключевым регулятором антиапоптотической активности. Высокий уровень экспрессии Bcl-2 обнаружен при большом количестве ЗНО [9]. Повышение уровня экспрессии Bcl-2 характерно в период эмбрионального развития, а также его оверэкспрессия наблюдается в ответ на клеточный стресс. Нарушения в процессе апоптоза играют важную роль в инициации и прогрессии опухолевого роста. Кроме того, патологии апоптоза снижают эффективность химиотерапии.

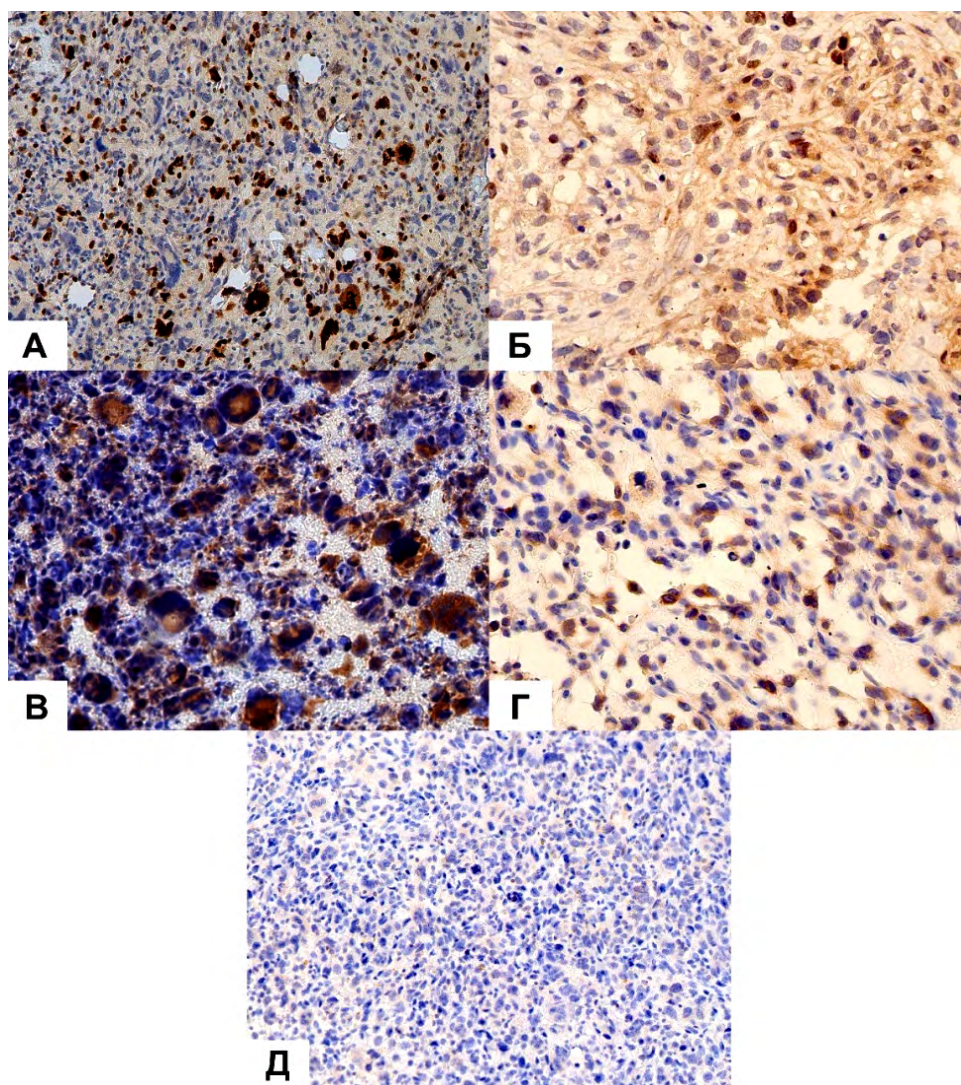


Рисунок 1. Гетерогенность экспрессии Ki-67 (А, Б) и Bcl-2 (В–Д) на гистологических срезах НПС.
А – экспрессия Ki-67 более 50 % клеток (x200, Об. 3); Б – экспрессия Ki-67 менее 30 % клеток (x200, Об.1);
В – выраженная экспрессия Bcl-2 (x200, Об.5); Г – низкая экспрессия Bcl-2 (x200, Об.7);
Д – отрицательная реакция с антителами к Bcl-2 (x200, Об.10)

Figure 1. Heterogeneity of Ki-67 (A, B) and Bcl-2 (B–D) expression on histologic sections of UPS.
A – Ki-67 expression more than 50 % of cells (x200, Ob.3); Б – Ki-67 expression less than 30 % of cells (x200, Ob.1);
B – marked expression of Bcl-2 (x200, Ob.5); Г – low expression of Bcl-2 (x200, Ob.7); Д – negative reaction with antibodies to Bcl-2 (x200, Ob.10)

По данным литературы высокая экспрессия Bcl-2 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом заболевания [10]. BCL-2 и ассоциирован с неблагоприятным прогнозом заболевания [10]. В СМТ высокую экспрессию данного маркера связывают с химиорезистентностью, так, ингибирование членов

семейства Bcl-2 привело к более эффективному ответу клеточных линий лейомиосаркомы на введение доксорубина [11]. В 4 из 10 нами исследуемых образцов был обнаружен высокий уровень экспрессии Bcl-2, что вероятнее всего, прогнозирует агрессивное течение заболевания у данных пациентов.

В исследовании The Cancer Genome Atlas (TCGA), включающем 206 СМТ, в НПС были выявлены высокие уровни опухоль-ассоциированных макрофагов [12]. В другом исследовании [13] количественно оценили уровень опухоль-ассоциированных макрофагов, с помощью иммуногистохимических маркеров CD68 (общего маркера макрофагов) и CD163 (маркера M2 макрофагов). Плеоморфные типы саркомы продемонстрировали самые высокие показатели как макрофагов CD68+, так и CD163+. В ходе нашего исследования мы получили несколько несколько различающиеся результаты.

Во всех исследуемых гистологических препаратах были выявлены CD68+ макрофаги. Их число варьировало: в 5 образцах наблюдалось высокое количество CD68+ клеток (30—50 %) (Рис. 2А), менее 30 % макрофагов выявлено в других 5 образцах. В одном случае определялись гигантские CD68+ клетки (Рис. 2Б). Однако CD163+ макрофаги (M2 фенотипа) не определялись (Рис. 2Г), только в 2 образцах наблюдалась положительная реакция с антителами к CD163 (Рис. 2В). Мы объясняем подобное явление, в первую очередь, небольшим количеством образцов, взятых для исследования.

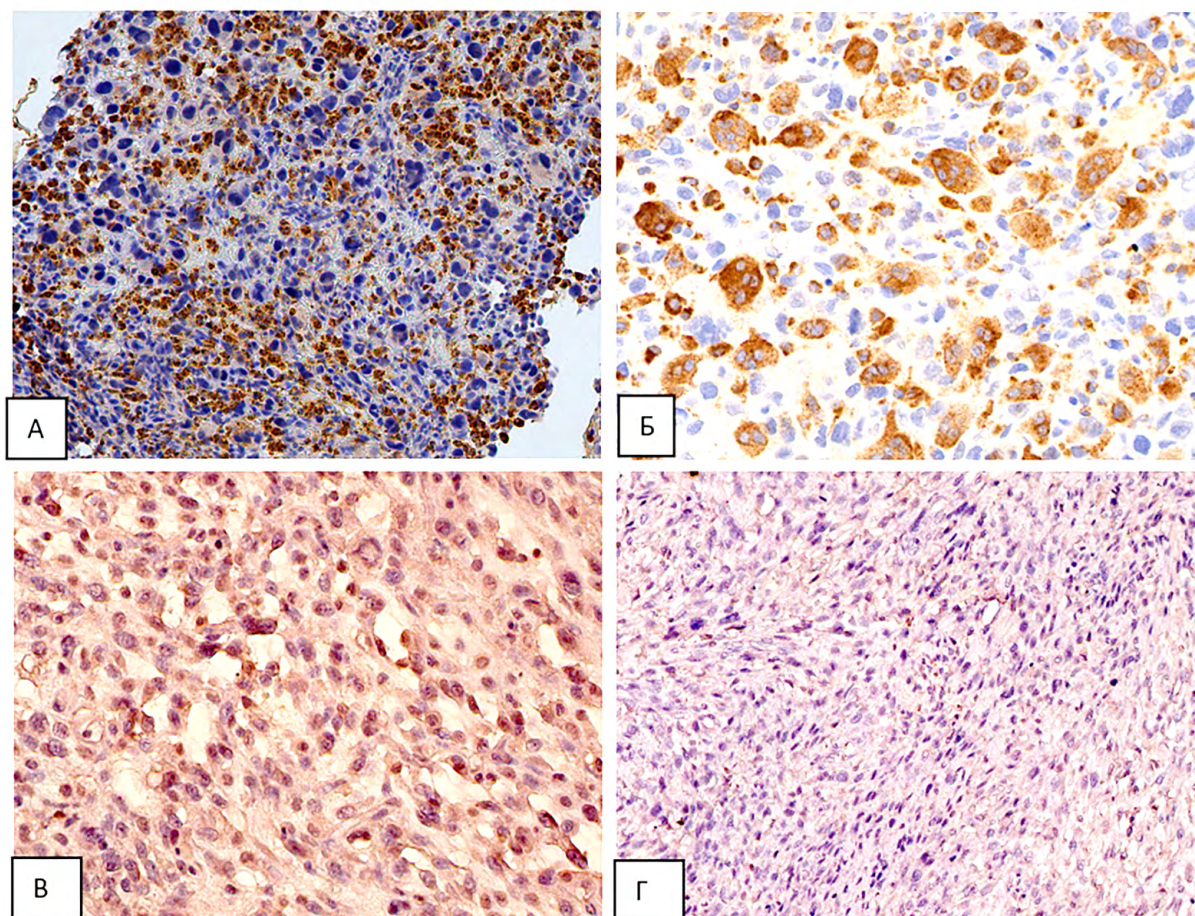


Рисунок 2. CD68+ макрофаги (А, Б) и CD163+ макрофаги (В) и CD19+ лимфоциты (В–Д) в НПС. А – высокое число CD68+ макрофагов (x200, Об.5); Б – гигантские CD68+ клетки (x400, Об.10); В – CD163+ макрофаги (x400, Об.7); Г – отрицательная реакция с антителами к CD163+ (x200, Об.10)

Figure 2. CD68+ macrophages (A, B) and CD19+ lymphocytes (B–D) in UPS.

A – high number of CD68+ macrophages (x200, Ob.5); Б – giant CD68+ cells (x400, Ob.10); В – CD163+ macrophages (x400, Ob.7); Г – negative reaction with antibodies to CD163+ (x200, Ob.10)

Несмотря на то, что молекула адгезии нервных клеток-1 (NCAM1) или CD56 известна своей ролью фенотипического маркера естественных киллеров (NK) клеток, на самом деле он может экспрессироваться многими другими подпопуляциями иммунных клеток, включая НКТ-клетки, гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки, CD8 Т-клетки, моноциты, дендритные клетки [14]. Этот гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов экспрессируется при различных ЗНО и вовлечен в процессы межклеточной адгезии, роста аксонов, синаптической пластичности, клеточной памяти [15]. В 7 образцах плеоморфных сарком (табл. 2) была обнаружена положительная реакция с антителами к CD56. Причем в этих образцах плеоморфных сарком НК клетки не были идентифицированы, а окрашивание наблюдалось вокруг опухолевых клеток (Рис. 3А-Б). Максимально выраженная экспрессия опухолевыми клетками CD56 была выявлена в 3 образцах (Рис. 3А), в других 4-х опухолевых образцах (Рис. 3Б) CD56 экспрессировался на низком уровне.

CD19+ В-лимфоциты выявлены только в 3 образцах из 10, при этом только в одном образце наблюдалось высокое число CD19+ лимфоцитов, которые образовывали очаговые скопления (Рис. 3В). В двух других образцах CD19+ В-лимфоциты были единичными в препарате (Рис. 3Г). В остальных случаях в опухолях не было обнаружено CD19+ лимфоцитов. По данным литературы НПС характеризуются доминированием опухоль-ассоциированных макрофагов над лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль [13].

Белок активации фибробластов- α (FAP) представляет собой сериновую протеазу II типа, которая специфически экспрессируется активированными фибробластами. В последние годы большое внимание уделяется исследованию про- и противоопухолевых свойств FAP в связи с его высокой экспрессией в ЗНО. Результаты показывают, что экспрессия FAP связана с ростом опухоли; оказывает влияние на пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, ангиогенез, эпителиально-мезенхимальный переход, иммуносупрессию и лекарственную устойчивость [16]. При окрашивании антителами к FAP была

обнаружена его экспрессия в 8 из 10 исследованных образцов (Рис. 3 В, Г).

По данным проточной цитометрии, среди клеток микроокружения НПС преобладали CD16 моноциты и CD68 макрофаги (Рис. 4А). Из общей тенденции выбивался образец (ОТ4), в котором преобладали CD206-макрофаги над CD86 и CD163 (Рис. 4Б). Из анамнеза заболевания пациента известно, что в ходе длительного течения НПС (продолжительность 2 года) проводилась химиотерапия, лучевая терапия и назначался таргетный препарат. Возможно, именно предшествующие методы лечения вызвали изменения клеточного состава микроокружения опухоли.

Методом ПЦР-РВ была оценена экспрессия генов в образцах от 8 пациентов, что связано с нехваткой биоматериала от пациентов 9 и 10 после предшествующих методов исследования. По данным ПЦР-РВ, уровни экспрессии *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* не различались между образцами опухоли и ткани перитуморальной области, которую мы использовали в качестве контроля. Выявлено увеличение уровня экспрессии *EGFR* в НПС по сравнению с тканью перитуморальной области (Рис. 5). По данным литературы, высокий уровень экспрессии *EGFR* в НПС коррелирует с неблагоприятным прогнозом [4].

У двух пациентов (2 и 7) наблюдалась низкая экспрессия *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* в опухоли по сравнению с перитуморальной областью (табл. 3). Попытка сопоставления таких результатов с клиническими особенностями течения заболевания у этих пациентов на данном этапе не привела к успеху. Пациент 8 характеризовался увеличением уровня экспрессии *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2*. Высокая экспрессия данных генов, возможно, связана с длительным рецидивирующим течением заболевания (с 2018 г.) и предшествующей химиотерапией и лучевой терапией.

По сравнению с перитуморальной областью у 3 пациентов из 8 наблюдалось снижение уровня экспрессии маркера M2 противовоспалительных макрофагов — *ARG1*, у 3 пациентов, напротив, его повышение. Уровень экспрессии *NOS2* — маркера провоспалительных реакций возрастал по сравне-

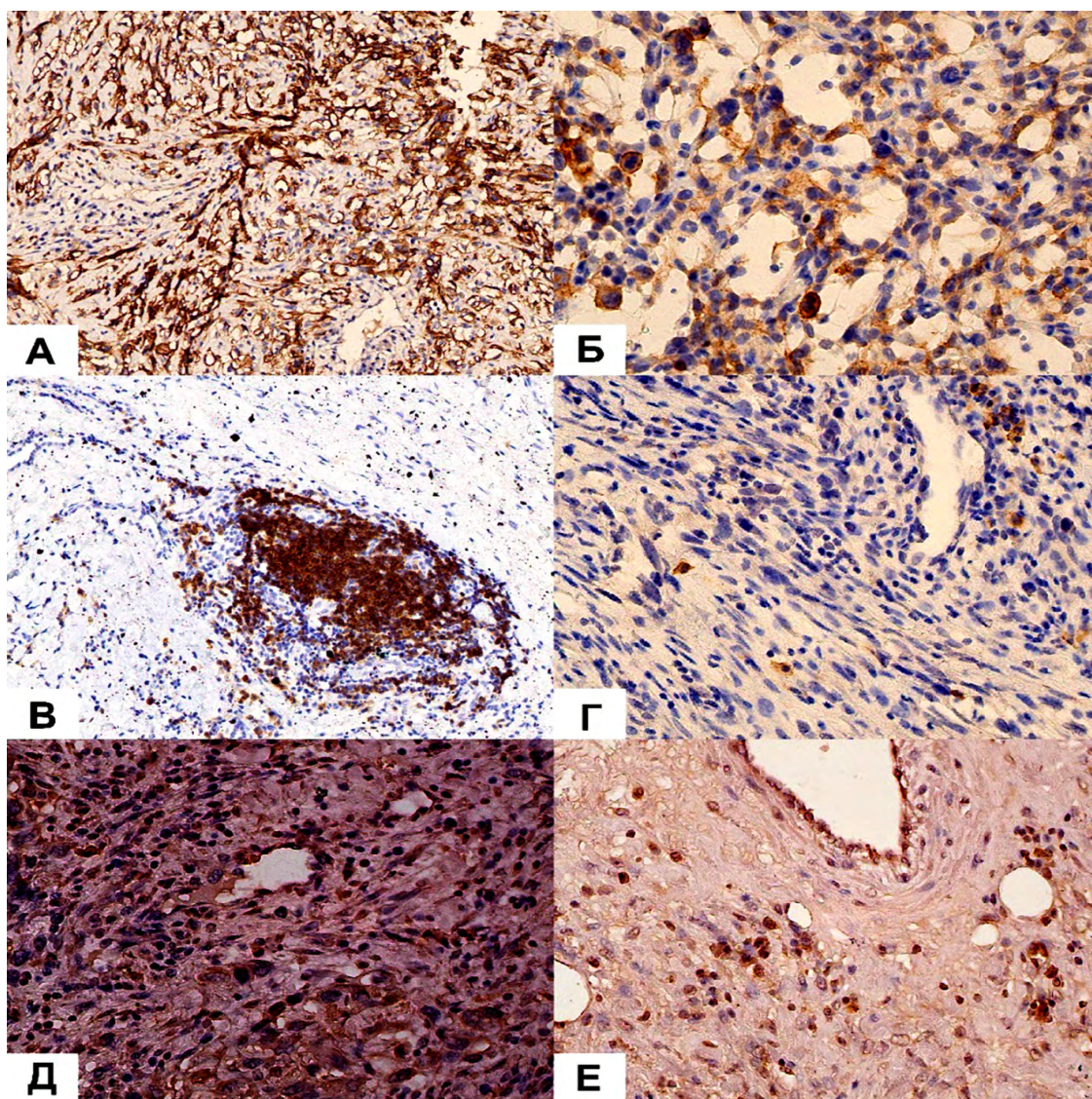


Рисунок 3. CD56+ опухолевые клетки (А, Б), CD163+ макрофаги (В, Г) и FAP+ фибробласты (Д, Е) в НПС. А – выраженная экспрессия CD56+ (x400, Об.1); Б – умеренная экспрессия CD56+ в опухолевых клетках (x400, Об.7); В – скопление CD19+ лимфоцитов (x200, Об.9); Г – единичные CD19+ лимфоциты (x400, Об.1); Д – высокое число FAP+ фибробластов (x400, Об.4); Е – умеренное число FAP+ фибробластов (x400; Об.9)

Figure 3. CD56+ tumor cells (А, Б), CD163+ macrophages (В, Г) and FAP+ fibroblasts (Д, Е) in UPS. А – marked expression of CD56+ (x400, Ob.1); Б – moderate expression of CD56+ in tumor cells (x400, Ob.7); В – cluster of CD19+ lymphocytes (x200, Ob.9); Г – single CD19+ lymphocytes (x400, Ob.1); Д – high number of FAP+ fibroblasts (x400, Ob.4); Е – moderate number of FAP+ fibroblasts (x400; Ob.9)

нию с перитуморальной областью у 3 пациентов, у 2, напротив, снижался. Уровень экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией, *HIF1A* возрастал у 4 пациентов, а у 3 из 8 наблюдалось снижение уровня экспрессии по сравнению с перитуморальной областью. По данным литературы, увеличение уровня

экспрессии *HIF1A* коррелирует с формированием некроза и негативным прогнозом [17]. Уровень экспрессии *VEGF* (фактора роста эндотелия сосудов) был снижен по сравнению с перитуморальной областью у 4 пациентов, что характерно для НПС [18]. Тогда как у 2 пациентов, напротив, наблюдалось

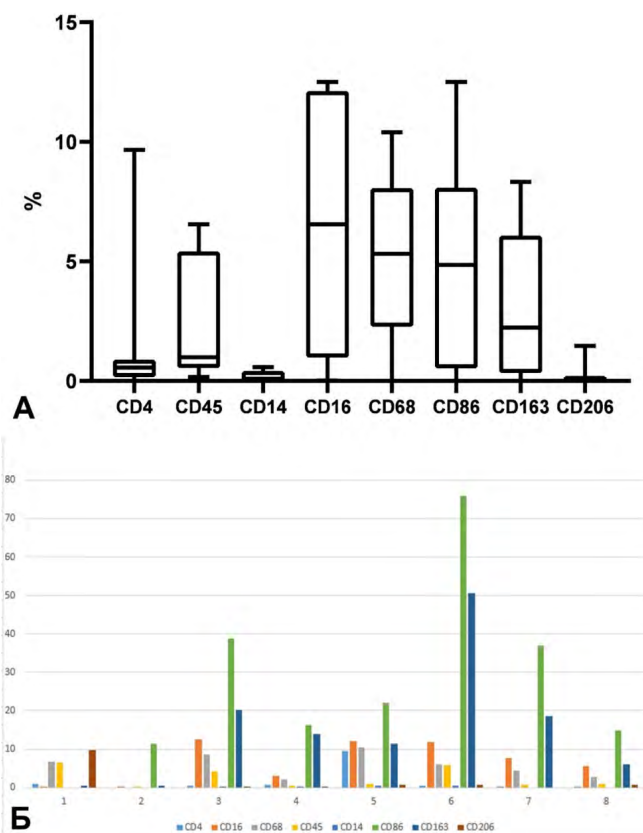


Рисунок 4. Микроокружение НПС. **А** — относительное число **CD4** — Т-лимфоцитов хелперов, **CD45** — лейкоцитов, **CD14** — моноцитов, **CD16** — моноцитов, **CD68** — макрофагов, **CD86** — M1 макрофагов, **CD163** — M2 макрофагов, **CD206** — M2 макрофагов. **Б** — относительное число лимфоцитов и моноцитов у 8 пациентов

Figure 4. UPS microenvironment. **A** — relative number of **CD4** — helper T-lymphocytes, **CD45** — leukocytes, **CD14** — monocytes, **CD16** — monocytes, **CD68** — macrophages, **CD86** — M1 macrophages, **CD163** — M2 macrophages, **CD206** — M2 macrophages. **Б** — relative number of lymphocytes and monocytes in 8 patients

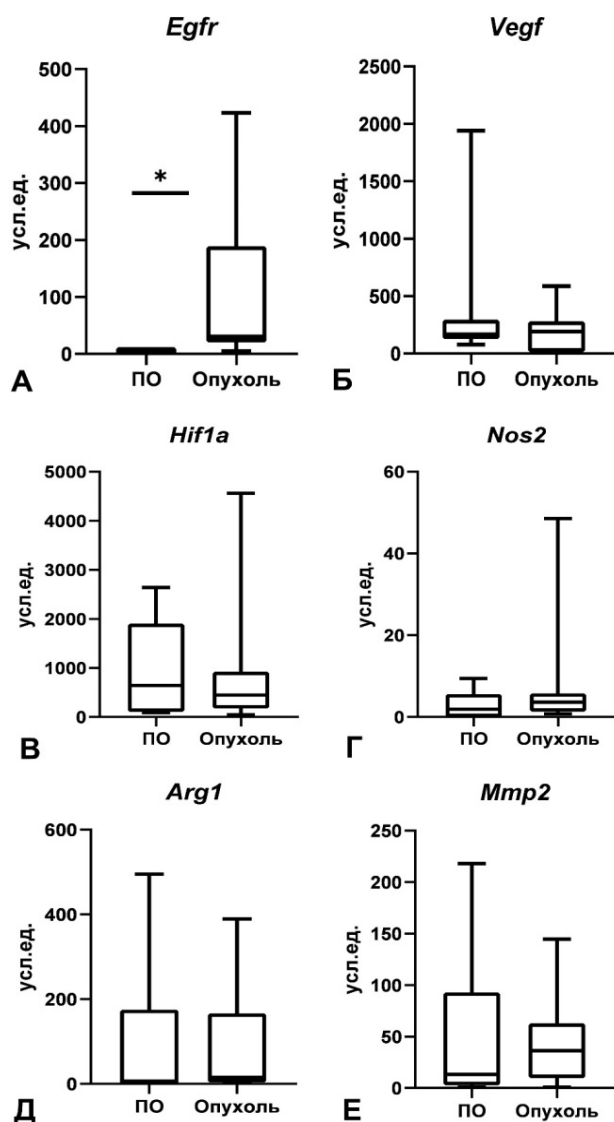


Рисунок 5. Уровни экспрессии *EGFR*, *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* и *MMP2* в перитуморальной области (ПО) и в образцах НПС. Критерий Манна-Уитни, * $p < 0,05$

Примечание: ПО — перитуморальная область.

Figure 5. Expression levels of *EGFR*, *ARG1*, *NOS2*, *HIF1A*, *VEGF* and *MMP2* in the peritumoral region (ПО) and in tumor samples of UPS. Mann-Whitney criterion, * $p < 0.05$

Note: ПО — peritumoral area.

увеличение уровня экспрессии VEGF. VEGF представляет собой один из ключевых индукторов ангиогенеза. Взаимодействие VEGF-A с рецептором VEGF 2 (VEGFR2) активирует широкий спектр внутри- и внеклеточных событий, способствуя выживанию, пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также дифференцировку эндотелиальных клеток, расширение сосудов и повышение проницаемости сосудистой стенки [19].

У 3 пациентов наблюдалось снижение уровня экспрессии MMP2, а у 3, напротив, ее повышение. По данным литературы, MMP2 играет важную роль в инвазии опухолевых клеток и метастазировании [20].

Таблица 4/ Table 4

Изменение уровней экспрессии ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF и MMP2 в НПС по отношению к перитуморальной области/
Changes in expression levels of ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF, and MMP2 in the UPS relative to the peritumoral region

Пациент № / Patient №	ARG1	NOS2	HIF1A	VEGF	MMP2
1	0,05	0,84	0,71	0,62	0,16
2	0,06	0,25	0,08	1	11,3
3	1,1	17,0	4,8	0,01	0,64
4	2,6	0	0,08	4,8	5,0
5	3,2	0,08	4,7	0,1	0,01
6	236,2	6,1	8,6	0,03	0,009
7	0,3	0	0,14	0,24	1,85
8	1,0	16,5	3,3	2,0	186,0

В опухолевых клетках НПС было отмечено увеличение уровня экспрессии EGFR по сравнению с перитуморальной областью. Уровни экспрессии ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF и MMP2 в опухолях имели индивидуальные различия.

Выводы

В ходе оценки клеточного состава и экспрессии генов в образцах опухоли от 10 пациентов с НПС обнаружено, что для данного типа СМТ характерна экспрессия CD56, FAP, CD68. Среди клеток микроокружения в НПС преобладают макрофаги и CD16-моноциты. В опухолевых клетках НПС

увеличен уровень экспрессии EGFR, а уровни экспрессии ARG1, NOS2, HIF1A, VEGF и MMP2 в опухолях имеют индивидуальные различия и не являются специфическими для НПС.

Для оценки клинической значимости каждого из маркеров необходимо дальнейшее наблюдение за пациентами. Ввиду редкости и высокой гетерогенности данного подтипа СМТ даже незначительное дополнение к молекулярно-биологическому «портрету» НПС послужит основой для будущих исследований данного заболевания.

Библиографический список/References

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17—48. doi:10.3322/caac.21763
2. Fuchs JW, Schulte BC, Fuchs JR, Agulnik M. Targeted therapies for the treatment of soft tissue sarcoma. *Front Oncol.* 2023;13:1122508. Published 2023 Mar 9. doi:10.3389/fonc.2023.1122508
3. Sun H, Liu J, Hu F. Current research and management of undifferentiated pleomorphic sarcoma/myofibrosarcoma. *Front Genet.* 2023;14:1109491. Published 2023 Feb 16. doi:10.3389/fgene.2023.1109491
4. Lu Y, Chen D, Wang B. Single-cell landscape of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Oncogene.* 2024;43(18):1353—1368. doi:10.1038/s41388-024-03001-8
5. Canter RJ, Beal S, Borys D, Martinez SR, Bold RJ, Robbins AS. Interaction of histologic subtype and histologic grade in predicting survival for soft-tissue sarcomas. *J Am Coll Surg.* 2010;210(2):191—198.e2. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2009.10.007
6. Yıldırım S, Çiftdemir M, Ustabaşoğlu FE, Üstün F, Usta U. Evaluation of the factors affecting survival and local recurrence in thigh soft tissue sarcomas. *Jt Dis Relat Surg.* 2024;35(1):130—137. doi:10.52312/jdrs.2023.1289
7. Campos M, DE Campos SG, Ribeiro GG. Ki-67 and CD100 immunohistochemical expression is associated with local recurrence and poor prognosis in soft tissue sarcomas, respectively. *Oncol Lett.* 2013;5(5):1527—1535. doi:10.3892/ol.2013.1226
8. Atik OŞ. Writing for Joint Diseases and Related Surgery (JDRS): There is something new and interesting in this article!. *Jt Dis Relat Surg.* 2023;34(3):533. doi:10.52312/jdrs.2023.57916
9. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022;12:985363. Published 2022 Oct 12. doi:10.3389/fonc.2022.985363
10. Janik AM, Terlecka A, Spalek MJ. Diagnostics and Treatment of Extrameningeal Solitary Fibrous Tumors. *Cancers (Basel).* 2023;15(24):5854. doi:10.3390/cancers15245854
11. de Graaff MA, de Rooij MA, van den Akker BE. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer.* 2016;114(11):1219—1226. doi:10.1038/bjc.2016.117

12. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: elizabeth.demicco@sinaihealthsystem.ca; Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*. 2017;171(4):950—965.e28. doi:10.1016/j.cell.2017.10.014
13. Dancsok AR, Gao D, Lee AF. Tumor-associated macrophages and macrophage-related immune checkpoint expression in sarcomas. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1747340. doi:10.1080/2162402X.2020.1747340
14. Van Acker HH, Van Acker ZP, Versteven M. CD56 Homodimerization and Participation in Anti-Tumor Immune Effector Cell Functioning: A Role for Interleukin-15. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):1029. doi:10.3390/cancers11071029
15. Jaiswal P, Cd A, John JJ. A Spectrum of Histomorphological and Immunohistochemical Expression Profiles of S-100, CD56 and Calretinin in Benign Peripheral Nerve Sheath Tumours. *Cureus*. 2023;15(6): e40751. doi:10.7759/cureus.40751
16. Xin L, Gao J, Zheng Z. Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review. *Front Oncol*. 2021;11:648187. doi:10.3389/fonc.2021.648187
17. Nyström H, Jönsson M, Werner-Hartman L, Nilbert M, Carneiro A. Hypoxia-inducible factor 1 α predicts recurrence in high-grade soft tissue sarcoma of extremities and trunk wall. *J Clin Pathol*. 2017;70(10):879—885. doi:10.1136/jclinpath-2016-204149
18. Washimi K, Kasajima R, Shimizu E, et al. Histological markers, sickle-shaped blood vessels, myxoid area, and infiltrating growth pattern help stratify the prognosis of patients with myxofibrosarcoma/undifferentiated sarcoma. *Sci Rep*. 2023;13(1):6744. doi:10.1038/s41598-023-34026-w
19. Ghalebandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, Pourgholami MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol*. 2023;949:175586. doi:10.1016/j.ejphar.2023.175586
20. Ahlén J, Enberg U, Larsson C. Malignant Fibrous Histiocytoma, Aggressive Fibromatosis and Benign Fibrous Tumors Express mRNA for the Metalloproteinase Inducer EMMPRIN and the Metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP. *Sarcoma*. 2001;5(3):143—149. doi:10.1080/13577140120048601

Ответственный за переписку: Джуманиязова Э.Д. — аспирант, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института Российского университета дружбы народов, стажер-исследователь лаборатории молекулярной патофизиологии клетки Научно-исследовательского института молекулярной и клеточной медицины Российского Университета дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. E-mail: enar2017@yandex.ru

Джуманиязова Э.Д. SPIN 1780-5326, ORCID 0000-0002-8226-0433

Лохонина А.В. SPIN 4521-2250, ORCID 0000-0001-8077-2307

Сентябрева А.В. SPIN 6966-9959, ORCID 0000-0001-5064-219x

Косырева А.М. SPIN 5421-5520, ORCID 0000-0002-6182-1799

Джалилова Д.Ш. SPIN 3660-5827, ORCID 0000-0002-1337-7160

Мирошниченко Е.А. SPIN 2436-4104, ORCID 0000-0002-0020-958X

Фетисов Т.И. SPIN 6890-8393, ORCID 0000-0002-5082-9883

Corresponding author: Jumaniyazova Enar Denisovna — PhD student, assistant at the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Medical Institute of the Russian Peoples' Friendship University, researcher at the Laboratory of Molecular Cell Pathophysiology of the Research Institute of Molecular and Cellular Medicine of the RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya st., 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: enar2017@yandex.ru

Jumaniyazova E.D. ORCID 0000-0002-8226-0433

Lokhonina A.V. ORCID 0000-0001-8077-2307

Sentyabreva A.V. ORCID 0000-0001-5064-219X

Kosyreva A.M. ORCID 0000-0002-6182-1799

Dzhalilova D. Sh. ORCID 0000-0002-1337-7160

Miroshnichenko E.A. ORCID 0000-0002-0020-958X

Fetisov T.I. ORCID 0000-0002-5082-9883



DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-466-487

EDN GYDTZJ


ОБЗОР
REVIEW

Озонотерапия злокачественных новообразований

П.Ю. Андреев^{1,2} , И.П. Мошуров^{1,2} , Н.В. Коротких^{1,2} ,
В.В. Шишкина² , Т.В. Самойленко² , Е.С. Горюшкина^{1,2} , Л.Н. Антакова²  

¹ Воронежский областной клинический онкологический диспансер, г. Воронеж, Российская Федерация

² Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, г. Воронеж, Российская Федерация

 tsvn@bk.ru

Аннотация. *Актуальность.* Развитие эффективных терапевтических подходов для лечения злокачественных новообразований является одной из приоритетных задач современных биомедицинских исследований. Неутешительные данные эпидемиологических показателей и статистических выкладок заболеваемости диктуют необходимость разработки и внедрения все более эффективных методов лечения, а также его модуляции. В экспериментальных работах на клеточных линиях, животных моделях и в ходе клинических исследований отмечаются положительные биологические эффекты озонотерапии, заключающиеся в способности озона оказывать антинеопластическое влияние на опухоли и сенсibilизировать их к химиолучевому лечению. Терапия злокачественных опухолей является ключевым объектом современных биомедицинских исследований. *Цель:* обобщение экспериментальных и клинических данных о месте озонотерапии в лечении злокачественных новообразований. Литература, включенная в настоящий систематический обзор, была получена в результате независимого поиска литературы, проведенного в следующих базах данных: Elibrary.ru, КиберЛенинка, Центральная научная медицинская библиотека, Google Scholar, Semantic Scholar, PubMed и Cochrane. Обнаружено, что эффекты озона основаны на его реакциях с органическими соединениями: водорастворимыми и липофильными антиоксидантами, а также ненасыщенными жирными кислотами, в результате чего генерируются реактивные формы кислорода и липоперекиси, которые обладают свойствами мессенджеров, взаимодействуя с различными клеточными и тканевыми структурами. Считается, что ранние биологические эффекты реализуются за счёт активных форм кислорода, а поздние за счет липоперекисей. *Выводы.* В ряде исследовательских работ, которые были проведены на многочисленных культурах опухолевых клеток, животных моделях и в условиях клинического применения, установлены положительные биологические эффекты озонотерапии, связанные с возможностью озона оказывать цитотоксическое и цитостатическое влияние на опухоли различного гистогенеза и локализаций, а также сенсibilизировать бластотрансформированные клетки к ионизирующему излучению и химиотерапевтическим агентам.

Ключевые слова: озон, озонотерапия, химиотерапия, радиотерапия, рак

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

© Андреев П.Ю., Мошуров И.П., Коротких Н.В., Шишкина В.В., Самойленко Т.В., Горюшкина Е.С., Антакова Л.Н., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Вклад авторов. Андреев П.Ю. — написание текста, проверка критически важного интеллектуального содержания, анализ данных; Мошуров И.П. — научное консультирование, окончательное утверждение для публикации рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания; Коротких Н.В. — сбор и обработка материала, написание текста, подготовка к публикации; Шишкина В.В. — проверка критически важного интеллектуального содержания, анализ данных, редактирование текста статьи; Горюшкина Е.С. — сбор и обработка материала; Самойленко Т.В. — сбор и обработка материала, написание текста; Антакова Л.Н. — сбор и обработка материала, написание текста. Все авторы внесли значительный вклад в разработку концепции, исследования и подготовку рукописи, прочитали и утвердили окончательную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 19.03.2024. Принята 10.04.2024.

Для цитирования: Андреев П.Ю., Мошуров И.П., Коротких Н.В., Шишкина В.В., Самойленко Т.В., Горюшкина Е.С., Антакова Л.Н. Озонотерапия злокачественных новообразований // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 466–487. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-466-487. EDN: GYDTZJ

Malignant neoplasms ozone therapy

Pavel Yu. Andreev^{1,2} , Ivan P. Moshurov^{1,2} , Nataliya V. Korotkih^{1,2} , Viktoria V. Shishkina² ,
Tatiana V. Samoilenko² , Elena S. Goryushkina^{1,2} , Lyubov N. Antakova²  

¹Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary, Voronezh, Russian Federation

²N.N. Burdenko Voronezh state medical university, Voronezh, Russian Federation

*tsvn@bk.ru

Abstract. The development of effective therapeutic approaches for the treatment of malignant neoplasms is one of the priorities of modern biomedical research. Disappointing data from epidemiological indicators and statistical calculations of morbidity dictate the need to develop and implement increasingly effective treatment methods, as well as its modulation. In experimental work on cell lines, animal models and in clinical studies, the positive biological effects of ozone therapy are noted, consisting in the ability of ozone to have an antineoplastic effect on tumors and sensitize them to chemoradiotherapy. Therapy of malignant tumors is a key object of modern biomedical studies. *The aim* of this work was to summarize experimental and clinical data on the place of ozone therapy in the treatment of malignant neoplasms. The literature included in the current systematic review was obtained from an independent literature search performed in the following databases: Elibrary, Cyberleninka, Central Scientific Medical Library, Google Scholar, Semantic Scholar, PubMed and Cochrane. It was found that the biological effects of ozone are based on its reactions with organic compounds: water-soluble and lipophilic antioxidants, as well as unsaturated fatty acids, resulting in the generation of reactive oxygen species and lipid peroxides, which have messenger properties, interacting with various cellular and tissue structures. It is believed that early biological effects are realized due to reactive oxygen species, and late ones due to lipoperoxides. *Conclusion.* In a number of research works, which were carried out on many cultures of tumor

cells, animal models and in clinical use, the positive biological effects of ozone therapy were established, associated with the fact that ozone has a cytotoxic and cytostatic effect on cyclic histogenesis and localization, and also sensitizes blastotransformed cells to ionizing agents and chemotherapeutic agents.

Key words: ozone, ozone therapy, chemotherapy, radiotherapy, cancer

Funding. The authors state that there was no external funding.

Author contributions. Andreev P. Yu. — text writing, critical intellectual content review, data analysis; Moshurov I.P. — scientific advice, final approval for publication of the manuscript, review of critical intellectual content; Korotkikh N.V. — collecting and processing material, writing text, preparing for publication; Shishkina V.V. — review of critical intellectual content, data analysis, editing the text of the article; Goryushkina E.S. — collecting and processing material; Samoilenko T.V. — collecting and processing material; Antakova L.N. — collecting and processing material, writing text. All authors have made significant contributions to the development concepts, research, and manuscript writing, read and approved final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication — not applicable.
Received 19.03.2024. Accepted 10.04.2024.

For citation: Andreev P.Yu, Moshurov IP, Korotkikh NV, Shishkina VV, Samoilenko TV, Goryushkina ES, Antakova LN. Malignant neoplasms ozone therapy. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):466–487. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-466-487. EDN: GYDTZJ

Введение

Озон представляет собой аллотропную модификацию молекулярного кислорода с трехатомарной структурой — O_3 [1]. В стационарной точке, соответствующей термодинамическому равновесию, длина каждой из связей между атомами кислорода в соединении составляет $\approx 1,2792 \text{ \AA}$, причём одна из них носит характер двойной. Пространственная конфигурация молекулы образует треугольную структуру, в которой боковые атомы кислорода располагаются под углом $\approx 116,46^\circ$ относительно центрального [2]. Озон является абиогенным нестабильным соединением и в константных условиях в наибольших количествах содержится в составе стратосферных газов. Тем не менее, озон сконцентрирован и в нижних слоях атмосферы, в том числе и в тех, которые представлены в непосредственной близости от земной поверхности, составляя значи-

тельную часть окислителей в воздухе [3]. Несмотря на то, что озон обладает окислительными свойствами, исследовательский интерес к изучению его биологических свойств и эффектов прослеживается с конца XIX столетия, когда в 1896 году Никола Тесла запатентовал озоновый генератор. На сегодняшний день известно более ста нозологических категорий, с целью лечения которых предлагалась озонотерапия [4]. В число этих нозологий входят и злокачественные новообразования различных локализаций.

Процессы опухолевого роста тесно взаимосвязаны с состоянием гипоксии, в которой пребывает микроокружение малигнантного фокуса [5, 6], создавая предпосылки для ангиогенеза [7], изменения в экспрессии генов бластотрансформированными клетками [8, 9], активации специфических сигнальных каскадов [10], инициации эпителиально-

мезенхимального перехода [11—15], реорганизации и ремоделирования компонентов внеклеточного матрикса [16—18], нивелирования иммунной агрессии [19—21] и других адаптивных механизмов, необходимых для существования и роста опухоли, а также ее распространения [22]. Данные морфологических исследований позволяют говорить о вероятном существовании в опухоли порочного гипоксического круга [23, 24]. Его суть сводится к тому, что предшествующая гипоксия индуцирует экспрессию семейства транскрипционных гипоксией индуцированного фактора HIF [23, 24], которые в свою очередь влияют на экспрессию более 100 генов, благодаря чему активируются антиоксидантные системы, регулируется редокс-баланс, инициируется ангиогенез [25]. Тем не менее, морфологические особенности кровеносных сосудов в ходе неоангиогенеза часто сводятся к их структурно-функциональной дефективности, происходит реорганизация компонентов интерстициального матрикса. В ряде случаев васкулярная система опухоли мальформирована; некоторые сосуды заканчиваются слепо, часть из них не имеет оболочек из гладких миоцитов, отсутствует базальная мембрана [26]. Подобная несостоятельная структурная организация сосудистой сети опухоли сопровождается недостаточным уровнем снабжения опухолевых тканей кровью [27], вследствие чего степень гипоксии усиливается, замыкая порочный круг.

Помимо реализации специфических цитофизиологических механизмов и тканевых явлений, способствующих развитию опухоли, состояние гипоксии также препятствует терапевтическому эффекту ионизирующего излучения [28—31] и лекарственной терапии, создавая дополнительные сложности лечебно-диагностического характера [32—37]. Таким образом, парирование гипоксического состояния, а также вмешательство в редокс-статус малигнантного фокуса могут создать предпосылки для снижения его химиорезистентности и сделать более уязвимым к терапевтическим воздействиям. Несмотря на прооксидантные свойства озона и существующий дуализм в вопросах его применения, также

хорошо известны и положительные биологические эффекты, инициируемые этим соединением. Среди них — улучшение микроциркуляции, стимуляция репаративных процессов, увеличение оксигенации тканей [38] и снижение HIF-1 α [39, 40] (Таблица). В ряде экспериментальных работ на клеточных линиях, животных моделях, а также в ходе клинических исследований продемонстрированы антинеопластические свойства озона и способность к снижению химиорезистентности опухолей.

Механизм действия озона и биологические эффекты его применения

Биологические эффекты озона основаны на его реакциях с органическими соединениями: водорастворимыми и липофильными антиоксидантами, а также ненасыщенными жирными кислотами, в результате чего генерируются активные формы кислорода (АФК) и липоперекиси, которые обладают свойствами мессенджеров, взаимодействуя с различными клеточными и тканевыми структурами.

Считается, что ранние биологические эффекты реализуются за счет АФК, а поздние — за счет липоперекисей [41]. В условиях умеренного оксидативного стресса, опосредованного озонной экспозицией, инициируется экспрессия гена ядерного эритроидного фактора (Nuclear Factor Erythroid 2-like 2; NFE2L2), находящегося на длинном плече q второй аутосомы человека, цитогенетический локус 2q31.2. Ген NFE2L2 содержит 5 экзонов, кодируя белковый продукт NRF2 [42]. В результате посттранскрипционных преобразований синтезируются 14 сплайс-вариантов первичного транскрипта, 12 из которых являются белок-кодирующими, а остальные два — сохраняют неэкспонированным один из интронов и не транслируются [43]. В качестве консенсусной последовательности белкового продукта NRF2 была выбрана изоформа из 605 аминокислотных остатков с молекулярной массой ≈ 68 kDa [44]. Структурно-функциональная организация вторичной конформации белка сводится к наличию нескольких функциональных

доменов: NH₂-концевой гидрофильный домен, обладающий ДНК-связывающими свойствами; центральный домен с CNC-гомологией, консервативный у белков семейства NFE2; основной ДНК-связывающий домен и COOH-концевой домен с характерной вторичной укладкой по типу лейциновой молнии, состоящий из заряженных аминокислотных остатков и выполняющий функцию димеризации. Посредством ДНК-связывающих доменов NRF2 взаимодействует с регуляторными элементами генов, влияя на их экспрессию и реализацию генетической информации, а за счёт димеризирующего домена — образует молекулярные комплексы с некоторыми другими белками [45, 46]. В условиях клеточного стресса NRF2 перемещается в ядро, где накапливается, а затем формирует гетеродимерные комплексы с мелкими белками Maf (musculo aponeurotic fibrosarcoma proteins) [47]. Комплекс Maf-NRF2, выступая в роли транскрипционного фактора, связывается с промотрными областями цитопротективных генов. Нуклеотидные последовательности, известные как ARE (Antioxidant Response Element), являются сайтом связывания NRF2, за счет чего регулируется экспрессия более 200 генов [48, 49]. Молекулярное взаимодействие PMF1 (Polyamine-Modulated Factor-1) в области лейциновой молнии NRF2 приводит к формированию трансдействующего комплекса и его связыванию с цисрегуляторным элементом PRE (Polyamine Responsive Element) гена SSAT. Инициация транскрипции комплексом NRF2-PMF1 индуцирует гиперэкспрессию гена SSAT, ассоциированную с антинеопластической активностью полиаминов [50]. Взаимодействуя с альтернативным сплайс-вариантом δ -субъединицы эукариотического элонгирующего фактора трансляции 1 (eEF1B δ), NRF2 связывается с регуляторными элементами теплового шока (HSE — Heat Shock Element) в генах белков теплового шока и индуцирует их транскрипцию [51]. Таким образом, умеренный окислительный стресс, опосредованный озоновой экспозицией тканей, может создавать условия для цитопротективных реакций и нормализации редокс-статуса клеток, активируя

экспрессию супероксиддисмутазы, глутатион пероксидазы, глутатион S-трансферазы, каталазы, гемоксигеназы-1, НАДФН-хинон-оксидредуктазы, ферментов II фазы лекарственного метаболизма и других белков, влияющих на гомеостаз клетки, оксигенацию тканей, кинетику энзиматических реакций и процессы, связанные со злокачественной трансформацией [52, 53].

Экспериментальные модели озоновой экспозиции *in vitro*

Пионерские исследования 60-х годов, посвященные биологическим эффектам воздействия озона на культуры клеток с малигнантной трансформацией, пролили свет на цитотоксический характер его влияния, сопровождавшийся структурными нарушениями хромосомного аппарата. В 1962 году Fetner R.H. одним из первых исследовал влияние озона на бластотрансформированные клетки. Клеточная сублиния KB, которая представляет собой кератин-образующие клетки HeLa, инкубировалась в стандартных лабораторных условиях, а затем подвергалась обработке газовой смесью O₂/O₃ с содержанием озона 8 ppm (parts per million) на единицу объема кислорода в течение 5—10 минут [54]. Затем колонии реинкубировались в колхицин-содержащей среде в течение 24 часов и обрабатывались гипотоническим раствором и пропионовой кислотой. Благодаря проделанным манипуляциям клетки находились в метафазном состоянии перед изготовлением микропрепаратов [54]. В результате микрофотографирования препаратов были установлены хромосомные aberrации в виде хроматидных разрывов, которые отчетливо прослеживаются на микрофотографиях субметацентрической и метацентрической хромосом, представленных в публикации [54]. Повреждения генетического аппарата клеток представляли собой экспоненциальную функцию от озоновой экспозиции, согласуясь с концептуальными представлениями исследовательского коллектива, в соответствии с которыми альтернативные явления в хромосомах

зависят от концентрации свободных радикалов и их проникновения в ядро клетки [54]. Строго говоря, наблюдаемые эффекты воздействия озона носили дозозависимый характер [54]. Ранее Fetner R.H. показал бактерицидное действие озона на колонии *Escherichia coli* [55] и хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы бобового растения *Vicia faba* [56]. В этих работах была также отмечена дозозависимая степень выраженности бактерицидного и мутагенного действия озона.

В 1980 году в журнале «Science» были опубликованы результаты экспериментальной работы, которые пролили свет на антинеопластические свойства озона [56]. В качестве модельной системы были использованы культуры клеток аденокарциномы легких, аденокарциномы молочной железы, карциносаркомы матки и карциномы эндометрия [56]. Культура легочных диплоидных фибробластов человека выступала в роли контрольной среды. Воздух, содержащий озон в количестве 0,3—0,8 ppm, подавался в камеру с инкубируемыми клетками при температуре 37 °C в течение 8 дней [56]. В результате экспериментальной работы был установлен достоверный ингибирующий дозозависимый эффект озона на рост всех бластотрансформированных целлюлярных культур. При насыщении среды озонированным воздухом 0,3—0,5 ppm наблюдалась 40—60 % редукция культурального роста [56]. Бластотрансформированные культуры, получившие озонную экспозицию уровня 0,8 ppm в нагнетаемом воздухе, демонстрировали тенденцию к уменьшению роста более чем на 90 % [56]. В то же время линия нормальных фибробластов оставалась интактной в условиях экспозиции озонем в дозе 0,3—0,5 ppm с сохранением канонической морфологической структуры клеток и скоростью роста, соответствующей константным условиям [56]. Тем не менее, доза 0,8 ppm оказывала ингибирующее воздействие на рост нормальной культуры фибробластов [56]. После 14 пассажей культивирования колонии нормальных фибробластов при экспозиции в дозе 0,5 ppm было установлено, что клетки претерпевают морфологические изменения в виде вакуолизации,

а также градуальное замедление их митотической активности [3]. Описанные эффекты авторы исследования связали с клеточным старением нормальных фибробластов [3].

В 1987 году в Германии были продемонстрированы радиосенсибилизирующие эффекты озона на 4 клеточных линиях гинекологических опухолей. Исследование проводилось на культурах недифференцированной неклассифицированной овариальной карциномы, двух солидных овариальных аденокарцином и эндометриальной карциномы. В качестве контрольной группы были использованы кожные фибробласты [57]. После инкубирования целлюлярные культуры обрабатывались озонем в концентрациях 0,03 ppm, 0,1 ppm и 0,3 ppm и облучались изотопами ^{226}Ra , ^{192}Ir и ^{60}Co в 100 единицах активности Rd. В результате воздействия комбинации $^{226}\text{Ra} + \text{O}_3$ на контрольную группу из кожных фибробластов или ее отдельного облучения радием не было зарегистрировано цитотоксического эффекта [57]. Напротив, облучение иридием и кобальтом сопровождалось угнетением пролиферативной активности клеток контрольной группы [57]. Предварительная экспозиция озонем культуры эндометриальной карциномы с последующим облучением радием сопровождалась цитостатическим эффектом, а через две недели колония лизировалась [57]. В культурах клеток овариальной карциномы минимальная доза озона 0,03 ppm оказывала цитостатическое воздействие, в то время как в дозах 0,1 и 0,3 ppm озон проявлял цитотоксические свойства [57]. Облучение радием колоний овариальной карциномы демонстрировало цитостатический эффект, в то время как комбинация облучения радием и озона в минимальной дозе 0,03 ppm оказывало цитотоксическое влияние [57]. В результате исследования были установлены радиосенсибилизирующие свойства озона и его цитотоксические свойства при изолированном применении [57].

В 1990 году коллектив авторов из Института иммунологии и экспериментальной хирургии в г. Виттене (ФРГ) вырастили клеточные культуры из человеческих опухолей молочной железы,

колоректального рака и глиом, которые были резистентны к 5-фторурацилу [58]. Выращенные линии клеток, а также линия стволовых клеток ADC-612/86 претерпели изолированное воздействие озоном в концентрациях 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 ppm, а также его комбинацию с 5-фторурацилом в дозах 26 мкг/мл, 50 мкг/мл и 100 мкг/мл [58]. Таким образом, концепция, которая легла в основу этой серии экспериментов, заключалась в анализе эффектов воздействия озоном на химиорезистентность опухолевых культур [58]. Полученные данные свидетельствовали в пользу снижения резистентности к 5-фторурацилу в культурах рака молочной железы и колоректального рака, однако в случае с линией клеток глиомы подобный эффект не подтвердился [58]. После обработки культуральных сред озоном и 5-фторурацилом наблюдалось дозозависимое ингибирование роста колоний [58]. Зависимая от концентрации применяемых агентов степень ингибирования роста прослеживалась прямопропорциональным образом: чем в больших концентрациях озона и 5-фторурацила осуществлялась обработка сред, тем в большей степени угнеталась пролиферативная активность клеток [58].

В этом же году в Германии исследовалось влияние озона на культуру клеток из резецированной опухолевой ткани яичников [59]. Задача экспериментальной работы состояла в сравнении молекулярных эффектов кислородно-озоновой смеси на культуру опухолевых клеток и целлюлярную линию из нормальных яичников. В результате центрифугирования культуральных клеток были проанализированы биохимические показатели митохондриальной фракции и супернатанта. Установлены существенные изменения при экспозиции смесью O_2/O_3 опухолевых клеток в профилях детекции следующих молекул: снижение концентрации никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и увеличение концентрации 2,3-дифосфоглицерата в митохондриальной фракции; снижение концентрации лизолецитина в супернатанте [59]. Исследовательский коллектив связал снижение концентрации НАД в неопластической линии с так называемым эффектом Пастера. Его сущность

состоит в переключении утилизации глюкозы на аэробный путь в случае достаточной оксигенации клеток [59]. В то же время воздействие газовой смеси на культуру нормальных клеток не сопровождалось биохимическими изменениями. Таким образом, было установлено индуцирующее влияние кислородно-озоновой смеси на аэробный путь гликолиза в клетках с малигнантной трансформацией в связи с интенсификацией окислительного декарбоксилирования с участием НАД [59].

В 2007 году в *Journal of Cellular Physiology* были опубликованы результаты исследования, посвященного влиянию озона на клеточные линии человеческой нейробластомы SK-N-SH и SK-N-DZ [60]. В результате воздействия на клеточные среды оксигенированным и озонированным раствором воды наблюдалось ингибирование клеточного роста. В клетках SK-N-SH имели место нарушения клеточного цикла в постсинтетической (G2) фазе за счет изменения экспрессии циклин-зависимой киназы-1 (CDK1), циклина B1 и препятствий в их молекулярном взаимодействии [60]. В этих двух клеточных линиях отмечалось увеличение уровня белков Wee1 и CHK1. В клеточной линии SK-N-DZ апоптогенное влияние раствора было ассоциировано с активацией каспазы-3 и распадом комплекса Поли (АДФ-рибоза) полимеразы-1 (PARP) при участии проапоптогенного белка Bax. Комбинированное воздействие на линию SK-N-SH цисплатина, этопозиды и гемцитабина в сочетании с O_2/O_3 потенцировало эффект каждого из химиотерапевтических препаратов по сравнению с их изолированным применением [60]. Тем не менее, результаты обработки культур SK-N-DZ комбинацией химиотерапевтический препарат — O_2/O_3 не отличались улучшенными антинеопластическими эффектами от изолированного применения O_2/O_3 [60]. Таким образом, авторы исследования рассчитывают на потенцирование ингибирующего влияния на опухолевый рост за счет комбинирования химиотерапии с O_2/O_3 и их синергетических эффектах в отношении пролиферативной активности бластотрансформированных клеток [60].

В 2015 году на клеточной линии HeLa были продемонстрированы проапоптогенные свойства

озона за счет индукции синтеза фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), медиатора, оказывающего антитуморогенное влияние на некоторые опухоли [61, 62]. Широко известная культура клеток цервикальной карциномы HeLa инкубировалась во влажной среде при 37 °C и 5 % CO₂ до получения конфлюэнтного слоя культуры, после чего обрабатывалась трипсином и субкультивировалась [63]. Затем колонии обрабатывались газовой смесью различных концентраций озона, получаемых с помощью медицинского озонатора с возможностью контроля потока. Применяемые дозы озона соответствовали 10; 20; 30 и 40 мкг/мл [63]. После обработки озоном культуры возвращались в инкубатор, а эффекты озоновой экспозиции проверялись через разные интервалы времени: 0; 6; 18; 24; 30; 42 и 48 часов [63]. Методом иммуноферментного анализа было установлено, что после воздействия озона в клетках культур наблюдалось увеличение экспрессии TNF- α , запускавшего сигнальные пути апоптоза [63]. Концентрации TNF- α коррелировали с дозой озоновой экспозиции. Максимальная доза озона (40 мкг/мл) сопровождалась наиболее выраженным проапоптогенным влиянием [63].

В 2017 году появились данные, описывающие биологические эффекты озона на клеточную линию аденокарциномы толстой кишки человека HT29 [64]. Интерес исследовательской группы заключался в изучении возможного цитотоксического влияния озона на культуру аденокарциномы изолированно и в комбинации с химиотерапевтическими препаратами 5-фторурацилом и цисплатином [64]. После 24-часового инкубирования культуры обрабатывались озоном (10—50 мкг/мл); цисплатином (5—1500 μ M) изолированно или в комбинации с озоном в дозах 10; 20; 30 и 50 мкг/мл; 5-фторурацилом (0,1—100 μ M) изолированно или в комбинации с озоном в дозах 10; 20; 30 и 50 мкг/мл, после чего клетки снова инкубировались в течение 24 часов [64]. В конечном счете были получены данные о цитотоксических свойствах озона в отношении клеток аденокарциномы и их сенсibilизации к 5-фторурацилу и цисплатину [64]. Комбинированное воздействие озоном и хи-

миотерапевтическим препаратом потенцировало цитотоксический эффект на 15—20 %, степень выраженности которого коррелировало с дозой применяемых агентов [64].

В 2020 году исследовательская группа из Италии получила данные о синергизме каннабидиола и смеси O₂/O₃ в отношении цитотоксического эффекта на клеточные линии аденокарциномы протока панкреатической железы PANC-1 и MiaPaCa-2 [65]. Преинкубация культур проводилась в нормоксических условиях в течение 24 часов, после чего чашки помещались в гипоксический инкубатор и обрабатывались смесью O₂/O₃ в течение 30 минут. Затем культуры возвращали в условия нормоксической инкубации (37 °C, 5 % CO₂ и влажностью 95 %) на 6 часов [65]. Цикл повторялся еще один раз для достижения двукратной экспозиции смесью газов, после чего среды инкубировались в стандартных условиях в течение 1—3 дней и в них добавляли каннабидиол, а также химиотерапевтические препараты гемцитабин или паклитаксел в различных дозах [65]. Было установлено, что изолированная обработка сред каннабидиолом или смесью O₂/O₃ значительно снижала жизнеспособность культуральных клеток и угнетала рост культуры [65]. В отношении комбинаций O₂/O₃ + гемцитабин + каннабидиол и O₂/O₃ + паклитаксел + каннабидиол были получены следующие сведения [65]. Как в линии PANC-1, так и в линии MiaPaCa-2 был достигнут значительный циторедуктивный эффект, который в наибольшей степени был выражен в последней [65]. Жизнеспособность клеток MiaPaCa-2 после обработки O₂/O₃ + гемцитабин (100 μ M) + каннабидиол (25 μ M) снизилась на \approx 95 % через 48 часов [65]. Авторы исследования заключили, что каннабидиол в сочетании с O₂/O₃ сенсibilизирует культуры к гемцитабину и паклитакселу [65].

В недавней экспериментальной работе, опубликованной в журнале “Annals of Translational Medicine” в 2021 году, было показано проапоптогенное влияние озона на линию клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека BEL7402 и SMMC7721 [66]. Клеточные культуры получали

озоновую экспозицию в дозах 5; 10; 15; 20; 30 и 40 мкг/мл, а затем инкубировались в течение 24; 36 и 48 часов, после чего цитотоксический эффект озона оценивался с использованием диагностической системы выявления живых клеток ССК-8, которая окрашивает жизнеспособные клеточные структуры в оранжевый цвет [66]. В результате была установлена редукция пролиферативной активности клеток от 50 до 80 %, зависящая от дозы. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) составило 4,867 мкг/мл [66]. С помощью набора красителей Акридина оранжевого/этидиум бромид (АО/ЕВ) был идентифицирован достоверный проапоптотический эффект озона на культуры, по сравнению с контрольной группой не получавшей экспозицию [66]. Методом проточной цитометрии был установлен факт остановки клеточного цикла в синтетической фазе митоза [66]. Микрокопирование препаратов, содержащих клетки, которые обрабатывались озоном, выявило их морфологические изменения, состоящие в изменениях формы клеток и ядра [66]. Озонированные клетки BEL7402 демонстрировали изменения в поляризации митохондриальных мембран и накапливали АФК [66]. Кроме того, методом вестерн-блоттинга были отмечены изменения протеома опухолевых клеток с увеличением экспрессии цитохрома С, каспазы-3, каспазы-9, p-JNK, диссоциированных комплексов поли(АДФ-рибоза)-полимераз и снижение синтеза BCL-2 [66].

В последние годы все больший исследовательский интерес к себе приковывают перспективы использования в терапевтических целях холодной плазмы (Non-thermal plasma, cold atmospheric plasma), технологии которой имеют высокий биомедицинский потенциал [67, 68]. Плазма представляет собой одно из четырех классических агрегатных состояний материи (наряду с жидким, твердым и газообразным) [69] и, по существу, является квазинейтральной ионизированной газообразной средой, которая содержит в себе заряженные частицы, в том числе ионы; свободные электроны; электронно-возбужденные атомы и молекулы,

включая озон; позитивно заряженные частицы, фотоны и другие [70, 71]. В череде экспериментальных работ на клеточных культурах был установлен высокий туморицидный потенциал холодной плазмы, который во многом обусловлен за счет присутствующего в ней озона и других АФК, а также азота [72]. Анализ эффектов обработки холодной плазмой клеточной линии цервикальной карциномы HeLa показал накопление АФК и азота в экстрацеллюлярном компоненте среды с последующей интернализацией этих высоко реакционноспособных агентов в цитоплазму и митохондрии, где они аккумулировались, индуцируя изменение поляризации митохондриальных мембран и активацию сигнальных каскадов апоптоза с-Jun NH₂-терминальной киназой (JNK) и p38 [72]. Воздействие гелиевой и воздушной плазм, а также изолированной озоновой экспозиции на клеточную линию глиомы C6 оказывала цитотоксический эффект с явлениями дезинтеграции цитомембран и лизосом, а также интрацеллюлярной и интрамитохондриальной аккумуляции реактивных форм кислорода [73]. В культурах был идентифицирован маркер раннего апоптоза фосфатидилсерин и некритизированные клетки [73]. Получены данные об инициации апоптоза через сигнальный каскад ERK1/2/MAPK в клетках глиобластомы T98G при воздействии холодной плазмы [74]. Роль озона в контексте антинеопластического действия плазмы продемонстрирована Mokhtari и соавторами в 2018 году на клеточных линиях рака молочной железы SKBR3 и MCF7; рака поджелудочной железы ASPC-1; аденокарциномы легких A-549; остеосаркомы G-292 и карциномы толстой кишки SW742 [75]. Угнетающее воздействие плазмы на рост клеточных культур подтверждено на всех шести линиях. В основе ингибирующего эффекта лежало присутствие озона в среде [75]. Наиболее подверженными к действию плазмы оказались клетки SKBR3 и MCF7 (рак молочной железы), а наиболее резистентными — SW742 (карцинома толстой кишки). Выраженность ингибирующего эффекта на рост колонии зависела от времени экспозиции [75].

Еще одним свидетельством сенсibiliзирующих свойств озона к химиотерапевтическому агенту стало изучение комбинации доксорубицина и озона на клеточной линии MCF-7, фенотипически соответствующей клеткам опухоли молочной железы люминального А подтипа. В 2022 году Karagulle и соавторы продемонстрировали сенсibiliзирующее влияние озона к доксорубицину в качестве адьювантного агента в условиях последовательной коинкубации. Сначала культуры инкубировались в среде, насыщенной доксорубицином в течение суток в дозовом диапазоне (1—50 мкмоль/л) при температуре 37 °С с последующей инкубацией в среде, обогащенной озоном с концентрацией 30 мкг/мл [76]. В конечном счете был достоверно установлен факт увеличения цитотоксического эффекта комбинации доксорубицина с озоном в дозозависимой манере. Анализ жизнеспособности бластотрансформированных клеток методом МТТ-теста выявил ее снижение на 70 % по сравнению с контрольной группой при концентрации доксорубицина, соответствующей 50 мкмоль/л. Методом проточной цитометрии было установлено, что доксорубицин в комбинации с озоном оказывает более выраженное проапоптогенное воздействие на клетки MCF-7, по сравнению с инкубацией в условиях изолированного применения доксорубицина. Кроме того, иммуногистохимическими методами детектировалась экспрессия таких биомаркеров, как матриксная металлопротеиназа –2 и 9 (ММП), которым в последние годы вменяется прогностическая роль при раке молочной железы. Упомянутые ММП относятся к группе цинковых эндопептидаз, каталитическая функция которых связана с декомпозицией структур экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран, что вносит существенный вклад в метастазирование различных злокачественных опухолей, в том числе и рака молочной железы [76, 77].

В рамках экспериментальной работы Karagulle O.O. и коллег было продемонстрировано следующее: собственно доксорубицин не оказывал влияния на экспрессию опухолевыми клетками металлопротеиназ, в то время как сочетание

этого химиотерапевтического препарата с озоном в значительной степени способствовало снижению синтеза ММП-2 и ММП-9 [78]. Авторы работы, помимо всего прочего, изучили эффекты доксорубицина отдельно, а также его комбинацию с озоном на неопухолевую линию клеток L989, являющуюся дериватом мышечных фибробластов [78]. В результате были сделаны любопытные выводы, связанные с цитопротективными свойствами озона. Инкубация линии L989 в среде с доксорубицином индуцировала цитотоксический эффект последнего, в то время как комбинированная среда с озоном препятствовала снижению жизнеспособности клеток [78]. В этом же году были опубликованы результаты исследования Yildirim A.G. и коллег, посвященные изучению эффектов озонирования клеточной культуры MDA-MB-231, которая является разновидностью трижды негативного рака молочной железы. История линии MDA-MB-231 берет свое начало в 1973 году, когда у 51-летней больной, перенесшей радикальную мастэктомию в 1969 году, были выделены и культивированы клетки плеврального выпота [79, 80]. При этом пациентка получила курс полихимиотерапии по схеме циклофосфамид + адриамицин + аметоптерин за три недели до вмешательства в плевральную полость с дальнейшей культивацией вышеупомянутой линии [79, 80]. Характерной цитогенетической особенностью клеток MDA-MB-231 является анеуплоидия со средним количеством хромосом, стремящимся к триплоидному набору в диапазоне 60—70. В дальнейших исследованиях с развитием иммуногистохимических методов в патоморфологии было установлено, что культура MDA-MB-231 является разновидностью трижды негативного рака молочной железы [79, 80]. Yildirim A.G. и соавторы инкубировали вышеупомянутую линию в течение трех суток с ежедневной обработкой культур озонированным изотоническим раствором хлорида натрия тремя вариациями доз — 5, 10 и 20 мкг/мл в соответствии с исследуемыми группами [81]. При этом контрольная культура была интактной, в отношении которой не применялась обработка озонированным раствором [81]. Анализ полученных данных показал достоверное снижение жизнеспособности клеток

MDA-MB-231, пик которой зарегистрирован через 72 часа в группе с максимальной экспериментальной концентрацией 20 мкг/мл [81]. Коллектив авторов также изучил миграционные способности бластотрансформированных клеток методом «scratch assay», сущность которого заключается в оценке характера и динамики закрытия так называемой «искусственной раны» в монослое культуры [81]. Полученные сведения указывают на то, что тенденция к миграции опухолевых клеток снижается в результате озонирования, причем в наибольшей степени закрытие «раны» ингибируется в максимальной дозе озона (20 мкг/мл) [81].

Данные транскриптомики, полученные методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, показали, что озонная экспозиция инициирует экспрессию таких генов, как p53, CASP9 и CASP3. В тоже время ген BCL2, роль которого состоит в ингибировании апоптоза [81], демонстрирует снижение экспрессии, степень которой примерно одинакова во всем диапазоне применяемых концентраций озона [82].

В последние годы в контексте разработки эффективных подходов к лечению трижды негативного рака молочной железы значительная роль отводится наноструктурам [83]. Так, Song и соавторы представили релизинг-систему, основанную на озон-содержащих наночастицах, из которых высвобождение озона контролируется микроволнами [83]. Ключевыми результатами исследования стало обнаружение достоверных синергетических противоопухолевых свойств разработанной наносистемы-носителя озона с анти-PD-1 антителами в моделях трижды негативного рака молочной железы как *in vitro*, так и *in vivo* [83].

Zheng D. и коллеги провели исследования свойств липосомо-подобных наноструктур, содержащих озон, в ходе которых установили их многообещающий антинеопластический потенциал. В ходе изучения липосомальных наносистем был установлен их синергизм с ионизирующим излучением, заключающийся в индукции апоптоза в клетках с опухолевой трансформацией как *in vitro*, так и *in vivo* [84, 85]. Исследовательским коллективом было изучено биораспределение озон-содержащих наноструктур на клеточном уровне методом флюоресцентной микроскопии — в цитозоле

отчетливо визуализировались меченые частицы, что наглядно демонстрирует способность данных наночастиц к интернализации в культуральные клетки мышиной карциномы молочной железы (линия 4T1), человеческой метастатической протоковой карциномы молочной железы (линия BT549) и человеческой метастатической аденокарциномы из плеврального выпота (линия MDA-468) [84, 85]. Авторы отмечают сенсibilизацию культуральных клеток к ионизирующему излучению в результате применения озонсодержащих наноструктур, увеличение степени инфильтрации микроокружения опухолей иммунокомпетентными клетками, а также ингибирование роста первичных опухолей и метастатических фокусов на моделях *in vivo* [84, 85].

В декабре 2023 года в журнале «Tissue and Cell» была опубликована работа Karagülle A.G. и соавторов, в рамках которой осуществлялось изучение эффектов озонотерапии на клеточной линии BT-474, которые являются дериватами клеток рака молочной железы люминального В подтипа [86, 87]. Концептуальной основой исследования стало изучение возможности сенсibilизации озном трансформированных клеток к химиотерапевтическому агенту из группы антрациклиновых антибиотиков доксорубину. В качестве контрольной клеточной культуры авторы использовали линию L929, фенотипически представляющую собой фибробласты [86, 87]. Применяя комбинацию доксорубина с озном в различных дозах, Karagülle O.O. и коллеги сообщают об увеличении проапоптогенного влияния доксорубина в комбинации с озном на опухолевую линию BT-474, в то время как в культуре нормальных фибробластов увеличение апоптоза не отмечалось. Вышеуказанная комбинация терапевтических средств снижала жизнеспособность опухолевых клеток BT-474 и, напротив, увеличивала таковую в случае с линией L929 [86, 87]. Таким образом, авторы работы заключили, что комбинация доксорубина с озном увеличивает антипролиферативное и проапоптогенное влияние первого на опухолевые клетки, в то время как цитотоксичность доксорубина в отношении нормальных клеток нивелируется озном [86, 87].

Эффекты, оказываемые озоном

№ п/п	Эффекты	Описание (модель/воздействие)	Ссылка
1.	Прооксидантные свойства	Улучшение микроциркуляции, стимуляция репаративных процессов, увеличение оксигенации тканей, снижение HIF-1α	[38–40]
2.	Умеренный окислительный стресс	Развитие цитопротективных реакций и нормализации редокс-статуса клеток, через активацию экспрессии супероксиддисмутазы, глутатион пероксидазы, глутатион S-трансферазы, каталазы, гемоксигеназы-1, НАДФН-хинон-оксидредуктазы, ферментов II фазы лекарственного метаболизма и других белков, влияющих на гомеостаз клетки	[52, 53]
3.	Повреждение генетического аппарата	Модель: кератин-образующие клетки HeLa; Воздействие: газовой смесью O ₂ /O ₃ с содержанием озона 8 ppm	[54]
4.	Антинеопластические свойства	Модель: культура клеток аденокарциномы легких, аденокарциномы молочной железы, карциносаркомы матки и карциномы эндометрия; Воздействие: воздух, содержащий озон в количестве 0,3–0,8 ppm в течение 8 дней. Линия нормальных фибробластов оставалась интактной в условиях экспозиции озоном в дозе 0,3–0,5 ppm.	[56]
5.	Радиосенсибилизирующие эффекты	Модель: культура клеток недифференцированной неклассифицированной овариальной карциномы, двух солидных овариальных аденокарцином и эндометриальной карциномы; Воздействие: озон в концентрациях 0,03 ppm, 0,1 ppm и 0,3 ppm и облучались изотопами ²²⁶ Ra, ¹⁹² Ir и ⁶⁰ Co в 100 единицах активности Rd	[57]
6.	Цитостатический эффект	Модель: культура клеток овариальной карциномы, воздействие: озон 0,03 ppm	[57]
7.	Цитопротективные свойства	Проявляются за счет регуляции металлопротеиназ, снижение синтеза ММП-2 и ММП-9	[78]
8.	Цитотоксический эффект	Модель: культура клеток овариальной карциномы; воздействие: озон 0,1 и 0,3 ppm; Модель: клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека BEL7402 и SMMC7721. Воздействие: озон 5; 10; 15; 20; 30 и 40 мкг/мл, инкубация в течение 24; 36 и 48 часов; Модель: клетки клеточной линии MCF-7, фенотипически соответствующей клеткам опухоли молочной железы люминального А подтипа. Воздействие: инкубация в среде, насыщенной доксорубицином в течение суток в дозовом диапазоне (1–50 мкмоль/л) при температуре 37 °С с последующей инкубацией в среде, обогащенной озоном с концентрацией 30 мкг/мл.	[57, 66, 76]
9.	Проапоптогенные свойства	За счёт индукции синтеза фактора некроза опухоли альфа (TNF-α), оказывающего антитуморогенное влияние на некоторые опухоли; Модель: культура клеток цервикальной карциномы HeLa; Воздействие: озон в концентрации 0; 20; 30 и 40 мкг/мл. Эффекты озоновой экспозиции проверялись через разные интервалы времени: 0; 6; 18; 24; 30; 42 и 48 часов. Максимальная доза озона (40 мкг/мл) сопровождалась наиболее выраженным проапоптогенным влиянием.	[61–63]
10.	Влияние на химиорезистентность	Модель: клетки опухолей молочной железы, колоректального рака и глиом, резистентные к 5-фторурацилу; Воздействие: озоном в концентрациях 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 ppm, а также его комбинацию с 5-фторурацилом в дозах 26 мкг/мл, 50 мкг/мл и 100 мкг/мл. Снижение резистентности к 5-фторурацилу имеет дозозависимый эффект в культурах рака молочной железы и колоректального рака, в случае с линией клеток глиомы подобный эффект не подтвердился; выявлена сенсбилизация озоном к 5-фторурацилу и цисплатину.	[58–64]

Table

Ozone exposition effects			
№	Effects	Description (model/treatment)	References
1.	Pro-oxidant properties	Ozone improves microcirculation, stimulates reparative processes, increases tissue oxygenation and downregulates HIF-1 α	[38–40]
2.	Mild oxidative stress	Ozone induces cytoprotective reactions and normalize the redox status of cells via upregulation of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S transferase, catalase, heme oxygenase I, NADH: ubiquinone oxidoreductase, phase II drug metabolizing enzymes and other proteins responsible for cell homeostasis	[52, 53]
3.	DNA damage	Model: Keratin-positive HeLa cells Treatment: O ₂ /O ₃ gas mixture with 8 ppm dose of ozone	[54]
4.	Antineoplastic properties	Model: lung and breast adenocarcinoma lines; carcinosarcoma of uterus line; endometrial carcinoma line Treatment: ozone exposition in dose of 0.3–0.8 ppm	[56]
5.	Effects of ozone on radioresistant cell lines	Model: cell line of undifferentiated and unclassified ovarian carcinoma; 2 solid ovarian adenocarcinoma; endometrial carcinoma Treatment: ozone exposition in dose of 0.03, 0.1 and 0.3 ppm with irradiation by ²²⁶ Ra, ¹⁹² Ir and ⁶⁰ Co (100 Rd units)	[57]
6.	Cytostatic effect	Model: cell culture of ovarian carcinoma. Treatment: ozone exposure in dose of 0.03 ppm	[57]
7.	Cytoprotective properties	Metalloproteinase regulation; downregulation of MMP-2 and MMP-9	[78]
8.	Cytotoxic effect	Model: cell culture of ovarian carcinoma. Treatment: ozone exposure in dose of 0.1 and 0.3 ppm; Model: hepatocellular carcinoma cell lines BEL7402 and SMMC7721. Treatment: ozone exposure in dose of 5, 10, 15, 20, 30 and 40 μ g/ml with further incubation within 24, 36 and 48 hours; Model: the MCF-7 line which derives from cells of breast cancer of luminal A subtype. Treatment: incubation with doxorubicin in different doses (10–50 μ mol/L), accompanied by ozone in doze of 30 μ g/ml.	[57, 66, 76]
9.	Proapoptotic effect	Ozone exhibits proapoptotic effect via TNF- α induction, which, in turn, shares antitumorigenic properties in several malignant tumors. Model: HeLa cell line (cervical carcinoma). Treatment: ozone exposure at different concentrations 0, 20, 30 and 40 μ g/ml. The effects of exposure have been verified after 0, 16, 18, 24, 30, 42 and 48 hours of incubation. The most pronounced effect was observed in the case of maximal dose (40 μ g/ml).	[61–63]
10.	Effects of ozone on chemoresistant cell lines	Model: 5-fluorouracil-resistant cells of breast cancer, colorectal cancer and gliomas. Treatment: ozone exposure in concentrations of 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 ppm alone and combined with 5-fluorouracil in dose of 26 μ g/ml, 50 μ g/ml and 100 μ g/ml. Dose-dependent reduction of chemoresistance was observed in breast and colorectal cancer cell lines, whereas lack of reduction of chemoresistance was evidenced in glioma lines.	[58, 64]

Животные модели озоновой экспозиции

В начале 70-х годов стали появляться данные о радиосенсибилизирующих свойствах озона в отношении экспериментальных опухолей лабораторных

животных [88—91]. В 1975 году Hernuss P. и соавторы, основываясь на результатах собственных исследований на животных моделях, предложили озон в качестве адъювантного компонента радиоте-

рапии в онкогинекологии [92]. В 1976 Grundner H.G. и соавторы выполнили череду экспериментальных работ, в ходе которых исследовались эффекты озона в комбинации с радиотерапией при канцероматозе брюшины лабораторных мышей. В двух первых экспериментах не было отмечено потенцирующего влияния озона при внутривенном введении и перитонеальных инсуффляциях на ионизирующее излучение [93, 94]. Тем не менее, этот же коллектив авторов в своей третьей работе, опубликованной в том же году, описал ингибирующее действие озона на культуру асцитных клеток Эрлиха, которое было наиболее выраженным в комбинации с радиотерапией [95].

В 2008 году было продемонстрировано анти-неопластическое влияние кислородно-озоновой смеси на животной модели сквамозной карциномы головы и шеи. Ксенографтная модель новообразования была получена путем инокуляции суспензии высоко агрессивных опухолевых клеток VX2 в количестве $1-2 \times 10^7$ в дорсальную поверхность средней трети правого уха новозеландских белых кроликов [96]. Инициация формирования опухоли и ее рост наблюдался в течение 14 дней, когда средний размер сформировавшихся опухолей составил $6,082 \text{ мм}^3 \pm 515 \text{ мм}^3$ [96]. В исследовании принимали участие 42 животных, которые были разделены случайным образом на 3 группы. Животные из первой группы ($n=14$) получали терапию O_3/O_2 ; в отношении кроликов из второй группы ($n=14$) применялась оксигенотерапия; третья группа ($n=14$) стала контрольной в отсутствии газовых инсуффляций. Животным из первой и второй групп осуществлялись интраперитонеальные инсуффляции O_3/O_2 и O_2 соответственно [96]. В результате интраперитонеальных инсуффляций O_3/O_2 в первой группе наблюдалась 7/14 выживаемость и отмечалась полная регрессия опухоли у 6 животных в отсутствие регионарных и отдаленных метастазов. Во второй группе с интраперитонеальной инсуффляцией кислорода выживаемость составляла 3/13 [96]. Один кролик погиб накануне предстоявшей оксигенотерапии в силу неизвестных причин. В двух случаях из трех выживших животных процесс нахо-

дился в состоянии ремиссии [96]. В третьей группе выжило лишь одно животное, в случае с которым установлена спонтанная регрессия опухоли. Инсуффляция кислорода или кислородно-озоновой смеси не сопровождалась побочными реакциями и не отражалась на стандартных параметрах крови [96]. Кроме того, животные из первой группы после интраперитонеальных инсуффляций демонстрировали толерантность к реимплантации опухолевых клеток, однако иммуносупрессивная терапия комбинацией дексаметазона и циклоспорина А вновь делала возможной перевиваемость опухоли [96].

В этом же году в журнале «Ozone: Science & Engineering» вышла работа, в которой были опубликованы данные о влиянии озона на кинетику диссеминации опухолевых клеток на метастатической модели [97]. Лабораторным мышам осуществлялась инокуляция клеток асцитной опухоли Эрлиха и клеток саркомы 37 в ретробульбарное кровеносное сплетение. После имплантации опухолевых клеток животным проводилась озонотерапия (1 мл) путем ректальных аппликаций в разных дозах O_3 : 9, 26 и 42 мг/л в течение 12 сеансов. Было установлено, что степень гематогенной диссеминации опухоли на фоне озонотерапии снижалась дозозависимым образом, по сравнению с контрольной группой, в отношении которой лечение не проводилось [97]. В случае с дозой 9 мг/л отмечалось снижение степени диссеминации в 1,75 раза; доза 26 мг/л и 42 мг/л демонстрировали ее снижение в 2,3 и 7 раз соответственно [97]. В другом эксперименте озонотерапия предшествовала инокуляции мышам клеток легочной карциномы Льюиса. На протяжении 15 дней животным осуществлялось интраперитонеальное введение озона в дозах 4; 11; 20 и 35 мг/л в объеме 80 мл/кг [97]. Через 24 часа с момента последней инъекции мышам подкожно вводился 1 миллион клеток легочной карциномы Льюиса, после чего производилась оценка динамики развития опухоли. Наилучшие результаты озонотерапии отмечены в минимальной дозе, соответствовавшей 4 мг/мл, при которой через 23 дня наблюдался наименьший объем опухоли $\approx 2300 \text{ мм}^3$, по сравнению с 11 мг/мл ($\approx 3000 \text{ мм}^3$), 20 мг/мл (4500 мм^3),

35 мг/мл ($\approx 3000 \text{ мм}^3$) и контрольной группой $\approx (6000 \text{ мм}^3)$ [97]. Экспериментальная серия предвзяла III фазу контролируемого рандомизированного клинического исследования на пациентах с раком предстательной железы, в рамках которого больным, проходившим радиотерапию ^{60}Co , также производились ректальные инсуффляции озона. Применение озона способствовало снижению побочных эффектов и уровня PSA в крови [97].

В 2014 году в журнале «Clinical Cancer Research» были опубликованы результаты исследования, подтверждающие антинеопластический эффект интраперитонеального введения кислородно-озоновой смеси в ксенографтной модели сквамозной карциномы головы и шеи, описанный Schulz и соавторами в 2008 году [98—100]. Индукция новообразования осуществлялась введением суспензии папилломавирус-ассоциированных VX2 клеток в уши новозеландских белых кроликов. В группе животных, которым вводилась кислородно-озоновая смесь, наблюдались изменения в кинетике опухолевого роста в сторону уменьшения объема и регрессии. После инокуляции малигнанных клеток пиковый объем новообразования приходился на 13 ± 2 день, составляя $\approx 2500 \text{ мм}^3$ [98—100]. Интраперитонеальная озонотерапия редуцировала рост опухоли, снижала ее объем до $\approx 500 \text{ мм}^3$ и препятствовала метастазированию. В группе животных, которым вводился озон, наблюдалось увеличение лейкоцитов в крови, а также увеличение степени инфильтрации опухоли CD3⁺ Т-лимфоцитами. Известно, что инфильтрация опухоли CD3⁺ и CD8⁺ клетками носит положительный прогностический характер и отражает противоопухолевый иммунный статус [98—100]. В рамках исследования был выполнен анализ экспрессии 84 генов, отражающих адаптивные изменения в микроокружении опухоли, кинетику воспалительных реакций и регуляцию различных звеньев иммунной системы [101].

В 2015 году Kızıltan H.S. и соавторы продемонстрировали эффективность комбинированной радио- и озонотерапии на экспериментальной модели канцероматоза брюшины. Швейцарским мышам-альбиносам ($n = 60$) произвели интрапери-

тонеальную инокуляцию 1.5×10^6 клеток асцитной карциномы Эрлиха [102]. Животные были разделены на 6 групп. Мышам из первой и второй групп выполнялись интраперитонеальные аппликации 1 мл кислородно-озоновой смесью (95 % O_2 и 5 % O_3) в течение 10 дней в дозе 20 и 40 мг/л соответственно. В отношении третьей группы осуществлялась радиотерапия ^{60}Co с фракционированием 200 сГр в день в течение 5 суток. Животным из четвертой и пятой групп проводилась радиотерапия в таком же режиме, а также озонотерапия методом интраперитонеальных аппликаций 1 мл в течение 10 дней в дозе 20 и 40 мг/л соответственно [102]. Шестая группа получала интраперитонеальную инокуляцию 0,9 % физиологического раствора в течение 10 дней [102]. Наилучшую выживаемость продемонстрировали мыши из пятой группы, получавшие комбинированную терапию ионизирующим излучением и озоном в максимальной дозе (40 мг/л) [102]. Выживаемость в течение 16 дней составила 80 %, в то время как в контрольной группе живых особей не осталось. В группах 1 (озон 20 мг/л) и 2 (озон 40 мг/л) выживаемость на 16 сутки составила 20 и 50 % соответственно, а в группе 3 с радиотерапией — 70 % [102]. Таким образом, комбинированная радиотерапия с озоном в высокой дозе продемонстрировала наилучший показатель выживаемости [102]. Было установлено, что изолированная озонотерапия или применение озона в сочетании с ионизирующим излучением оказывает редуцирующее воздействие на выраженность отека и обладает антинеопластическими свойствами [102].

В другом исследовании были показаны эффекты озонотерапии при внутриопухолевом введении озонированной воды. В качестве модельной системы использовалась инбредная линия лабораторных мышей самок BALB/c, которым были перевиты клетки карциномы прямой кишки RCB2657 (1×10^6) в дорсальную поверхность тела подкожно [103]. Позитивная индукция опухоли и достижение ей линейных размеров 7—10 мм являлись критерием отбора особей для экспериментальной работы. Животные были разделены на шесть групп:

1) интратуморальное введение озонированной воды с дозой озона 20,8 ммоль/л; 2) интратуморальное введение озонированной воды с дозой озона 41,6 ммоль/л; 3) интратуморальное введение озонированной воды с дозой озона 104 ммоль/л; 4) интратуморальное введение озонированной воды с дозой озона 208 ммоль/л; 5) группа животных, в отношении которых лечение не проводилось; 6) интратуморальное введение стерильной дистиллированной воды [103].

Было установлено, что внутриопухолевое введение озонированной воды оказывает селективный некрозогенный эффект в отношении тканей с опухолевой трансформацией в отсутствие альтеррирующего воздействия на интактные ткани [103]. Озонированная вода препятствовала росту опухоли и индуцировала возникновение некротических фокусов. По мнению коллектива авторов, реализация биологических эффектов озонированной воды связана с генерацией АФК [103]. В 2018 году стали известны результаты исследования комбинированной радио- и озонотерапии, которая проводилась на животной модели с нитрохиолиновой индукцией злокачественного новообразования языка. Оксид нитрохиолина (4NQO) широко известен как мутагенный агент, способный инициировать канцерогенез, и часто применяющийся в животных моделях рака языка [104, 105]. В данном случае индукция канцерогенеза была основана на добавлении 4NQO в питьевую воду крыс. Самки крыс в количестве 36 штук были разделены на 5 групп [106]. Первая группа включала в себя крыс с раком языка, в отношении которых не осуществлялось терапевтических мероприятий [106]. Вторая группа состояла из особей, в отношении которых проводилась радиотерапия (^{60}Co , фракционирование 500 сГр в день в течение 4 дней). Третья группа была представлена животными, которые получили комбинированное лечение озоном (кислородно-озоновая смесь: 95 % O_2 , 5 % O_3 , 1 мл) и ионизирующим излучением (^{60}Co , фракционирование 500 сГр в день в течение 4 дней), крысы из четвертой — лишь озонотерапию (кислородно-озоновая смесь: 95 % O_2 , 5 % O_3 , 1 мл) [106]. Пятая группа (контрольная) состояла из здоро-

вых особей, которым была произведена ректальная инъекция 5 мл физиологического раствора. Результатом исследования стало очевидное преимущество комбинации радиотерапии и озона [106]. Группа животных, в отношении которых осуществлялось комбинированное лечение, продемонстрировала более длительную выживаемость и менее выраженную степень гистопатологических изменений в опухоли языка [106].

Клинические исследования озонотерапии

Одно из первых клинических исследований, посвященных биологическим эффектам озонотерапии, в лечении злокачественных новообразований было выполнено в 2004 году в Испании [107, 108]. Концептуальная основа работы заключалась в коррекции гипоксических явлений в микроокружении опухоли и увеличении степени ее оксигенации. Известно, что гипоксическое состояние бластотрансформированных клеток является одной из ведущих причин резистентности опухоли к ионизирующему излучению и химиотерапии [109—111]. Таким образом, исходя из гипотетической возможности нормализовать парциальное напряжение кислорода в микроокружении опухоли, Clavo В. и соавторы изучали возможности аутогемотрансфузии озонированной крови для реализации этой задачи [112]. Исследование проводилось на группе больных ($n=18$) с опухолями головы и шеи ($n=14$); онкогинекологической нозологией ($n=2$) и метастазами в костные структуры грудной клетки ($n=2$), которым осуществляли забор 200 мл венозной крови. Затем кровь смешивалась с 200 мл кислородно-озоновой смеси и трансфузировалась больным. Аутогемотрансфузия крови, обработанной газовой смесью, повторялась 3 раза [112]. Парциальное напряжение кислорода в опухоли регистрировалось путем размещения электродов pO_2 -гистографа внутрь. Результатом исследовательской работы стало увеличение парциального давления кислорода в опухолях с низкой степенью оксигенации. Тем не менее, в отношении новообразований, в которых значения парциального давления кислорода составляли выше среднего показателя,

наблюдался противоположный эффект, связанный со снижением pO_2 [112]. В качестве биохимических механизмов, объясняющих оксигенирующий потенциал озона, авторы исследования предлагают так называемый эффект Бора, сопровождающийся смещением кривой диссоциации оксигемоглобина вправо и высвобождением кислорода в тканях [112]. Несколькими месяцами позднее Clavo B. и соавторами были опубликованы данные о применении озона в качестве адъювантной терапии в лечении опухолей головы и шеи [113]. В течение трех лет авторы проводили компаративный анализ лечения 19 пациентов с нерезектабельными опухолями головы и шеи (стадия IV), которые были разделены на 2 группы: 1) больные, средний возраст которых составлял 54 года, с низкой степенью вовлеченности в процесс лимфатических узлов (8%), проходивших курсы химиорадиотерапии; 2) больные, средний возраст которых составлял 64 года, с большей степенью вовлеченности лимфатических узлов, худшим прогнозом, в отношении которых проводилась радиотерапия и озонотерапия аутогемотрансфузионно или методом ректальных инсуффляций [113]. Было установлено, что в группе больных с озонотерапией наблюдалось увеличение общей медианы выживаемости, которая составляла 8 месяцев по сравнению с первой группой (6 месяцев) [113].

В 2007 году была показана эффективность озонотерапии в лечении бисфосфонат-ассоциированного остеонекроза челюсти у больных со множественной миеломой. Отмена бисфосфонатов и 15-дневный курс лечения, включавший в себя антибиотикотерапию амоксициллином с клавулановой кислотой и метронидазолом в сочетании с аппликативной озонотерапией, улучшали результаты хирургического лечения [114].

В 2008 году Menéndez S. и соавторы в рамках III фазы контролируемого рандомизированного клинического исследования провели анализ эффективности радиотерапии интракапсулярной аденокарциномы простаты. Больные были разделены на 2 группы: 1) радиотерапия ^{60}Co ($n = 35$); 2) радиотерапия ^{60}Co + ректальные инсуффляции озона ($n = 35$). Авторы отметили меньшее количество побочных эффек-

тов радиотерапии в виде радиодерматита, цистита и проктита, а также снижение уровня PSA в крови во второй группе пациентов с озонотерапией [97].

В 2012 году коллективом авторов из Италии были опубликованы данные в журнале «European Journal of Integrative Medicine» о применении озонотерапии в лечении немелкоклеточного рака легкого [115]. Больные ($n=40$) были разделены на две группы. В отношении пациентов из первой группы ($n=20$) осуществлялась аутогемотерапия озонированной кровью с содержанием озона 30 мкг/мл^1 раз в неделю в течение 12 недель; подкожные инъекции 1 мл фитопрепарата омелы белой (*Viscum album*) трижды в неделю на протяжении 12 недель; химиотерапевтическое лечение согласно итальянским рекомендациям [115]. Вторая группа пациентов была контрольной ($n=20$) и получала химиотерапевтическое лечение. Через 12 недель в первой группе наблюдалось улучшение качества жизни и снижение маркеров оксидативного стресса в крови [115].

В недавней работе Megele R. и соавторы приводят серию клинических случаев применения интратуморальной терапии O_2/O_3 в лечении больных глиобластомой, отмечая увеличение выживаемости больных [116].

Выводы

На многочисленных культурах опухолевых клеток, являющихся дериватами эпителиальных и мезенхимальных опухолей, глиом, неоплазмы смешанного гистогенеза (карциносаркома эндометрия), животных моделях (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*), а также в ходе клинических исследований (больные с опухолями головы и шеи, онкогинекологической нозологией, метастазами в костные структуры грудной клетки, множественной миеломой, раком простаты, немелкоклеточным раком легкого и глиобластомой) установлены положительные биологические эффекты озонотерапии, связанные с возможностью озона оказывать цитотоксическое и цитостатическое влияние на опухоли различного гистогенеза и локализаций,

а также сенсibilизировать бластотрансформированные клетки к ионизирующему излучению и химиотерапевтическим агентам. Важным выводом по итогам обзора мировой литературы в контексте клинических исследований озонотерапии злокачественных новообразований является отсутствие значимых ограничений по использованию метода в виде токсичности и наличия побочных эффектов.

Библиографический список/References

- Larrañaga MD, Lewis RJ, Sr and Lewis, RA. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary, Sixteenth Edition*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 2016. 1547 p. doi:10.1002/9781119312468.ch1
- Tanaka T, Morino Y. Coriolis interaction and anharmonic potential function of ozone from the microwave spectra in the excited vibrational states. *Journal of Molecular Spectroscopy*. 1970;33(3):538—551. doi:10.1016/0022-2852(70)90148-7.
- Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science*. 1980;209(4459):931—933. doi:10.1126/science.7403859
- Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):66—70. doi:10.4103/0976-9668.82319
- Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, Nedaeinia R, Haghjooy Javanmard S, Taherian M, Ahmadlou M, Salehi R, Sadeghi B, Manian M. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):62.
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*. 2004;9(5):4—9. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-4
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932—936. doi:10.1038/nature04478
- Wigerup C, Pählman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther*. 2016;164:152—169. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.009
- Nakayama K, Kataoka N. Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3278. doi:10.3390/ijms20133278
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*. 2007;2007(407): cm8.
- Kaneko T, Dehari H, Sasaki T, Igarashi T, Ogi K, Okamoto JY, Kawata M, Kobayashi JI, Miyazaki A, Nakamori K, Hiratsuka H. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is regulated by phosphorylation of GSK3- β via PI3 K/Akt signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2016;122(6):719—730. doi: 10.1016/j.oooo.2016.06.008.
- Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncol*. 2018;80:23—32. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.03.004
- Nurwidya F, Takahashi F, Kobayashi I, Murakami A, Kato M, Minakata K, Nara T, Hashimoto M, Yagishita S, Baskoro H, Hidayat M, Shimada N, Takahashi K. Treatment with insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455(3—4):332—338. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.014
- Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front Oncol*. 2020;10:486.
- Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncology*. 2018;80:23—32. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.03.004
- Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts [retracted in: *J Biol Chem*. 2023;299(9):105144. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105144]. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10819—10829. doi:10.1074/jbc.M112.442939
- Gilkes DM, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res*. 2013;11(5):456—466. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0629
- Sada M, Ohuchida K, Horioka K, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M. Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. *Cancer Lett*. 2016;372(2):210—218. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.016
- Eckert AW, Wickenhauser C, Salins PC, Kappler M, Bukur J, Seliger B. Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2016;14:85. doi:10.1186/s12967-016-0828-6
- Vito A, El-Sayes N, Mossman K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*. 2020;9(4):992. doi:10.3390/cells9040992
- Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, Terry S, Kieda C, Janji B, Chouaib S. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(9): C569—C579. doi:10.1152/ajpcell.00207.2015
- Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83—92. doi:10.2147/HP.S93413
- Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1—15. doi:10.3109/10409238.2013.838205
- Yasuda H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer. *Nitric Oxide*. 2008;19(2):205—216. doi:10.1016/j.niox.2008.04.026
- Samanta D, Prabhakar NR, Semenza GL. Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017;9(4):10.1002/wsbm.1382. doi:10.1002/wsbm.1382
- Wang H, Jiang H, Van De Gucht M, De Ridder M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):112.

27. Begg K, Tavassoli M. Inside the hypoxic tumour: reprogramming of the DDR and radioresistance. *Cell Death Discov.* 2020;6:77. doi:10.1038/s41420-020-00311-0.
28. De Ridder M, Verellen D, Verovski V, Storme G. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2008;19(2):164—169. doi:10.1016/j.niox.2008.04.015
29. Kabakov AE, Yakimova AO. Hypoxia-Induced Cancer Cell Responses Driving Radioresistance of Hypoxic Tumors: Approaches to Targeting and Radiosensitizing. *Cancers (Basel).* 2021;13(5):1102. doi:10.3390/cancers13051102
30. Horsman MR, Overgaard J. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *J Radiat Res.* 2016;57. doi:10.1093/jrr/rrw007
31. Clarke RH, Moosa S, Anzivino M, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, Nedaenia R, Haghjooy Javanmard S, Taherian M, Ahmadlou M, Salehi R, Sadeghi B, Manian M. Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and *in vitro* models of tumor hypoxia. *PLoS One.* 2014;9(10): e111199. doi:10.1371/journal.pone.0111199
32. Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8(7):790—797. doi:10.2174/187152008785914798
33. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(4):297—307. doi:10.1016/s0305-7372(03)00003-3
34. Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat.* 2011;14(3):191—201. doi:10.1016/j.drug.2011.03.001.
35. Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, Eckschlagler T. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(2):166—177. doi:10.5507/bp.2015.025
36. Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, Yu J. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;58(6):776—784. doi:10.1007/s00280-006-0224-7
37. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019;18(1):157. doi:10.1186/s12943-019-1089-9
38. Luongo M, Brigida AL, Mascolo L, Gaudino G. Possible Therapeutic Effects of Ozone Mixture on Hypoxia in Tumor Development. *Anticancer Res.* 2017;37(2):425—435. doi:10.21873/anticancer.11334
39. Güçlü A, Erken HA, Erken G, Dodurga Y, Yay A, Özçoban Ö, Şimşek H, Akçılar A, Koçak FE. The effects of ozone therapy on caspase pathways, TNF- α , and HIF-1 α in diabetic nephropathy. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(3):441—450. doi:10.1007/s11255-015-1169-8
40. Sağlam E, Alınca SB, Celik TZ, Hacisalihoglu UP, Dogan MA. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. *J Appl Oral Sci.* 2019;28: e20190140. doi:10.1590/1678-7757-2019-0140
41. Bocci V. Oxygen-Ozone Therapy. *A Critical Evaluation. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher).* 2002. 314 p.
42. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9926—9930. doi:10.1073/pnas.91.21.9926
43. Howe KL, Achuthan P, Allen J. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1): D884-D891. doi:10.1093/nar/gkaa942
44. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1): D480-D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100
45. Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue): D793-D796. doi:10.1093/nar/gkn665
46. Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K, Kan YW. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet.* 1995;95(3):265—269. doi:10.1007/BF00225191
47. Huppke P, Weissbach S, Church JA, Schnur R, Krusen M, Dreha-Kulaczewski S, Kühn-Velten WN, Wolf A, Huppke B, Millan F, Begtrup A, Almusafri F, Thiele H, Altmüller J, Nürnberg P, Müller M, Gärtner J. Activating *de novo* mutations in NFE2L2 encoding NRF2 cause a multisystem disorder. *Nat Commun.* 2017;8(1):818. doi:10.1038/s41467-017-00932-7
48. Vomhof-Dekrey EE, Picklo MJ Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem.* 2012;23(10):1201—1206. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.03.005
49. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006; 46:113—140. doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.007.
50. Wang Y, Devereux W, Stewart TM, Casero RA Jr. Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene. *J Biol Chem.* 1999;274(31):22095—22101. doi:10.1074/jbc.274.31.22095
51. Kaitsuka T, Tomizawa K, Matsushita M. Transformation of eEF1B δ into heat-shock response transcription factor by alternative splicing. *EMBO Rep.* 2011;12(7):673—681. doi:10.1038/embor.2011.82
52. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res.* 2017;7(3):212—219. doi:10.4103/2045-9912.215752
53. Inal M, Dokumacioglu A, Özcelik E, Ucar O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir J Med Sci.* 2011;180(3):703—707. doi:10.1007/s11845-011-0675-7
54. Fetner RH. Ozone-induced chromosome breakage in human cell cultures. *Nature.* 1962;194:793—794. doi:10.1038/194793a0
55. Fetner RH, Ingols RS. A comparison of the bactericidal activity of ozone and chlorine against *Escherichia coli* at 1degree. *J Gen Microbiol.* 1956;15(2):381—385. doi:10.1099/00221287-15-2-381.
56. Fetner RH. Chromosome Breakage in *Vicia faba* by Ozone. *Nature* 1958;181:504—505. doi.org:10.1038/181504a0
57. Karlic H, Kucera H, Metka M, Schönbauer M, Söregi G. Effect of ozone and ionizing radiation on an *in vitro* model — a pilot study of 4 gynecologic tumors. *Strahlenther Onkol.* 1987;163(1):37—42.

- (In German). [Karlic H, Kucera H, Metka M, Schönbauer M, Söregi G. Zur Wirkung von Ozon und ionisierender Strahlung am In-vitro-Modelleine Pilotstudie an vier gynäkologischen Tumoren *Strahlenther Onkol*. 1987;163(1):37—42.]
58. Zänker KS, Krocze R. *In vitro* synergistic activity of 5-fluorouracil with low-dose ozone against a chemoresistant tumor cell line and fresh human tumor cells. *Chemotherapy*. 1990;36(2):147—154. doi:10.1159/000238761
59. Washüttl J, Viebahn R, Steiner I. The influence of ozone on tumor tissue in comparison with healthy tissue. *Ozone Sci Engl*. 1990; 12:65—72.
60. Cannizzaro A, Verga Falzacappa CV, Martinelli M, Misiti S, Brunetti E, Bucci B. O(2/3) exposure inhibits cell progression affecting cyclin B1/cdk1 activity in SK-N-SH while induces apoptosis in SK-N-DZ neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):115—125. doi:10.1002/jcp.21097
61. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487—501. doi:10.1016/s0092-8674(01)00237-9
62. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012;119(3):651—665. doi:10.1182/blood-2011-04-325225
63. Mary VM, Lahijani HA, Khan FA. Ozone Induced Cell Death in HeLa cell Culture Mediated through Stimulation of TNF- Alpha. *MOJ Immunol* 2015;2(4): 00051. DOI: 10.15406/moji.2015.02.00051
64. Simonetti V, Quagliariello V, Giustetto P, Franzini M, Iaffaioli RV. Association of Ozone with 5-Fluorouracil and Cisplatin in Regulation of Human Colon Cancer Cell Viability: *In Vitro* Anti-Inflammatory Properties of Ozone in Colon Cancer Cells Exposed to Lipopolysaccharides. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:7414083. doi:10.1155/2017/7414083
65. Luongo M, Marinelli O, Zeppa L, Aguzzi C, Morelli MB, Amantini C, Frassinetti A, di Costanzo M, Fanelli A, Santoni G, Nabissi M. Cannabidiol and Oxygen-Ozone Combination Induce Cytotoxicity in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2774. doi:10.3390/cancers12102774
66. Tang S, Xu B, Li J, Zhong M, Hong Z, Zhao W, Zeng T, He X. Ozone induces BEL7402 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species production and activating JNK. *Ann Transl Med*. 2021;9(15):1257. doi:10.21037/atm-21-3233
67. Adachi T. Molecular Mechanisms Underlying Cellular Responses to the Loading of Non-thermal Atmospheric Pressure Plasma-activated Solutions *Yakugaku Zasshi*. 2021;141(10):1185—1194. doi: 10.1248/yakushi.21-00134
68. Arjunan KP, Sharma VK, Ptasinska S. Effects of Atmospheric Pressure Plasmas on Isolated and Cellular DNA — A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(2):2971—3016. <https://doi.org/10.3390/ijms16022971>
69. Tanaka H, Hori M. Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;60(1):29—32. doi:10.3164/jcfn.16-67
70. Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014;28(2):123—135. doi:10.1111/fcp.12018
71. Kaushik NK, Kaushik N, Linh NN, Ghimire B, Pengkit A, Sornsakdanuphap J, Lee SJ, Choi EH. Plasma and Nanomaterials: Fabrication and Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(1):98. doi:10.3390/nano9010098
72. Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, Yang SS, Lee JS. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PLoS One*. 2014;9(1): e86173. doi:10.1371/journal.pone.0086173
73. Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Chánová E, Syková E, Dejneka A, Kubinová S. Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations. *Sci Rep*. 2014;4:7129. doi:10.1038/srep07129
74. Kaushik N, Uddin N, Sim GB, Hong YJ, Baik KY, Kim CH, Lee SJ, Kaushik NK, Choi EH. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Sci Rep*. 2015;5:8587. doi:10.1038/srep08587
75. Mokhtari H, Farahmand L, Yaserian K, Jalili N, Majidzadeh-A K. The antiproliferative effects of cold atmospheric plasma-activated media on different cancer cell lines, the implication of ozone as a possible underlying mechanism. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):6778—6782. doi:10.1002/jcp.27428
76. Jiang H, Li H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21(1):149. doi:10.1186/s12885-021-07860-2
77. Shishkina VV, Antakova LN, Zolotareva SN, Atyakshin DA Matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodeling: molecular, cellular and tissue aspects. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2022;11(3):93—108. doi:10.18499/2225-7357-2022-11-3-93-108. (In Russian). [Шишкина В.В., Антакова Л.Н., Золотарева С.Н., Атякшин Д.А. Матриксные металлопротеиназы в ремоделировании внеклеточного матрикса: молекулярные, клеточные и тканевые аспекты. Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т.11. N. 3 P. 93—108. doi: 10.18499/2225-7357-2022-11-3-93-108.]
78. Karagülle OO, Yurttas AG. Ozone combined with doxorubicin exerts cytotoxic and anticancer effects on Luminal-A subtype human breast cancer cell line. *Rev Assoc Med Bras*. 2022;68(4):507—513. doi:10.1590/1806-9282.20211193
79. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(3):661—674. doi:10.1093/jnci/53.3.661
80. Hero T, Bühler H, Kouam PN, Priesch-Grzeszowiak B, Lateit T, Adamietz IA. The Triple-negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB 231 Is Specifically Inhibited by the Ionophore Salinomycin. *Anticancer Res*. 2019;39(6):2821—2827. doi:10.21873/anticancer.13410
81. Klanova M, Klener P. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):938. doi:10.3390/cancers12040938
82. Yıldırım M, Erkişi S, Yılmaz H, Ünsal N, İnaç E, Tanrıver Y, Koçak P. The apoptotic effect of ozone therapy on mitochondrial activity of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 using *in vitro* approaches. *J Interv Med*. 2022;5(2):64—71. doi:10.1016/j.jimed.2022.03.004
83. Song L, Zheng D, Xu J, Xu T, Liu Z, Zhang H, Li Y, Peng Y, Shi H. Improvement of TNBC immune checkpoint blockade with a microwave-controlled ozone release nanosystem. *J Control Release*. 2022;351:954—969. doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.053

84. Zheng D, Li Y, Song L, Xu T. Improvement of radiotherapy with an ozone-carried liposome nano-system for synergizing cancer immune checkpoint blockade. *Nano Today*. 2022;47: 101675. doi:10.1016/j.nantod.2022.101675.
85. Zheng D, Li Y, Song L, Xu T. Ozone-loaded Pt(IV) prodrug self-assembled micelles with high bioavailability, low toxicity as a novel irradiation-controlled release treatment and the immune microenvironment editor for triple-negative breast cancer. *JCO*. 2023;41: e12575-e12575. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e12575
86. Karagülle OO, Yurttaş AG. Synergistic effects of ozone with doxorubicin on the proliferation, apoptosis and metastatic profile of luminal-B type human breast cancer cell line. *Tissue Cell*. 2023;85:102233. doi:10.1016/j.tice.2023.102233
87. Li Y, Pu R. Ozone Therapy for Breast Cancer: An Integrative Literature Review. *Integr Cancer Ther*. 2024;23:15347354241226667. doi:10.1177/15347354241226667
88. Studies on the effect of ozone on tumor growth and radiation effect (animal experiments). *Fortschr Geb Röntgenstr Nuclear Medicine*. 1972;12—14. (In German). [Teske HJ, Haller J, Badenberg B, Hoppe G. Untersuchungen zum Ozonwirkung auf Tumorwachstum und Strahlenwirkung (Tierversuche// *Fortschr Geb Röntgenstr Nuklearmed*. 1972;12—14].
89. Teske HJ, Badenberg B, Hoffmann W. Animal experiments on the effect of ozone on tumor growth and on irradiation effect. *Radiotherapy*. 1973;145(2):155—160. (In German). [Teske HJ, Badenberg B, Hoffmann W. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Ozonwirkung auf Tumorwachstum und Bestrahlungseffekt// *Strahlentherapie*. 1973;145(2):155—160.]
90. Hernuss P, Müller-Tyl E, Seitz W. Effect of ozone in radiotherapy for malignant tumors in the animal experiment. *Fortschr Geb Röntgenstr Nuklearmed*. 1973;0(0):196. (In German). [Hernuss P, Müller-Tyl E, Seitz W. Über den Ozonwirkung bei der Bestrahlung maligner Tumoren im Tierexperiment// *Fortschr Geb Röntgenstr Nuklearmed*. 1973;0(0):196.]
91. Hernuss P, Müller-Tyl E, Seitz W. Radiosensitizing effect of ozone in animal experiment. *Radiotherapy*. 1974;147(1):91—96. (In German). [Hernuss P, Müller-Tyl E, Seitz W. Strahlensensibilisierender Effekt von Ozon im Tierversuch// *Strahlentherapie*. 1974;147(1):91—96.]
92. Hernuss P, Müller-Tyl E, Wicke L. Ozone and gynecologic radiotherapy. *Radiotherapy*. 1975;150(5):493—499. (In German). [Hernuss P, Müller-Tyl E, Wicke L. Ozon und gynäkologische Strahlentherapie// *Strahlentherapie*. 1975;150(5):493—499.]
93. Grundner HG, Bauer E, Tramer G, Utesch E. Animal experiment studies on the use of ozone in irradiated and non-irradiated tumors. I. Intravenous ozone therapy of Crocker's sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma in the white mouse. *Radiotherapy*. 1976;151(4):372—381. (In German). [Grundner HG, Bauer E, Tramer G, Utesch E. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Anwendung von Ozon auf unbestrahlte und bestrahlte Tumoren. I. Intravenöse Ozonbehandlung des Crocker-Sarkoms 180 und des Ehrlich-Karzinoms der weissen Maus// *Strahlentherapie*. 1976;151(4):372—381.]
94. Grundner HG, Erler U. Animal experiments on ozone therapy of non-irradiated and irradiated tumors. II. Ehrlich ascites carcinoma in vivo. *Radiotherapy*. 1976;151(6):522—529. (In German). [Grundner HG, Erler U. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Anwendung von Ozon auf unbestrahlte und bestrahlte Tumoren. II. Ehrlich-Asziteskarzinom in vivo// *Strahlentherapie*. 1976;151(6):522—529.]
95. Grundner HG. Animal experiments on the use of ozone in irradiated and non-irradiated tumors. III. Ehrlich-ascite carcinoma cells in vitro. *Radiotherapy*. 1976;151(5):480—486. (In German). [Grundner HG. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Anwendung von Ozon auf unbestrahlte und bestrahlte Tumoren// *Strahlentherapie*. 1976;151(5):480—486.]
96. Schulz S, Häussler U, Mandic R, Heverhagen JT, Neubauer A, Dünne AA, Werner JA, Weihe E, Bette M. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2008;122(10):2360—2367. doi:10.1002/ijc.23382
97. Menéndez S, Cepero J, Borrego L. Ozone Therapy in Cancer Treatment: State of the Art. *Ozone: Science & Engineering*. 2008;30(6):398—404. doi: 10.1080/01919510802473724
98. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93—103. doi:10.1038/bjc.2011.189
99. Wang E, Shibutani M, Nagahara H, Fukuoka T, Iseki Y, Okazaki Y, Kashiwagi S, Tanaka H, Maeda K. Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases. *Oncol Lett*. 2021;22(6):837. doi:10.3892/ol.2021.13098
100. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, Peng H, Cui L, Li C. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1595—1605. doi:10.1038/bjc.2014.46
101. Rossmann A, Mandic R, Heinis J, Höffken H, Küssner O, Kinscherf R, Weihe E, Bette M. Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable. *Clin Cancer Res*. 2014;20(16):4289—4301. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0677
102. Kızıltan HŞ, Bayir AG, Yucusan G, Eris AH, İdin K, Karatoprak C, Aydin T, Akcakaya A, Mayadagli A. Medical ozone and radiotherapy in a peritoneal, Erlich-ascites, tumor-cell model. *Altern Ther Health Med*. 2015;21(2):24—29.
103. Kuroda K, Azuma K, Mori T, Kawamoto K, Murahata Y, Tsuka T, Osaki T, Ito N, Imagawa T, Itoh F, Okamoto Y. The Safety and Anti-Tumor Effects of Ozonated Water in Vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):25108—25120. doi:10.3390/ijms161025108
104. Minicucci EM, Ribeiro DA, da Silva GN, Pardini MI, Montovani JC, Salvadori DM. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(5):483—489. doi:10.1016/j.etp.2010.03.009
105. Miranda SR, Noguti J, Carvalho JG, Oshima CT, Ribeiro DA. Oxidative DNA damage is a preliminary step during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Mol Histol*. 2011;42(2):181—186. doi:10.1007/s10735-011-9323-9
106. Dogan R, Hafız AM, Kızıltan HS, Yenigun A, Buyukpinarbaslilili N, Eris AH, Ozturan O. Effectiveness of radiotherapy+ozone on tumoral tissue and survival in tongue cancer rat model. *Auris Nasus Larynx*. 2018;45(1):128—134. doi:10.1016/j.anl.2017.03.017

107. Singh V, Gupta R, Kumar S, Agarwal B. Role of Ozone Therapy and Cancer: Myth or Reality?. *Journal of Medical Science And clinical Research*. 2019;7(7). doi:10.18535/jmscr/v7i7.127.
108. Baeza-Noci J, Pinto-Bonilla R. Systemic Review: Ozone: A Potential New Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11796. doi:10.3390/ijms222111796
109. Boulefour W, Rowinski E, Louati S, Sotton S, Wozny AS, Moreno-Acosta P, Mery B, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. A Review of the Role of Hypoxia in Radioresistance in Cancer Therapy. *Med Sci Monit*. 2021;27: e934116. doi:10.12659/MSM.934116
110. Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral Oncol*. 2018;80:23—32. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.03.004
111. Nagasawa H, Uto Y, Kirk KL, Hori H. Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(12):2335—2342. doi:10.1248/bpb.29.2335
112. Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret M, Rodríguez V, Macías D, Santana M, Hernández MA, Martín-Oliva R, Robaina F. Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2004;1(1):93—98. doi:10.1093/ecam/neh009
113. Clavo B, Ruiz A, Lloret M, Suárez G, Macías D, Rodríguez V, Hernández MA, Martín-Oliva R, Quintero S, Cuyás JM, Robaina F. Adjuvant Ozonotherapy in Advanced Head and Neck Tumors: A Comparative Study. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2004;1(3):321—325. doi:10.1093/ecam/neh038
114. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Foà R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2007;92(9):1289—1290. doi:10.3324/haematol.11096
115. Borrelli E. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with oxygen ozone therapy and mistletoe: An integrative approach. *Eur. J. Integr. Med*. 2012;4: 130.
116. Megele R, Riemenschneider MJ, Dodoo-Schittko F, Feyrer M, Kleindienst A. Intra-tumoral treatment with oxygen-ozone in glioblastoma: A systematic literature search and results of a case series. *Oncol Lett*. 2018;16(5):5813—5822. doi:10.3892/ol.2018.9397

Ответственный за переписку: Антакова Любовь Николаевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований НИИ экспериментальной биологии и медицины Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко, Российская Федерация, 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10. E-mail: tsvn@bk.ru

Андреев П.Ю. SPIN 1222-2565, ORCID 0000-0002-4123-9347
Мошуров И.П. SPIN 6907-2629, ORCID 0000-0003-1333-5638
Коротких Н.В. SPIN 2212-6667, ORCID 0000-0002-0308-513X
Шишкина В.В. SPIN 9339-7794, ORCID 0000-0001-9185-4578
Самойленко Т.В. SPIN 8023-5924, ORCID 0000-0001-9990-535X
Горюшкина Е.С. SPIN 1378-7608, ORCID 0000-0003-4813-8466
Антакова Л.Н. SPIN 3936-3381, ORCID 0000-0001-5212-1005

Corresponding author: Antakova Lyubov Nikolaevna — PhD, senior researcher at the laboratory of postgenomic research of the research institute of experimental biology and medicine of the N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, 394036, Studencheskaya st., 10, Voronezh, Russian Federation. E-mail: tsvn@bk.ru









Andreev P. Yu ORCID 0000-0002-4123-9347
Moshurov I.P. ORCID 0000-0003-1333-5638
Korotkikh N.V ORCID 0000-0002-0308-513X
Shishkina V.V. ORCID 0000-0001-9185-4578
Goryushkina E.S. ORCID 0000-0001-9990-535X
Samoilenko T.V. ORCID 0000-0003-4813-8466
Antakova L.N. ORCID 0000-0001-5212-1005

ГИСТОЛОГИЯ HISTOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-488-498
EDN GZKOCG

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Distribution of β -amyloid and pTau in brain cortex depending on age and mental state

Alexandra V. Sentyabreva^{1,2}  , Olyesya A. Vasyukova¹ , Yana A. Zorkina^{3,4} ,
Alisa V. Andryuschenko^{3,5} , Georgy P. Kostyuk^{3,6,7} ,
Irina Z. Eremina⁸ , Anna M. Kosyreva^{1,2} 

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russian Federation

² Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University, Moscow, Russian Federation

³ Scientific and Clinical Research Center for Neuropsychiatry, Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russian Federation

⁴ Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁶ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russian Federation

⁷ Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, Sechenov University, Moscow, Russian Federation

⁸ Medical Institute, RUDN University Moscow, Russian Federation

 alexandraasentyabreva@gmail.com

Abstract: Relevance. Alzheimer’s disease (AD) is the most cause of disability and dementia, which is the 7th leading cause of death worldwide. Diagnosis of AD includes detection of amyloid plaques and hyperphosphorylated tau protein (pTau) in the brain. However, in recent years the amyloid hypothesis of AD development has been criticized and revised, and a growing pool of data emerges indicating more complex pathogenetic mechanisms leading to neurodegeneration in AD. The aim of our work was to evaluate the presence and distribution of amyloid plaques and pTau fragments in different regions of the cerebral

© Sentyabreva A.V., Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

cortex in patients > 60 years old with diagnosed dementia and without cognitive impairment, as well as in people < 60 years old. **Materials and Methods.** The amount of β -amyloid and pTau fragments in three groups of patients was measured on IHC stained histological sections in the regions of parahippocampal, temporal, and occipital cortex. **Results and Discussion.** Amyloid plaques were detected in all patients over 60 years of age (with and without dementia), while in younger individuals 60 years of age they were found in 66% of cases. The largest amyloid- β burden was observed in the occipital cortex. pTau was detected in all cortical areas in the three groups of patients. Also, the amount of pTau was higher in the occipital cortex in patients over 60 years of age both with and without dementia than in the group of people under 60 years of age. **Conclusion.** Thus, accumulation of pTau occurs earlier than β -amyloid. The amount of pTau was higher in patients over 60 years of age with clinically manifested dementia, while in some regions the amount of amyloid conglomerates is higher in cognitively intact patients. The findings point to much more complex mechanisms of the neurodegenerative diseases development with the formation of amyloid plaques being a consequence rather than cause of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, β -amyloid, tau-protein, age-related diseases

Funding. The work was performed within the framework of State assignments of the Ministry of Health of the Russian Federation: Numbers of state registration of research, development, and technological work for civil purposes — 122030200530-6 and 123031600063-1.

Author contributions. Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P. — obtaining autopsy material, summarizing clinical data; Sentyabreva A.V. — immunohistochemical study, statistical analysis; Sentyabreva A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M. — concept and design of the study; Sentyabreva A.V., Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M. — writing and editing the manuscript. All authors made significant contributions to the concept, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was approved by the local ethics committee of Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1 (Protocol No. 2 of October 28, 2020).

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication — not applicable. Obtaining autopsy material was carried out in accordance with the order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 354n dated 06/06/2013 “On the procedure for conducting pathological autopsies”.

Received 22.06.2024. Accepted 26.06.2024.

For citation: Sentyabreva AV, Vasyukova OA, Zorkina YaA, Andryuschenko AV, Kostyuk GP, Eremina IZ, Kosyreva AM. Distribution of β -amyloid and pTau in brain cortex depending on age and mental state. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):488–498. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-488-498. EDN: GZKOCG

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most cause of disability and dementia, which is the 7th leading cause of death worldwide. [1]. AD is an age-related disease and usually occurs in older people >60—65 years of age. AD also refers to socially significant pathologies, which means that social support should be provided from the federal budget in accordance with Federal Law N 323-FZ “On the fundamentals of protecting

the health of citizens in the Russian Federation” [2]. Limited epidemiological studies and extrapolation of data obtained in other countries suggest that in 2020, in the Russian Federation there could live about 1.4 million patients with AD, while by 2035, their number will reach 2—3.6 million [3]. However, there is still no unified registry for patients with AD, as well as accessible and effective methods of intravital diagnostic approaches, especially early ones, which would allow validating the

diagnosis [4]. Only about 10% of all cases are taken into account in official morbidity statistics [5]. Current clinical guidelines indicate that the main part in the pathogenesis is violation of metabolism of amyloid precursor protein (APP) and the formation of insoluble β -amyloid conglomerates, as well as accumulation of hyperphosphorylated tau protein, which stabilizes the neuronal cytoskeleton microtubules. According to the amyloid theory, its hyperphosphorylation is initiated by already formed amyloid plaques. While the clinical manifestation and severity of the disease depends on the accumulation and distribution of these pathognomonic morphological AD signs [6, 7]. However, in recent years, the amyloid hypothesis of AD development has been criticized and revised, while a growing pool of data indicate much more complex pathogenetic mechanisms leading to neurodegeneration in AD. The aim of our work was to evaluate the presence of amyloid plaques and hyperphosphorylated tau protein fragments, as well as their distribution in different regions of the cerebral cortex, in patients >60 years old with diagnosed dementia and without cognitive impairment, as well as in people <60 years old.

Materials and Methods

Patients

Autopsy material for a retrospective study and anamnesis data from the medical records of patients >60 years old with diagnosed dementia were provided by the pathology department of Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1. Autopsy material and medical history data from patients >60 years of age without diagnosed dementia and patients <60 years of age were provided by the pathology department of the City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Department of Health (Table). Pathoanatomical autopsies were carried out in accordance with the order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 354n dated 06.06.2013 "On the procedure for conducting pathological autopsies". The study was approved by the local ethics committee of Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1 (Protocol No. 2 of October 28, 2020).

Immunohistochemical and morphometric study

After fixing brain tissue samples (fragments 1x1x0.5cm) in 10% buffered formalin (BioVitrum, Russia), they were processed through alcohols of increasing concentration and poured into histomix according to the standard protocol, after which histological sections 5 μ m thick were prepared. Immunohistochemical staining, morphological and morphometric assessment of histological preparations of the brain were carried out. Primary antibodies used: anti-A β 1—42 1:1000 (ab201060, Rabbit); anti-TAU-2 1:1000 (sigma5530, Mouse); secondary antibodies: Donkey-anti-Rabbit HRP 1:500 (Novex lifetechnologies A16035); Goat-anti-Mouse HRP 1:500 (ab6789). The average number of amyloid plaques was assessed at a magnification of x100 (standard field of view 96,000 μ m²), and fragments of phosphorylated tau protein (pTau) — at a magnification of x400 (field of view 25,000 μ m²). Counting was carried out in the areas of the parahippocampal, temporal and occipital cortex. The areas were recommended by the National Institute on Aging — Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease [8].

Statistical analysis

The morphometric study data were statistically processed using GraphPad Prism 8.1 software. Statistical differences between groups were assessed by multiple comparisons using the nonparametric Kruskal — Wallis test with the Dwass — Steele — Crichlow — Fligner post-hoc test. $p < 0.05$ differences between groups were considered significant.

Results and Discussion

In the group of patients with clinically confirmed dementia, β -amyloid deposits were detected in 100% of cases, while the size of amyloid plaques and the intensity of their staining varied significantly both between cortical regions in one patient and between patients in the corresponding cortical regions. In the occipital and temporal regions of the cortex, these structures were observed in 100% of cases, while in the parahippocampal region of the cortex they were found only in 66% (4/6) of patients (Fig. 1).

Table

Data from medical records of patients included in the study

Patient	Age	Sex	Major disease	Age-related diseases
Patients > 60 years with diagnosed dementia				
N1	84	F	Diffuse small-focal cardiosclerosis. Stenosing atherosclerosis of the coronary arteries	Hypertension, atherosclerosis
N2	86	F	Diffuse small-focal cardiosclerosis. Stenosing atherosclerosis of the coronary arteries	Hypertension, atherosclerosis
N3	74	F	Diffuse small-focal cardiosclerosis. Stenosing atherosclerosis of the coronary arteries	Hypertension, diabetes mellitus type 2, atherosclerosis
N4	75	F	Diffuse small-focal cardiosclerosis. Stenosing atherosclerosis of the coronary arteries	Hypertension, atherosclerosis
N5	89	F	Cardiac arrhythmia, unspecified	No data
N6	82	F	Postinfarction cardiosclerosis	No data
Patients > 60 years without diagnosed dementia				
N7	94	F	Postinfarction cardiosclerosis	Hypertension, atherosclerosis
N8	72	F	Chronic cerebral ischemia with encephalopathy	Hypertension, atherosclerosis
N9	98	F	Ischemic cardiomyopathy, atherosclerosis of the coronary arteries	Diabetes mellitus type 2, Hypertension, atherosclerosis
N10	76	F	Ovarian adenocarcinoma	Atherosclerosis
Patients < 60 years				
N11	52	F	Neuroendocrine tumor of the pancreas tail	Hypertension, atherosclerosis
N12	48	F	Child-Pugh C alcoholic liver cirrhosis	Hypertension, atherosclerosis
N13	58	M	Adenocarcinoma of the colon splenic flexure	Hypertension, atherosclerosis
N14	47	M	Child-Pugh C liver cirrhosis of mixed origin (HCV + toxic)	None
N15	48	M	Adenocarcinoma of the sigmoid colon	None
N16	39	M	Pancreatic necrosis	None

Similar morphological changes were observed in a group of elderly patients without diagnosed dementia. Conglomerates of β -amyloid were also detected in all samples of the occipital and temporal cortical regions, while in the parahippocampal region were visualized in 75 % (3/4) of patients (Fig. 1).

At the same time, in the group of patients < 60 years old, amyloid plaques were detected in only 66 % (4/6). In the occipital, temporal and parahippocampal regions of the cortex, a positive

immunohistochemical reaction with antibodies to β -amyloid was recorded only in 16 % (1/6), 33 % (2/6) and 16 % (1/6) of cases, respectively (Fig. 1).

At the same time, pTau fragments were detected in 100 % of patients in each group in all studied regions of the cerebral cortex (Fig. 2).

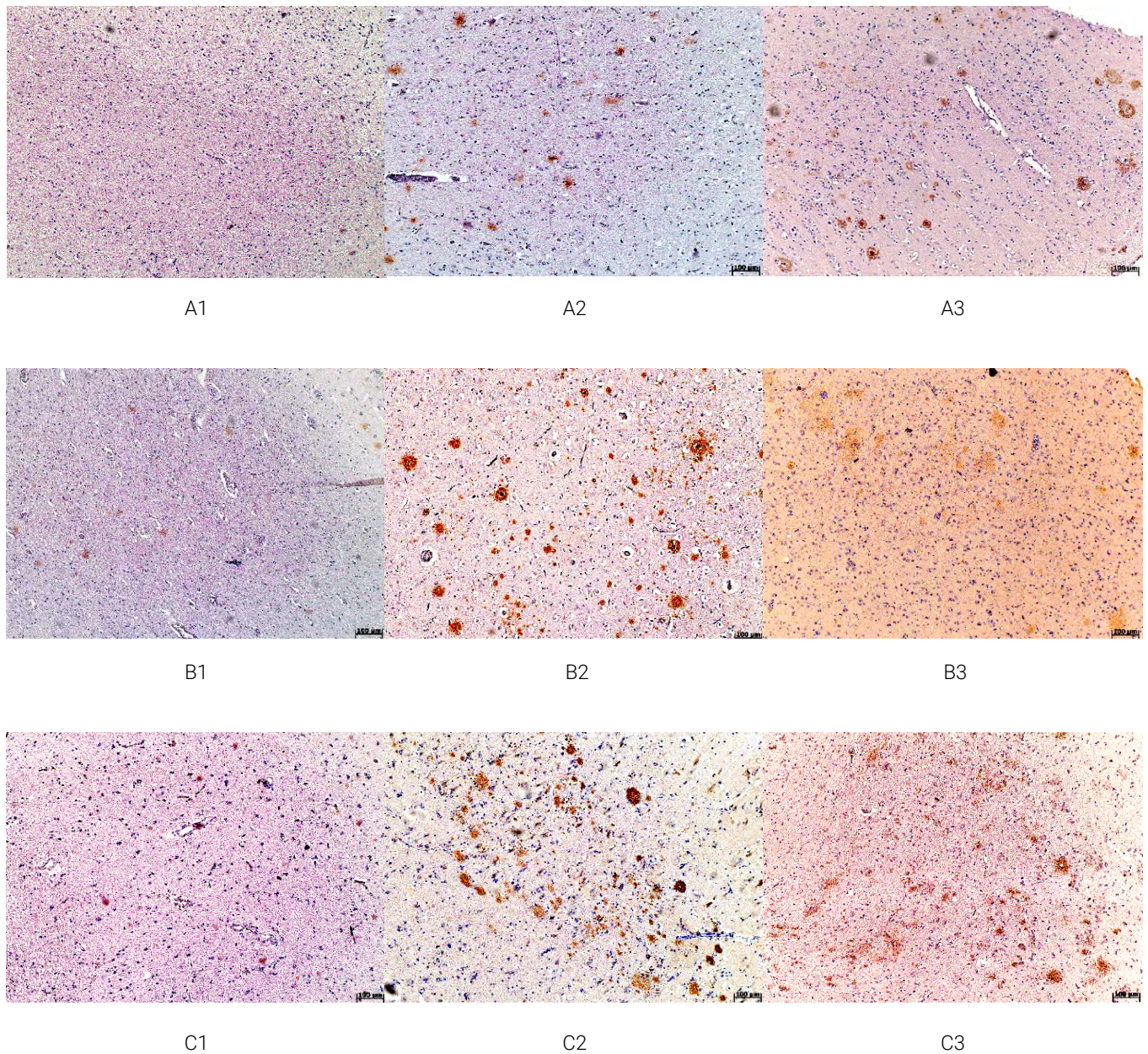


Figure 1. Distribution of amyloid plaques in the occipital (1), temporal (2), and parahippocampal (3) regions of the cerebral cortex in patients >60 years old with diagnosed dementia (A1, A2, A3), patients >60 years old without diagnosed dementia (B1, B2, B3) and patients <60 years old (C1, C2, C3). Immunohistochemical staining, primary antibodies anti-A β 1–42 (Rb) + secondary antibodies Donkey-anti-Rabbit HRP, staining with hematoxylin, magnification x100

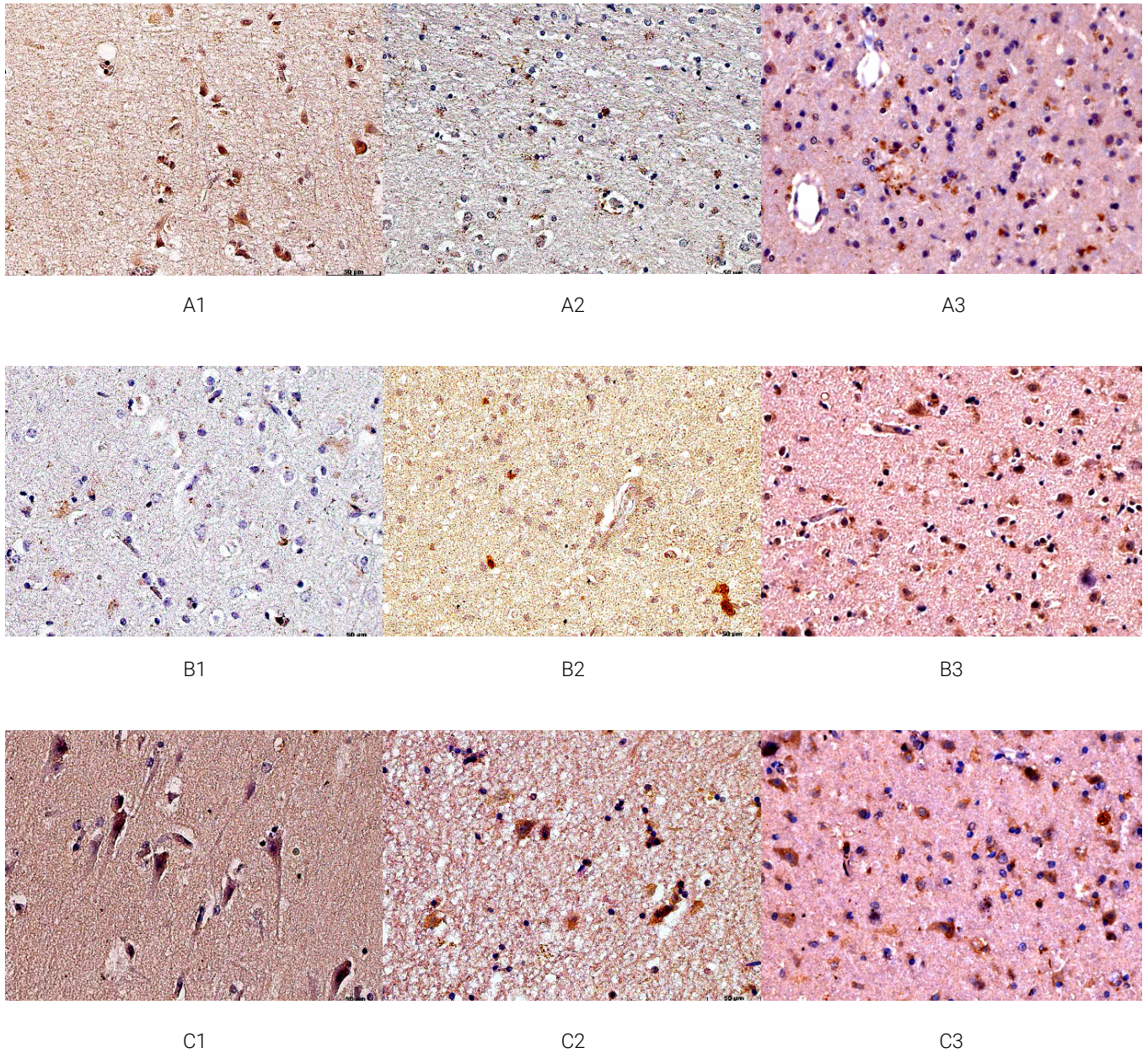


Figure 2. Distribution of fragments of phosphorylated tau protein (pTau) in the occipital (1), temporal (2) and parahippocampal (3) regions of the cerebral cortex in patients >60 years old with diagnosed dementia (A1, A2, A3), patients >60 years old without diagnosed dementia (B1, B2, B3) and patients <60 years old (C1, C2, C3). Immunohistochemical staining, primary antibodies anti-TAU-2 (Rb) + secondary antibodies Goat-anti-Mouse HRP, counterstaining with hematoxylin, magnification x400

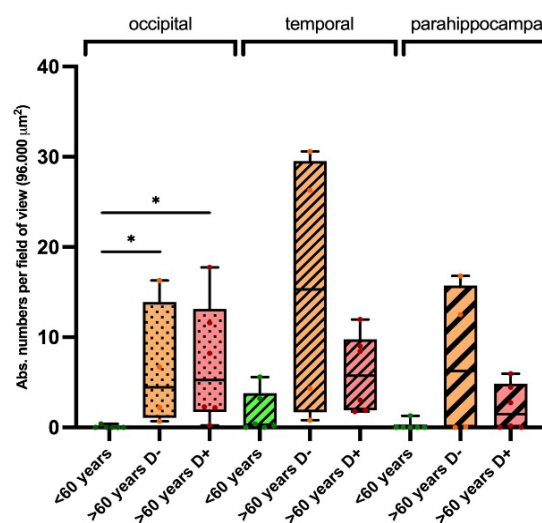
Analysis of the distribution of β -amyloid conglomerates revealed a significant increase in the mean number of amyloid plaques per standard visual field in the occipital region of the cerebral cortex in both elderly patients with and without diagnosed dementia compared with the group of patients <60 years of age. However, no differences were found for regions of the temporal and parahippocampal cortex, despite a trend towards an increase in the number of amyloid plaques in patients without dementia compared to patients with confirmed dementia (Fig. 3).

When assessing the distribution of pTau fragments in the occipital region of the cortex, an increase in the number of these structures was observed, similar to the distribution of β -amyloid deposits — in both groups of elderly patients it was significantly greater than in patients <60 years old. In the temporal and parahippocampal cortical regions, the number of pTau fragments was significantly higher in patients with dementia compared to the group of patients <60 years old, while no differences in this indicator were found between the groups of elderly patients without confirmed dementia and patients <60 years old (Fig. 3).

In accordance with the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease [7], still dominant among researchers and clinicians, it is assumed that as the disease progresses, brain regions are affected in a certain order. Typically, the highest concentration of senile plaques, neurofibrillary tangles and neuronal death are detected in the mediobasal regions of the frontal and temporal lobes and the hippocampus; at the next stage, the posterior parts of the temporal and parietal lobes are involved in the pathological process, and the last ones are the frontal and occipital lobes of the brain [6]. However, recent studies using mathematical modeling have shown that amyloid plaques more likely form simultaneously in different cortical regions and subcortical structures than spread from primary affected areas to others [9]. In turn, neurofibrillary threads and tangles formed as a result of phosphorylation and subsequent misfolding of pTau manifest themselves in the entorhinal cortex, hippocampus and amygdala, and only then do they appear in various areas of the cortex. However, although it was previously believed that pTau fragments are formed after the formation of β -amyloid

deposits as a consequence of its toxic effects [10,11], it was later found that pTau is detected much earlier, including in young people aged <30 years [12, 13].

Distribution of A β plaques in various regions of cortex



Distribution of pTau fragments in various regions of cortex

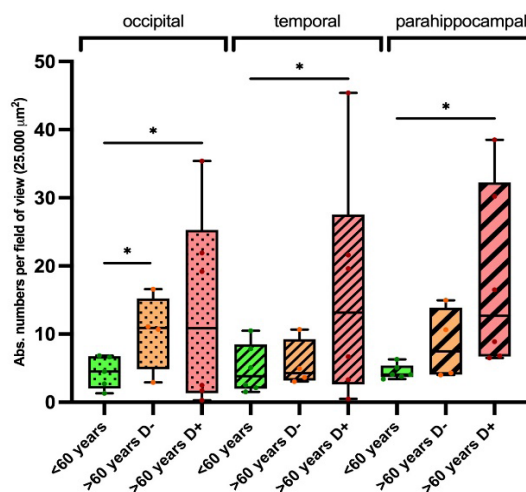


Figure 3. Distribution of amyloid plaques and fragments of phosphorylated tau protein (pTau) protein in the occipital, temporal, and parahippocampal cortex of the brain in patients <60 years old (<60 years, n = 6) patients >60 years old without diagnosed dementia (> 60 years D-, n = 4), and patients > 60 years old with diagnosed dementia (> 60 years D+, n = 6)

Note: * — p < 0.05. Multiple comparisons using the nonparametric Kruskal – Wallis test.

Our results confirm later literature data regarding the distribution and order of occurrence of pathognomonic morphological signs of AD: pTau fragments were identified in all patients, and their number was statistically significantly higher in all studied cortical areas in patients with diagnosed dementia compared to the group of patients <60 years. A significant increase in the number of amyloid plaques was recorded only in the temporal region of the cortex. At the same time, the localization and average number of amyloid plaques and pTau fragments in a standard visual field area did not correlate with the clinical manifestations of the disease, the rate of its progression and the severity of the course in patients included in this study.

These observations can be explained by the complex polyetiological nature of AD and the influence of a large number of modifiable and non-modifiable factors — for example, inflammation. As people age, cells inevitably age too, which is manifested by the acquisition of the senile pro-inflammatory secretory phenotype (SASP) and the formation of inflammaging — systemic chronic low-level inflammation [14]. It is important to note that the vast majority of patients included in the study had a history of concomitant somatic age-associated diseases, which were identified as risk factors for the development of dementia [15]. The most frequently mentioned disease was atherosclerosis, as well as type 2 diabetes mellitus, which are characterized by a systemic increase in the expression of inflammatory markers [16]. It is worth noting that some of the data from the medical records of patients with dementia was censored, and it was not possible to further clarify the presence or absence of age-associated diseases. Inflammatory responses, both systemic and limited to the central nervous system, are a debated risk factor not only for Alzheimer’s disease, but also for other mental illnesses such as schizophrenia [17]. However, it is AD that is an age-associated pathology with a high level of prevalence and a tendency to further increase; in addition, effective diagnosis and therapy for this neurodegenerative process have not yet been developed.

Conclusion








The presented data are evidence of the heterogeneous formation and distribution of pathognomonic signs of AD in the cerebral cortex — amyloid plaques and pTau fragments. It was noted that accumulation of pTau occurs earlier than β -amyloid. The average number of pTau fragments was significantly increased in patients with manifested dementia, while in some cortical regions the number of amyloid conglomerates was higher in cognitively intact elderly patients. Considering this, as well as the growing volume of data regarding more complex mechanisms underlying the pathogenesis of neurodegenerative diseases in general and AD in particular, it is advisable to continue experimental studies in the paradigm of non-amyloid hypotheses.

References/Библиографический список

1. The top 10 causes of death. WHO. 2020. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Accessed on 2024 February 12].
2. Federal Law of 21.11.2011 № 323-FZ “On the basis of the healthcare of citizens in the Russian Federation” (in Russian). [Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»] Available at: <http://www.rg.ru/2011/11/23/zdorovie-dok.html> [Accessed on 2024 February 12].
3. Vatulina M. The problems of evaluation of mortality of Alzheimer’s disease in Russia. *Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii*. 2015;59(4):20—24. (in Russian). [Ватолина М.А. Проблемы оценки смертности от болезни Альцгеймера в России / М.А. Ватолина // Здравоохранение Российской Федерации. 2015. Т. 59, № 4. С. 20—24.]
4. Haque SS. Biomarkers in the diagnosis of neurodegenerative diseases. *RUDN Journal of Medicine*. 2022;26(4):431—440. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-4-431-440
5. Vasenina E, Levin O, Sonin A. Modern trends in epidemiology of dementia and management of patients with cognitive impairment. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(6—2):87—95. (in Russian). [Васенина, Е.Е. Современные тенденции в эпидемиологии деменции и ведении пациентов с когнитивными нарушениями / Е.Е. Васенина, О.С. Левин, А.Г. Сонин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117, № 6(2). С. 87—95.]
6. Tkacheva ON, Yakhno NN, Neznanov NG, Levin OS, Gusev EI. Cognitive disorders in elderly and senile people. Clinical recommendations. М., 2020. 317 p. (in Russian). [Ткачева О.Н. Когнитивные расстройства у лиц пожилого и старческого возраста. Клинические рекомендации / Ткачева О.Н., Яхно Н.Н., Незнанов Н.Г., Левин О.С., Гусев Е.И., Мартынов М.Ю. и др. // М., 2020. 317 p.]

7. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184—185. doi: 10.1126/science.1566067
8. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 2012;8(1):1—13. doi: 10.1016/j.jalz.2011.10.007
9. Whittington A, Sharp DJ, Gunn RN; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Spatiotemporal Distribution of β -Amyloid in Alzheimer Disease Is the Result of Heterogeneous Regional Carrying Capacities. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018;59(5):822—827. doi: 10.2967/jnumed.117.194720
10. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 1991;82(4):239—259. doi: 10.1007/BF00308809
11. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002;58(12):1791—1800. doi: 10.1212/wnl.58.12.1791
12. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2011;70(11):960—969. doi:10.1097/NEN.0b013e318232a379
13. Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathologica*. 2011;121(2):171—181. doi:10.1007/s00401-010-0789-4
14. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2014;69 Suppl 1: S4-S9. doi:10.1093/gerona/glu057
15. Dementia. WHO. 2023. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. [Accessed 2024 March 2].
16. Kosyreva AM, Sentyabreva AV, Tsvetkov IS, Makarova OV. Alzheimer's Disease and Inflammaging. *Brain Science*. 2022;12(9):1237. doi:10.3390/brainsci12091237
17. Müller N. Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. *Schizophrenia Bulletin*. 2018;44(5):973—982. doi:10.1093/schbul/sby024

Распределение β -амилоида и рТau в коре головного мозга в зависимости от возраста и психиатрического статуса

А.В. Сентябрева^{1, 2}  , О.А. Васюкова¹ , Я.А. Зоркина^{3, 4} , А.В. Андрищенко^{3, 5} ,
Г.П. Костюк^{3, 6, 7} , И.З. Еремина⁸ , А.М. Косырева^{1, 2, 8} 

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский Институт молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

³ Алексеевская психиатрическая клиническая больница № 1, г. Москва, Российская Федерация


⁴ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, г. Москва, Российская Федерация

⁵ МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Российская Федерация

⁶ Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), г. Москва, Российская Федерация

⁷ Сеченовский университет, г. Москва, Российская Федерация

⁸ Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

 alexandraasentyabreva@gmail.com

Аннотация: Актуальность. Болезнь Альцгеймера (БА) является одной из наиболее распространенных причин инвалидности и основной причиной развития деменции и находится на 7-м месте среди ведущих причин смерти во всем мире. Диагностика БА включает определение амилоидных бляшек и гиперфосфорилированного тау-протеина (рТau) в головном мозге. Однако в последние годы амилоидная гипотеза развития БА подвергается критике и пересмотру, и появляется все больше данных, свидетельствующих о более сложных патогенетических механизмах, приводящих к нейродегенерации при БА. Целью нашей работы было оценить присутствие и распределением амилоидных бляшек и фрагментов рТau в разных регионах коры головного мозга у пациентов >60 лет с диагностированной деменцией

и без когнитивных нарушений, а также у людей <60 лет. Материалы и методы. На иммуногистохимически окрашенных гистологических срезах в зонах парагиппокампальной, височной и затылочной коры оценивали количество β -амилоида и фрагментов pTau в трех группах пациентов с БА. *Результаты и обсуждение.* Амилоидные бляшки выявлялись у всех пациентов старше 60 лет (с и без деменции), тогда как у лиц младше 60 лет они встречались в 66 % случаев. Причем наибольшая плотность β -амилоида наблюдалась в затылочной зоне коры. pTau обнаруживался во всех зонах коры у трех групп пациентов, однако в затылочной зоне коры у пациентов старше 60 лет с и без деменции количество pTau было значительно выше, чем в группе лиц младше 60 лет. *Выводы.* Таким образом, накопление pTau происходит раньше, чем β -амилоида. Кроме того, количество pTau выше у пациентов старше 60 лет с манифестировавшей деменцией, тогда как в некоторых регионах коры количество конгломератов амилоида выше у когнитивно сохраненных пожилых пациентов. Полученные данные указывают на более сложный механизм развития нейродегенеративных заболеваний, при которых образование амилоидных бляшек может являться следствием, а не причиной заболевания.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, β -амилоид, тау-белок, возрастные заболевания

Информация о финансировании. Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства здравоохранения Российской Федерации НИОКТР № 122030200530-6 и 123031600063-1.

Вклад авторов. Сentyabreva A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M. — концепция и дизайн исследования; Васюкова О.А., Зоркина Я.А., Андриющенко А.В., Костюк Г.П. — получение аутопсийного материала, обобщение клинических данных; Сentyabreva A.V. — иммуногистохимическое исследование, статистический анализ; Сentyabreva A.V., Васюкова О.А., Зоркина Я.А., Андриющенко А.В., Костюк Г.П., Eremina I.Z., Kosyreva A.M. — редактирование рукописи. Все авторы внесли значительный вклад в концепцию, проведение исследования и подготовку статьи, а также прочитали и утвердили окончательную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение: Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «ПКБ № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ (протокол № 2 от 28 октября 2020 г.).

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо. Получение аутопсийного материала проводилось в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 354н от 06.06.2013 «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий».

Поступила 22.05.2024. Принята 26.06.2024.

Для цитирования: Sentyabreva A.V., Vasyukova O.A., Zorkina Ya.A., Andryuschenko A.V., Kostyuk G.P., Eremina I.Z., Kosyreva A.M. Distribution of β -amyloid and pTau in brain cortex depending on age and mental state // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 488–498. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-488-498. EDN: GZKOCG

Corresponding author: Alexandra Vladislavovna Sentyabreva — junior researcher of the Laboratory of Neuromorphology Avtsyn Research Institute of Human Morphology of “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, 117218, Tsyurupy st., 3, Moscow, Russian Federation. E-mail: alexandraasentyabreva@gmail.com

Sentyabreva A.V. ORCID 0000-0001-5064-219X

Vasyukova O.A. ORCID 0000-0001-6068-7009

Zorkina Ya.A. ORCID 0000-0003-0247-2717

Andryuschenko A.V. ORCID 0000-0002-7702-6343

Kostyuk G.P. ORCID 0000-0002-3073-6305

Eremina I.Z. ORCID 0000-0002-5093-6232

Kosyreva A.M. ORCID 0000-0002-6182-1799

Ответственный за переписку: Сентябрева Александра Владиславовна — младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека имени Авцына, ФГБУ «Российский научный центр хирургии им. Петровского», Российская Федерация, 117218, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: alexandraasentyabreva@gmail.com

Сентябрева А.В. SPIN 6966-9959, ORCID 0000-0001-5064-219X

Васюкова О.А. SPIN 2242-0958, ORCID 0000-0001-6068-7009

Зоркина Я.А. SPIN 3017-3328, ORCID 0000-0003-0247-2717

Андрющенко А.В. SPIN 8864-3341, ORCID 0000-0002-7702-6343

Костюк Г.П. SPIN 3424-4544, ORCID 0000-0002-3073-6305

Еремина И.З. SPIN 5819-6159, ORCID 0000-0002-5093-6232

Косырева А.М. SPIN 5421-5520, ORCID 0000-0002-6182-1799




ХИРУРГИЯ SURGERY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-499-507
EDN GZZFKW

REVIEW ARTICLE
ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

The choice of the optimal mesh implant for hernioplasty operations depending on the properties of mesh implants

Andrey V. Protasov , Mekhaeel Sh. F. Mekhaeel  , Sameh M. A. Salem 

RUDN University, Moscow, Russian Federation
 mekhaeel60@yahoo.com

Abstract. Silver and titanium were the first used elements in the era of hernia-strengthening biomaterials about a hundred years ago, reaching up to 150 types nowadays. The uniqueness of Deeken and Lake Mesh Classification system is its dependence of the properties of the used materials in classifying them, where three main categories of meshes was established; permanent synthetic, absorbable (of biological origin) derived; furtherly divided into composite, non-composite types, and hybrid meshes. The physical characteristics of each category are determined by the pore size, thread diameter, thickness and density. Moreover, tear resistance, suture retention, uniaxial tensile and planar biaxial tensile testing, ball burst, make it possible to refine the properties of the mesh implant. This article is devoted to understanding the types of mesh materials used for repair of the anterolateral abdominal wall hernias by highlighting the properties of their scaffold materials, coating and barriers, as well as their improvement through coating by different several materials improving their properties in order to meet the needs of sufficient and satisfactory hernia repair seeking for leadership in choosing mesh implants.

Keywords: hernia, mesh implants, Deeken and Lake Mesh Classification system

Funding. The authors received no financial support for the research, authorship, and publication of this article.

Author contributions. Mekhaeel M. Sh.F., Salem S. M.A. — concept and design of the study; Protasov A. V.— editing the manuscript. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. Authors declare no conflict of interest.

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgements — not applicable.

© Protasov A.V., Mekhaeel M.Sh.F., Salem S.M.A., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Consent for publication — not applicable.

Received 05.02.2024. Accepted 06.03.2024.

For citation: ProtasovAV, Mekhaeel MShF, Salem SMA. The choice of the optimal mesh implant for hernioplasty operations depending on the properties of mesh implants. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):499–507. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-499-507. EDN: GZZFKW

Introduction

The manuscript presents a literature review of the structures of mesh materials according to their components and mechanical characteristics to establish their ideal application for hernia repair. sources included Research Gate, Springer, PubMed, ScienceDirect, online library, SAGES manual on hernia surgery, as well as modern research on the biomedical application of carbon nanomaterials, including graphene, in dissertation works in order to select the optimal option.

Silver and titanium were the first biomaterials to be used for reinforcement of hernia starting from the 40's of the last century, which were replaced by permanent synthetic mesh materials in the next decade reaching up to 150 types of mesh materials nowadays. The uniqueness of Deeken and Lake Mesh Classification system over other classifications; is that it clarifies the nuances in order to explain the properties of the used materials dividing them into 3 main groups; permanent synthetic, resorbable, and biological tissue-derived materials which are furtherly divided into subgroups depending on; reinforcement materials, coatings and barriers [1—4].

The physical characteristics

1. Pore sizes; microporous (< 100 μm), small pores (100—600 μm), medium pores (600—1000 μm), large pores (1000—2000 μm).

2. Fiber diameter; very large (> 200 μm), large (175—200 microm.), medium (150—175 μm .), small (125—150 μm .) and very small (<125 μm).

3. Thickness; extra thick (>1.5mm), thick (1—1.5 mm), medium (0.75—1 mm), thin (0.5—0.75mm) and very thin (< 0.5 mm).

4. Area density; heavy weight (>90g/m²), medium weight (50—90g/m²), lightweight (35—50 g/m²) and ultra-light-weight (< 35g/m²).

5. Suture retention strength; the maximum load sustained prior to failure of the suture.

6. Tear resistance testing; is the performed effort to understand the resistance of the material provides against propagation of tear once the tear has been initiated.

7. Ball burst testing; Estimating strain, stiffens and ultimate tensile strength of the tested mesh material.

8. Uniaxial tensile testing; to understand the resistance of the material provides against tension applied in two orthogonal directions simulating the conditions of the human abdomen.

9. Lap shear testing; Measuring the maximum load measured in Newton which the suture can resist achieving tissue reinforcement [2].

The first category includes permanent synthetic polymers [5, 6]:

1. Polypropylene (PP): A nonabsorbable, high tensile strength, nonpolar, electrostatically neutral, and highly hydrophobic, coated or uncoated; mono or multifilamentous. Heavy or light weight were the latter decreasing the incidence of recurrence through escaping intense inflammatory reaction and thick scar formation therefore avoids mesh contraction [7, 8].

2. Polyester (PET): Multifilamentous, polar, hydrophilic, and coated by collagen preventing adhesions, so be used intraperitoneally degradable during infections [7].

3. Extended Polytetrafluoroethylene (ePTFE): Having minimal inflammatory reaction and lower scar density; incomparision to PP and PET. However, its fixation with fine material is mandatory as it can be easily broken [9].

4. Polyvinylidene fluoride (PVDF): Is superior to PP and PET regarding its resistance to degeneration and hydrolysis, moreover, decreasing foreign body response is considered as an additional advantage as reported in some studies [10, 11].

Coatings, the permanent anti-adhesive coating group for all current designs possess Titanium. Moreover, permanent synthetic meshes are paired with resorbable barriers, biological tissue-derived barriers or resorbable coatings e.g., Omega 3[5].

Barrier materials which act as an anti-adhesive layer are classified into:

1. Permanent non-composite, include expanded PTEF (ePTFE).

2. Permanent Composite, include (ePTFE) with the exception of one silicone design (Surgimesh®).

3. Resorbable (biologically derived) include: Sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose/polyethylene glycol hydrogel, glycolide/caprolactone/trimethylene carbonate, glycolide/ E caprolactone, type I collagen, polyglycolic acid/trimethylene carbonate, Polyvinylpyrrolidone/polyethylene glycol and finally the omega-3 fatty acid which represents the only available resorbable coating are represented in Table 1 [5].

Table 1

The properties of each type of the first-generation mesh implants

Product (Manufacturer)	Material	Pore Size (mm)	Absorbability	Weight (g/m ²)	Filament	Tensile strength (N/cm)	Advantages	Disadvantages
Vicryl (Ethicon)	PGA	0.4	Fully (60–90 days)	56	Multifilament	78.2 ± 10.5	Eliminates infectious.	Recurrence.
Dexon (Syneture)	PGA	0.75	Fully (60–90 days)	56	Multifilament	N.A.	N.A.	Adhesions
Sefil (B-Baun)	PGA	0.75	Fully (60–90 days)	56	Multifilament	N.A.	Low risk of Secondary infection.	N.A.
Marlex (BARD)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	58.8	N.A.	Evokes a chronic inflammatory reaction.
3D Max (BARD)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	124.7	Reduced pain.	Adhesions.
Polysoft (BARD)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	N. A.	Eliminates infection.	Adhesions
Prolene (Ethicon)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	156.5	Eliminates infection.	Adhesions
Surgipro (Autosuture)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	41.8	Flexible.	Incomplete wound Healing
Prolite (Atrium)	PP	0.8	NO	80–100	Multifilament	138	Flexible	Adhesions.
Trelex (Meadox)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	N.A.	Flexible	Adhesions.
Atrium (Atrium)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	56.2 N/cm	Tolerance to infection.	Adhesions.
Premilene (B-Braun)	PP	0.8	No	80–100	Monofilament	41.4	Flexible.	Adhesions.
Serapren (smooth)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	N.A.	Flexible.	Adhesions.

End of the table 1

Product (Manufacturer)	Material	Pore Size (mm)	Absorbability	Weight (g/m ²)	Filament	Tensile strength (N/cm)	Advantages	Disadvantages
Parietene (Covidien)	PP	0.8	No	80–100	Multifilament	38.9 ± 5.2	Flexible.	Adhesions.
Prolene Light (Covidien)	PP	1–3.6	No	36–48	Monofilament	20	Flexible.	Adhesions.
Optilene (B-Baun)	PP	1–3.6	No	36–48	Monofilament	58	Eliminates pain.	Adhesions.
Mersilene (Ethicon)	POL	1–2	No	40	Multifilament	19	Eliminates infection.	Adhesions.
Goretex (Gore)	ePTFE	0.003	No	Heavy Weight	Multifilament	16	Flexible	Adhesions.

Note: PP – Polypropylene; POL – Polyester; E-PTFE – Expanded polytetrafluoroethylene; PGA – Polyglycolic acid; N.A. – Information not available [6].

Hybrid meshes are created by combination of two materials aiming to obtain advantages of both; i. e. permanent synthetic and resorbable materials; a co-polymer of glycolide and lactide or glycolide/ E caprolactone; providing mechanical support at the sites of defect, followed by gradual absorption, moreover, the combination of some types of permanent synthetic mesh materials and biologically tissue derived anti-adhesive barrier i. e. Zenapro® which is a composite of polypropylene (PP) and a non-cross-linked porcine small cell intestinal submucosa [5].

The second major category of meshes is furtherly subdivided into: non-coated without barriers or even

reinforced, and coated barriers. Uncoated barriers include:

- 1) Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB).
- 2) Ultra-pure fibroin from silk.
- 3) Polyglycolic acid (PGA).
- 4) Co-polymer of glycolide and lactide.
- 5) Co-polymer of polyglycolic acid and trimethylene carbonate and Co-polymer of glycolide.
- 6) Lactide and trimethylene carbonate.

Coated barriers by resorbable composite include: (Poly-4-hydroxybutyrate scaffold paired with a hydrogel of sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose/ polyethyleneglycol [5]. As shown in Table 2.

Table 2

The properties of each type of the second generation meshes

Product (Manufacturer)	Material	Pore Size (mm)	Absorbable	Filament	Tensile strength (N/cm)	Weight (g/m ²)	Advantages	Disadvantages
Vypro, Vypro II (Ethicon)	PP/ polyglactin 910	>3	Partially (42 days)	Multifilament	16	25 and 30	Eliminates pain.	Recurrence
Gore-Tex Dual Mesh Plus (Gore)	e-PTFE	0.003–0.022	No	Multifilament	16	Heavy Weight	Eliminates adhesions.	Infection.
Parietex (Covidien)	POL/ collagen	>3	Partially (20 days)	Multifilament	16	75	Eliminates adhesions.	Infection.
Composix EX Dulex (BARD)	PP/e-PTFE	0.8	No	Monofilament	N.A.	Light Weight	Minimizes adhesions.	Infection.
Proceed (Ethicon)	PP/ cellulose	Large	Partially (<30 days)	Monofilament	56.6	45	Eliminates recurrence	Adhesions.

End of the table 2

Product (Manufacturer)	Material	Pore Size (mm)	Absorbable	Filament	Tensile strength (N/cm)	Weight (g/m ²)	Advantages	Disadvantages
DynaMesh IPOM (FEG Textiltechnik)	PP/PVDF	1–2	Partially	Monofilament	11.1	60	Biocompatibility.	Adhesions.
Sepramesh (Genzyme)	PP/sodium	1–2	Partially (<30 days)	Monofilament	N.A.	102	Reduces adhesions.	Non-flexible
Ultrapro (Ethicon)	PP/PGC-25	>3	Partially (<140 days)	Monofilament	55	28	Reduced inflammatory response.	Adhesions
Ti-Mesh (GfE)	PP/titanium	>1	No	Monofilament	12	16	Reduced inflammatory response.	Low tensile strength
C-Qur (Atrium)	PP/omega 3	>1	Partially (120 days)	Monofilament	170 ± 20.1 N	50	N.A.	Poor anti-adhesion property.

Note: PP: Polypropylene. E-PTFE: Expanded polytetrafluoroethylene. POL: Polyester. PVDF: Polyvinylidene fluoride. PGC-25: poliglecaprone 25. N.A., Information not available in literature [6].

The third category of hernia meshes ‘Biological meshes’, which had been introduced to overcome the complications of synthetic meshes are furtherly divided into: Non-crosslinked: and Crosslinked as presented in Table 3 [5].

Table 3**The properties of each type of the third generation meshes.**

Product (Manufacturer)	Material	Tensile Strength (MPa)	Advantages	Disadvantages
Surgisis (Cook)	Porcine (small Intestinal submucosa)	4	No refrigeration is required. Long history of safety data	Requires hydration. Susceptible to collagenases
FlexHD (JandJ)	Human (acellular dermis)	10	No refrigeration or rehydration is required	*N. A.
AlloMax (Davol)	Human (acellular dermis)	23	No refrigeration or rehydration is required. Available in large sizes	Hydration required.
CollaMend (Davol)	Porcine/Bovine (xenogenic acellular dermis)	11	No refrigeration or rehydration is required. Available in large sizes.	*N.A.
Strattice (LifeCell)	Porcine/Bovine (xenogenic acellular dermis)	18	Available in large sheets.	Limited long-term follow up.
Permacol (Covidien)	Porcine/Bovine (xenogenic acellular dermis)	39	No refrigeration or rehydration is required. Available in large sizes.	*N.A.
XenMatrix (Davol)	Porcine/Bovine (xenogenic acellular dermis)	14	Available in large sheets.	Limited long-term follow up.

Note: *N.A. Information not available in literature [6].

Mesh fixation using tacks, screws, or clips has led to numerous postoperative complications, including, vascular injury, bowel obstruction, mesh migration and neuralgia which are avoided by using Self-gripping meshes: ProGrip™ is PP self-gripping, lightweight, isoelastic; macroporous knitted

monofilament, hydrophilic mesh with absorbable micro-grips providing self-adhesive fixation during the first months after implantation with an absorption time more than 18 months. Moreover, absorption of 40 % of the mesh weight decreases postoperative foreign body sensation and chronic pain. In addition to providing a tack-free fixation during laparoscopic hernioplasty with superior fixation strength compared to Bard 3D Max™ light textile with SorbaFix™ tacks or fibrin sealant, fast recovery, easy to use, and faster than tacks and glue decreasing the cost of laparoscopic inguinal procedure are additional advantages of ProGrip™ orienting it to be a part of the green medical market products [13—16].

Adhesix™ is a self-gripping, double-sided mesh, made of two components. A knitted, monofilament polypropylene mesh (rough side) covered by a resorbable layer of polyethylene glycol (PEG) and polyvinylpyrrolidone (PVP) (smooth side), which upon moistening form a hydrogel that cross-links to the underlying tissue within 5 minutes and resolves within 7 days reducing, mesh weight to <40 g/m² allowing easy movement and repositioning. However, poor integration, seroma formation and shrinkage are drawbacks of meshes Adhesix™ [17, 18].

Antibiotic coated mesh shows the following spectrums of bacterial strain inhibitions [19]:

1. Ampicillin coated PP meshes: *S. aureus* and *E. coli* [20].

2. Gentamicin coated polypropylene/ poliglecaprone (PP/ PGC) and PE — polyester: *S. aureus* and when coated to PVDF — polyvinylidene fluoride: *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* [21,22].

3. Cefazolin coated PGA-TMC — polyglycolic acid– trimethylene carbonate; *S. aureus* while when loaded on PE — polyester meshes: MRSA infection [23, 24].

4. Vancomycin coated PE — polyester meshes: *S. aureus* and MRSA infections [25].

5. Levofloxacin coated PP and PCL — polycaprolactone meshes: *S. aureus*, *E. coli*, while when loaded with silver on PLLA — poly-L-lactide mesh: MRSA infection [26, 27].

6. Ciprofloxacin coated PP meshes: *S. aureus*, *E. coli* infection. PCL/L-DOPA meshes coated by ofloxacin have the same zone of prevention [28, 29].

7. Rifampicin coated meshes: *S. aureus* and *E. coli*, while when loaded with other antibiotics like minocycline or ofloxacin: MRSA infection [1, 30].

3D Meshes

3D printing is bio-dimensional imaging of surgical meshes via layer-by-layer deposition of materials on the mesh surface which is obtained by 7 procedures: (I) fused deposition model (FDM), also known as material extrusion, (II) powder bed fusion, (III) vat photopolymerization, (IV) material jetting, (V) binder jetting, (VI) sheet lamination, and (VII) directed energy deposition, where the choice of procedure depends on many factors; type of mesh material, time of production, cost, availability of equipment, and technical expertise; i.e. FDM is used for the development of non-biological, while powder bed fusion has applications in drug delivery systems. The advantage of such layer-by-layer fabrication system is that the printed layers and compounds used can be tailored to achieve a coordinated balance between drug release and device degradation therefore enhancing tissue repair, moreover, upon loading with contrast-materials, 3D printed meshes were visible on CT [31—37].

Moreover, 4D-printing seems to resolve the limitations of 3D-printed devices to recapitulate the dynamics of living tissues by introducing “time” as a new factor, where smart thermo-polymers capable of shape changes in response to physicochemical or biochemical stimuli (e.g., temperature, pressure, presence of molecules, pH) which can be extruded via FDM approaches. These stimuli-responsive polymers allow the mesh to progressively adapt and respond to changes in the host-tissue environment, enhancing tissue ingrowth and implant compliance. Moreover, this technology can optimize drug delivery systems, enabling drug-loaded printed meshes to release their medication only and specifically when needed e.g., release of antibiotics in the presence of bacterial toxins, release of cytokines and growth factors to stimulate cell migration and vascularization [38, 39].

The choice of suitable mesh implant for hernioplasty is a multifactorial process, depending upon many factors; physical properties, advantages and disadvantages of the given implant as well as patient factors e.g., concomitant morbidities which can increase the incidence of postoperative site infection and the operative field anatomical site, virginity and appropriate site of mesh implantation.

Among the three successive generations of mesh implants; the first generation: permeant non-absorbable mesh implants have the benefit of being long lasting with good tensile strength, beside hybrid mesh subtype possesses having the advantages of both mixed types. The second generation: coated-mesh implants, have the advantage of being light-weight and partially absorbable. The third generation: biological mesh implants are being biologically inert and completely absorbed by the patient tissues. Furthermore, new upgrades have involved these mentioned generation achieving the self-gripping mesh implants, carbon nano-coated mesh implants as well as 3D and even 4D mesh implants aiming at achieving the concept of the most optimal mesh implants with maximum benefits and minimum drawbacks (green meshes).

Conclusion

The concept of optimal or best mesh is unfit for practical application, as the selection of appropriate mesh for every type of hernia repair operation is guided by the properties of the mesh to be chosen in order to fulfill the requirements of the favorable repair.

References/Библиографический список

1. Cole P. The filigree operation for inguinal hernia repair. *Br J Surg*. 1941;29:168—81. doi: 10.1007/978-3-319-78411-3
2. Deeken CR, Abdo MS, Frisella MM, Matthews BD. Physicomechanical evaluation of polypropylene, polyester, and polytetrafluoroethylene meshes for inguinal hernia repair. *J Am Coll Surg*. 2011;212(1):68—79. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2010.09.012
3. Koontz AR. Preliminary Report on the Use of Tantalum Mesh in the Repair of Ventral Hernias. *Ann Surg*. 1948;127(5):1079—85. doi: 10.1097/0000658-194805000-00026
4. Khanna, N. and Jain, Pradeep. The Use Of Marlex Mesh For Incisional Hernia Repair. *Ind. Jour Plast Surg*. 2024;(17):11—13. doi: 10.1055/s-0043-1778480
5. Deeken CR, Lake SP. Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;(74):411—427. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.05.008
6. Brown CN, Finch JG. Which mesh for hernia repair? *Ann. R. Coll. Surg. Engl*. 2010, 92, 272—278. doi: 10.1308/003588410X12664192076296
7. Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Pascual G, Gómez Gil V, Buján J. Peritoneal effects of prosthetic meshes used to repair abdominal wall defects: monitoring adhesions by sequential laparoscopy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2007;17(2):160—6. doi: 10.1089/lap.2006.0028
8. Elango S, Perumalsamy S, Ramachandran K, Vadodaria K. Mesh materials and hernia repair. *BioMed*. 2017;(7).16. doi: 10.1051/bmdcn/2017070316
9. McGinty JJ, Hogle NJ, McCarthy H, Fowler DL. A comparative study of adhesion formation and abdominal wall ingrowth after laparoscopic ventral hernia repair in a porcine model using multiple types of mesh. *Surg Endosc*. 2005;19(6):786—90. doi: 10.1007/s00464-004-8174-9
10. Klinge U, Klosterhalfen B, Ottinger AP, Junge K, Schumpelick V. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. *Biomater*. 2002;23(16):3487—93. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00070-4
11. Klink CD, Junge K, Binnebösel M, Alizai HP, Otto J, Neumann UP, Klinge U. Comparison of long-term biocompatibility of PVDF and PP meshes. *J Invest Surg*. 2011;24(6):292—9. doi: 10.3109/08941939.2011.589883
12. Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. *Hernia*. 1997;(1):15—21. doi: 10.1007/BF02426382
13. Gillion JF, Lepere M, Barrat C. Two-year patient-related outcome measures (PROM) of primary ventral and incisional hernia repair using a novel three-dimensional composite polyester monofilament mesh: the SymCHro registry study. *Hernia*. 2019;(23):767—781. doi: 10.1007/s10029-019-01924-w
14. Tabbara M, Genser L, Bossi M, Barat M, Polliand C, Carandina S, Barrat C. Inguinal Hernia Repair Using Self-adhering Sutureless Mesh: Adhesix™: A 3-Year Follow-up with Low Chronic Pain and Recurrence Rate. *Am Surg*. 2016;82(2):112—6. doi: 10.1177/000313481608200212
15. Edwards C. Self-fixating mesh is safe and feasible for laparoscopic inguinal hernia repair. *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*. Conference: 2011 Scientific Session of the Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons, SAGES San Antonio, TX United States (30.03.2011—02.04.2011). 25: S324.

16. Kolbe T, Hollinsky C, Walter I, Joachim A, Rüllicke T. Influence of a new self-gripping hernia mesh on male fertility in a rat model. *Surg Endosc.* 2010;24(2):455—61. doi: 10.1007/s00464-009-0596-y
17. Benito-Martínez S, Rodríguez M, García-Moreno F, Pérez-Köhler B, Peña E, Calvo B, Pascual G, Bellón JM. Self-adhesive hydrogel meshes reduce tissue incorporation and mechanical behavior versus microgrips self-fixation: a preclinical study. *Hernia.* 2022;26(2):543—555. doi: 10.1007/s10029-021-02552-z
18. Nienhuijs S, Staal E, Strobbe L, Rosman C, Groenewoud H, Bleichrodt R. Chronic pain after mesh repair of inguinal hernia: a systematic review. *Am J Surg.* 2007;194(3):394—400. doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.02.012
19. Mirel S, Pusta A, Moldovan M, Moldovan S. Antimicrobial Meshes for Hernia Repair: Current Progress and Perspectives. *J Clin Med.* 2022;11(3):883. doi: 10.3390/jcm11030883
20. Labay C, Canal JM, Modic M, Cvelbar U, Quiles M, Armengol M, Arbos MA, Gil FJ, Canal C. Antibiotic-loaded polypropylene surgical meshes with suitable biological behavior by plasma functionalization and polymerization. *Biomater.* 2015;71:132—144. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.023
21. Junge K, Rosch R, Klinge U, Kronen C, Klosterhalfen B, Mertens PR, Lynen P, Kunz D, Preiss A, Peltrouche-Llacsahuanga H, Schumpelick V. Gentamicin supplementation of polyvinylidene fluoride mesh materials for infection prophylaxis. *Biomater.* 2005;26(7):787—93. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.070
22. Wiegeling A, Sinha B, Spor L, Klinge U, Steger U, Germer CT, Dietz UA. Gentamicin for prevention of intraoperative mesh contamination: demonstration of high bactericide effect (in vitro) and low systemic bioavailability (in vivo). *Hernia.* 2014;18(5):691—700. doi: 10.1007/s10029-014-1293-x
23. Kilic D, Agalar C, Ozturk E, Denkbaz EB, Cime A, Agalar F. Antimicrobial activity of cefazolin-impregnated mesh grafts. *ANZ J Surg.* 2007;77(4):256—60. doi: 10.1111/j.1445-2197.2007.04029.x
24. Suárez-Grau JM, Morales-Conde S, González Galán V, Martín Cartes JA, Docobo Durantez F, Padillo Ruiz FJ. Antibiotic embedded absorbable prosthesis for prevention of surgical mesh infection: experimental study in rats. *Hernia.* 2015;19(2):187—94. doi: 10.1007/s10029-014-1334-5
25. Blatnik JA, Thatiparti TR, Krpata DM, Zuckerman ST, Rosen MJ, von Recum HA. Infection prevention using affinity polymer-coated, synthetic meshes in a pig hernia model. *J Surg Res.* 2017; 219:5—10. doi: 10.1016/j.jss.2017.05.003
26. Sanbhal N, Li Y, Khatri A, Peerzada M, Wang L. Chitosan Cross-Linked Bio-based Antimicrobial Polypropylene Meshes for Hernia Repair Loaded with Levofloxacin HCl via Cold Oxygen Plasma. *Coati.* 2019(9):168. doi: 10.3390/coatings9030168
27. Song Z, Peng Z, Liu Z, Yang J, Tang R, Gu Y. Reconstruction of abdominal wall musculofascial defects with small intestinal submucosa scaffolds seeded with tenocytes in rats. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(13—14):1543—53. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0748
28. Avetta P, Nisticò R, Faga MG, D'Angelo D, Boot EA, Lamberti R, Martorana S, Calza P, Fabbri D, Magnacca G. Hernia-repair prosthetic devices functionalised with chitosan and ciprofloxacin coating: Controlled release and antibacterial activity. *J. Mater. Chem. B.* 2020(8):1049. doi: 10.1039/C9TB02537E
29. Shokrollahi M, Bahrami SH, Nazarpak MH, Solouk A. Biomimetic double-sided polypropylene mesh modified by DOPA and ofloxacin loaded carboxyethyl chitosan/polyvinyl alcohol-polycaprolactone nanofibers for potential hernia repair applications. *Int J Biol Macromol.* 2020;(15):165(Pt A):902—917. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.229
30. Pérez-Köhler B, Benito-Martínez S, García-Moreno F, Rodríguez M, Pascual G, Bellón JM. Preclinical bioassay of a novel antibacterial mesh for the repair of abdominal hernia defects. *Surg.* 2020;167(3):598—608. doi: 10.1016/j.surg.2019.10.010
31. Awad A, Fina F, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW. Advances in powder bed fusion 3D printing in drug delivery and healthcare. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;(174):406—424. doi: 10.1016/j.addr.2021.04.025
32. Hodgdon T, Danrad R, Patel MJ, Smith SE, Richardson ML, Ballard DH, Ali S, Trace AP, DeBenedictis CM, Zygmunt ME, Lenchik L, Decker SJ. Logistics of Three-dimensional Printing: Primer for Radiologists. *Acad Radiol.* 2018;25(1):40—51. doi: 10.1016/j.acra.2017.08.003
33. Liaw CY, Guvendiren M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine. *Biofabrication.* 2017.7; 9(2):024102. doi:10.1088/1758-5090/aa7279
34. Pantermehl S, Emmert S, Foth A, Grabow N, Alkildani S, Bader R Barbeck M, Jung O. 3D Printing for Soft Tissue Regeneration and Applications in Medicine. *Biomed.* 2021;(9):336. doi: 10.3390/biomedicines9040336
35. Ballard DH, Jammalamadaka U, Tappa K, Weisman JA, Boyer CJ, Alexander JS, Woodard PK. 3D printing of surgical hernia meshes impregnated with contrast agents: in vitro proof of concept with imaging characteristics on computed tomography. *3D Print Med.* 2018;7; 4(1):13. doi: 10.1186/s41205-018-0037-4
36. Do AV, Worthington KS, Tucker BA, Salem AK. Controlled drug delivery from 3D printed two-photon polymerized poly (ethylene glycol) dimethacrylate devices. *Int J Pharm.* 2018;552(1—2):217—224. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.065
37. Mir M, Ansari U, Najabat Ali M. Macro-scale model study of a tunable drug dispensation mechanism for controlled drug delivery in potential wound-healing applications. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2017;15(1): e63-e69. doi:10.5301/jabfm.5000280
38. Lui YS, Sow WT, Tan LP, Wu Y, Lai Y, Li H. 4D printing and stimuli-responsive materials in biomedical aspects. *Acta Biomater.* 2019;92:19—36. doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.005
39. Pravin S, Sudhir A. Integration of 3D printing with dosage forms: A new perspective for modern healthcare. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:146—154. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.167

Выбор оптимального сетчатого имплантата для операций герниопластики в зависимости от свойств сетчатых имплантатов

А. В. Протасов , М.Ш.Ф Мекхаеэль ✉, С.М.А. Салем 

Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация
✉ mekhaeel60@yahoo.com

Аннотация. Серебро и титан были первыми используемыми элементами в эру биоматериалов, укрепляющих грыжу, около ста лет назад, и в настоящее время их количество достигает 150 видов. Уникальность системы классификации сетчатых имплантатов Дикен и Лейк заключается в ее зависимости от свойств используемых материалов при их классификации, где были установлены три основные категории сетчатых имплантатов: постоянные синтетические, рассасывающиеся (биологического происхождения), далее разделенные на композитные и некомпозитные типы, а также гибридные сетчатые имплантаты. Физические характеристики каждой категории определяются размером пор, диаметром нити, толщиной и плотностью. Кроме того, прочность на разрыв, сохранение швов, испытание на одноосное растяжение и плоскостное двухосное растяжение, разрыв шарика позволяют уточнить свойства сетчатого имплантата. Статья посвящена изучению типов сетчатых материалов, используемых для лечения грыж переднебоковой стенки живота, с описанием свойств их каркасных материалов, покрытия и барьеров, а также их усовершенствованию.

Ключевые слова: грыжа, сетчатые имплантаты, система классификации сетчатых имплантатов Дикен и Лейк.

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Вклад авторов: Мекхаеэль М. Ш.Ф., Салем С. М.А. — концепция и дизайн исследования, Протасов А. В. — редактирование рукописи. Все авторы внесли значительный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, а также ознакомились с окончательной версией и одобрили ее перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарности — неприменимо.

Информационное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 05.02.2024. Принята 06.03.2024.

Для цитирования: Protasov A.V., Mekhaeel M. Sh.F., Salem S. M.A. The choice of the optimal mesh implant for hernioplasty operations depending on the properties of mesh implants // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 499–507. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-499-507. EDN: GZZFKW

Corresponding author: Mekhaeel Shehata Fakhry Mekhaeel — PhD, MD, Assistant professor of the department operative surgery and clinical anatomy named after I. D. Kirpatovsky, Medical institute, RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya street 8, Moscow, Russian Federation. E-mail: mekhaeel60@yahoo.com

Protasov A. V. ORCID 0000-0001-5439-9262

Mekhaeel Sh.F.M. ORCID 0000-0002-0381-3379

Salem S. M.A. ORCID 0009-0008-0690-6811

Ответственный за переписку: Мекхаеэль Мекхаеэль Шехата Факхри — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры оперативной хирургии и клинической анатомии им. И. Д. Кирпатовского, медицинский институт, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (РУДН), Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8. E-mail: mekhaeel60@yahoo.com

Протасов А.В. SPIN 3126-7423, ORCID 0000-0001-5439-9262

Мекхаеэль М.Ш.Ф. ORCID 0000-0002-0381-3379

Салем С.М.А. ORCID 0009-0008-0690-68



СТОМАТОЛОГИЯ DENTISTRY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-508-536
EDN HAKGWK

REVIEW
ОБЗОР

Костная пластика расщелин альвеолярного отростка: к вопросу о современной парадигме лечения

А.М. Кузнецов¹ , Х.З. Иманова¹  ✉, А.М. Гусаров¹ , О.С. Яцкевич² ,
М.Е. Зорич³ , Н.Л. Короткова^{1,4} , У.О. Копылова¹ , А.М. Нагайченко¹ 

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, г. Москва, Российская Федерация

²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

³Медицинский сервис «Экомедсервис», г. Минск, Республика Беларусь

⁴Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород, Российская Федерация
✉ hannaيمانова@yandex.ru

Аннотация. *Актуальность.* Одним из наиболее распространенных пороков развития является врожденная расщелина губы, неба и альвеолярного отростка. Костная пластика альвеолярного отростка является неотъемлемой частью реабилитации пациентов, страдающих этой патологией. В данном обзоре литературы рассмотрены современные аспекты хирургической коррекции расщелин альвеолярного отростка. Подходы к выполнению данной операции существенно изменялись с течением времени. Единой концепции на сегодняшний день не существует ввиду того, что вмешательство может влиять на рост верхней челюсти, и того, что подходы, применяемые в детской хирургии, могут быть неэффективны у взрослых пациентов. Весьма актуальным вопросом остается также выбор костно-пластических материалов, поскольку результаты применения этих материалов при других патологиях варьируют. *Цель исследования* — систематизация данных о костно-пластических операциях при расщелинах альвеолярного отростка у пациентов разных возрастов и анализ опубликованных научных работ. *Материалы и методы.* Обзор и анализ литературных источников проводился по ключевым словам на электронных ресурсах баз данных PubMed, Google Scholar, eLibrary, были использованы зарубежные и российские источники. Анализировались научная литература, напечатанная с 1901 по 2024 гг. *Результаты и обсуждение.* На данный момент большинство авторов склоняется к выполнению операции в период раннего сменного прикуса при наличии зачатка бокового резца, либо позднего сменного прикуса (до прорезывания клыка) при его отсутствии. Проведение операции у взрослых пациентов связывают с большей степенью резорбции трансплантата

© Кузнецов А.М., Иманова Х.З., Гусаров А.М., Яцкевич О.С., Зорич М.Е., Короткова Н.Л., Копылова У.О., Нагайченко А.М., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

и дополнительными трудностями. Среди костно-пластических материалов предпочтение отдается аутокости. Наиболее популярным остается аваскулярный аутотрансплантат из области гребня подвздошной кости. Предпринимаются попытки ухода от применения аутоматериалов и сокращения их количества с целью уменьшения повреждения донорских зон. В сложных случаях может возникнуть необходимость применения методик с использованием реваскуляризируемых аутотрансплантатов или протезирования. Большое значение придается ортодонтической подготовленности пациентов. **Выводы.** Подход к пациентам с расщелиной альвеолярного отростка должен быть дифференцированным. Важно учитывать возраст пациента, соматический и стоматологический статусы для выбора наиболее корректной тактики ведения.

Ключевые слова: расщелина альвеолярного отростка, расщелина губы и неба, костная пластика, костно-пластические материалы

Информация о финансировании. Авторы не получали финансовую поддержку для написания и публикации статьи.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования — Кузнецов А.М., Иманова Х.З., Гусаров А.М., Яцкевич О.С., Зорич М.Е., Короткова Н.Л. Сбор и обработка материала — Иманова Х.З., Копылова У.О., Нагайченко А.М. Написание текста — Иманова Х.З. Редактирование текста и утверждение окончательного варианта статьи — Кузнецов А.М., Иманова Х.З., Гусаров А.М., Яцкевич О.С., Зорич М.Е., Короткова Н.Л. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.










Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 04.03.2024. Принята 10.04.2024.

Для цитирования: Кузнецов А.М., Иманова Х.З., Гусаров А.М., Яцкевич О.С., Зорич М.Е., Короткова Н.Л., Копылова У.О., Нагайченко А.М. Костная пластика расщелин альвеолярного отростка: к вопросу о современной парадигме лечения // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 508–536. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-508-536. EDN: HAKGWK

Alveolar clefts bone grafting: on the issue of modern treatment paradigm


Alexey M. Kuznetsov¹ , Khanna Z. Imanova¹  , Artem M. Gusarov¹ ,
Oleg S. Yackevich² , Maryanna E. Zorych³ , Nadezhda L. Korotkova^{1,4} ,
Ulyana O. Kopylova¹ , Artem M. Nagajchenko¹ 

¹Sechenov University, Moscow, Russian Federation

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

³Clinic "Ecomedservice", Minsk, Republic of Belarus

⁴Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

 hannaimanova@yandex.ru

Abstract. Relevance. One of the most common birth defects is congenital cleft lip, palate and alveolar ridge. Modern aspects of surgical correction of alveolar clefts are discussed in this literature review. Approaches to performing this operation have changed significantly over time. A unified concept does not exist to this day due to the fact that the intervention can affect the

growth of the upper jaw, and the fact that approaches used in pediatric surgery may not be effective in adult patients. The choice of osteoplastic materials also remains a very pressing issue, since the results of using these materials for other pathologies vary. *The aim of the study* is to systematize data on osteoplastic surgeries for alveolar clefts in patients of different ages and analyze of published scientific works. *Materials and Methods.* The authors analyzed scientific data in the search engines PubMed, Google Scholar and eLibrary. Scientific literature published from 1901 to 2024 was analyzed. *Results and Discussion.* At the moment, most authors are inclined to perform the operation during the period of early mixed dentition in the presence of a lateral incisor rudiment, or late mixed dentition (before the eruption of the canine) in its absence. Performing surgery in adult patients is associated with a greater degree of graft resorption and additional difficulties. Among osteoplastic materials, preference is given to autologous bone. The most popular remains an avascular autograft from the iliac crest region. Attempts are being made to avoid the use of autologous materials and to reduce its quantity in order to reduce donor morbidity. In complex cases, it may be necessary to use techniques using revascularized autografts or prosthetics. Great importance is attached to the orthodontic preparedness of patients. *Conclusion.* The approach to patients with alveolar cleft should be differentiated. It is important to take into account the patient's age, somatic and dental status to select the most correct management tactics.

Keywords: alveolar cleft, cleft lip and palate, bone grafting, osteoplastic materials

Funding. The authors did not receive financial support for the research, authorship and publication of the review article.

Author contributions. Concept and design of the study — Kuznetsov A.M., Imanova Kh.Z., Gusarov A.M., Yackevich O.S., Zorich M.E., Korotkova N.L. Collection and processing of material — Imanova Kh.Z., Kopylova U.O., Nagajchenko A.M. Writing the text — Imanova Kh.Z. Editing and approval of the final version of the article — Kuznetsov A.M., Imanova Kh.Z., Gusarov A.M., Yackevich O.S., Zorich M.E., Korotkova N.L. All the authors made a significant contribution to the preparation of the manuscript, read and approved the final version before publication.

Conflict of interest statement. The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 24.07.2024. Accepted 03.09.2024.

For citation: Kuznetsov AM, Imanova KhZ, Gusarov AM, Yackevich OS, Zorich ME, Korotkova NL, Nagajchenko AM. Alveolar clefts bone grafting: on the issue of modern treatment paradigm. *RUDN Journal of Medicine.* 2024;28(4):508–536. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-508-536. EDN: HAKGWK

Введение

Врожденная расщелина губы и неба (ВРГН) является тяжелым пороком эмбрионального развития, требующим комплексного своевременного лечения. Распространенность данной патологии широко варьирует и зависит не только от генетических факторов, но и в значительной степени от внешнесредовых влияний [1]. В среднем на каждую тысячу новорожденных рождается один ребенок с ВРГН [2].

Наличие ВРГН оказывает негативное влияние на психологическое и функциональное состояние

ребенка, а в последующем, при неполноценной реабилитации, и взрослого человека. Нарушение эстетических пропорций лица, проблемы с питанием, речью, дыханием, слухом, наличие сопутствующих патологий, стигматизация детей и их семей — все это не может пройти бесследно для личности [3, 4]. Согласно данным Yusof M.S., школьники (пациенты 7—18 лет) с ВРГН имеют более низкое качество жизни по сравнению со сверстниками [4]. Учитывая все это, невозможно переоценить важность реабилитационных мероприятий и комплексной работы команды специалистов с этими пациентами.

Реабилитация пациентов с ВРГН длительна и многоэтапна. Она подразумевает работу не только с хирургом и ортодонтом, но и с оториноларингологом, генетиком, логопедом, психологом и другими специалистами. Неотъемлемой частью хирургической реабилитации является операция костной пластики расщелины альвеолярного отростка [5].

Костная пластика расщелины альвеолярного отростка (КПАО) — операция, направленная на замещение дефекта костной ткани и восстановление непрерывности альвеолярного отростка верхней челюсти. Это вмешательство решает следующие задачи:

- стабилизацию верхнечелюстных сегментов, особенно при двусторонней расщелине;
- создание условий для прорезывания зубов в репаративный регенерат при вторичной костной пластике;
- стабилизацию результатов ортодонтического лечения;
- улучшение условий для проведения последующей стоматогнатической реабилитации;
- устранение ороназальной фистулы;
- коррекцию асимметрии челюстно-лицевой области, благодаря созданию на стороне расщелины костной опоры для крыла носа и мягких тканей верхней губы;
- возможность протезирования на дентальных имплантатах;
- улучшение речи [6—8].

Целью данного обзора является анализ литературы и систематизация данных о костнопластических операциях при расщелинах альвеолярного отростка у пациентов разных возрастов.

Материалы и методы

Обзор и анализ литературных источников проводился по ключевым словам на электронных ресурсах баз данных PubMed, Google Scholar, eLibrary, были использованы зарубежные и российские источники. Анализовались научная литература, напечатанная с 1901 по 2024 гг.

Результаты и обсуждение

Классификации

Крайне важно для понимания темы определить-ся с основными классификационными понятиями. В рамках нашей статьи целесообразно остановиться на классификации видов КПАО и рассмотреть материалы, с помощью которых она осуществляется.

КПАО, в зависимости от возраста выполнения вмешательства, может быть:

- первичной (проводится параллельно с первичной хейлопластикой в возрасте от 3 месяцев до 2 лет);
- ранней вторичной (проводится перед прорезыванием постоянных зубов в возрасте от 2 до 5 лет);
- вторичной (проводится в период сменного прикуса либо раннего (в 6—8 лет, до предполагаемого времени прорезывания латеральных резцов), либо позднего (в 9—12 лет, до предполагаемого времени прорезывания клыков));
- поздней вторичной/третичной (проводится после прорезывания постоянных латеральных резцов или клыков, независимо от возраста пациента) [6, 8, 9].

Также выделяют повторную КПАО, она выполняется при недостаточном объеме костного регенерата после предшествующей операции для рационального протезирования [6—8].

Используемые для КПАО материалы, по версии Dissaux С. и др. (2021), можно систематизировать следующим образом:

- аутотрансплантаты;
- вспомогательные материалы (вещества, при добавлении которых в аутотрансплантат уменьшается степень резорбции костной ткани; к ним относят PRP/PRF и различные клеточные матрицы (скаффолды));
- заменители кости (вещества, показывающие в ряде исследований сходные с аутотрансплантатами результаты, и вещества, на которые возлагаются такие надежды, требующие дополнительных исследований; к ним относят биокерамику, композитные материалы с добавлением BMP-2, клеточную терапию) [9, 10].

По происхождению кости аутоотрансплантаты делят на:

— мембранозные (аутоотранспланты со свода черепа и из нижней челюсти), имеющие общее происхождение с верхнечелюстной костью;

— эндохондральные (аутоотрансплантаты из костей туловища и конечностей) [11—13].

По типу кровоснабжения костный аутоотрансплантат может быть:

— аваскулярным (не имеет собственного кровоснабжения);

— ревааскуляризованным (имеет независимую систему кровоснабжения с перспективой восстановления питания от сосудов, находящихся в реципиентной области), то есть представляющим собой свободный лоскут [7,14].

Структурно аутоотрансплантаты костей могут быть:

— кортикальными;

— кортикально-губчатыми;

— губчатыми;

— содержащими также другие компоненты (надкостницу, фасцию, кожу с подкожной жировой клетчаткой) [7, 14].

Все вышеперечисленные классификации не являются константами. Они могут изменяться с течением времени и представляться по-разному авторами. Необходимо прежде всего понимать смысл тех или иных действий/подходов к пациентам и вмешательству. Одним из ключевых вопросов, требующих глубокого осмысления, является возраст вмешательства.

Какой возраст оптимален для операции?

Чтобы вникнуть в суть рассматриваемой проблемы, совершим краткий экскурс в историю. До XX века хирурги ограничивались лишь мягкотканными маневрами [15]. С наступлением XX века появились первые сообщения о КПАО.

История закрытия альвеолярной расщелины костью началась с «жуткой», как впоследствии выразился Koberg W.R. [16], операции. Eiselsberg F. в 1901 году пересадила фаланги мизинца кисти на сосудистой ножке в область дефекта верхней челюсти

19-летней девушки [17]. Далее начали появляться сообщения о более гуманных методах: Lехer E. в 1908 сообщил об использовании трансплантатов из большеберцовой кости у детей старшего возраста [18], Drachter R. в 1914 году успешно применил ту же донорскую область для закрытия двусторонней расщелины 7-летнему мальчику [19], в 1931 году Veau V. совершил несколько попыток выполнения подобной методики [20]. Эти методы были направлены по большей части на третичную костную пластику. Опыт и наблюдения этих хирургов, однако, не были столь убедительными, и методика широкого применения не находила. Сегодня выполнение третичной остеопластики, особенно у пациентов старше 18 лет, связывают с повышенным риском потери трансплантата и дополнительными трудностями [21, 22].

В 1950-е и 1960-е годы многих хирургов охватил энтузиазм по поводу первичной костной пластики. Идея полноценной ранней реабилитации была привлекательной, также возлагались надежды на этот этап как на средство профилактики деформаций верхней челюсти и носа [23, 24]. Эти надежды не оправдались в течение десятилетий, стали появляться многочисленные сообщения о высокой степени резорбции трансплантата, нарушениях зубного ряда и, что наиболее важно, торможении роста средней зоны лица [25—27]. Так, к примеру, Jolleys A. в 1968 году сравнил группу детей, которым была выполнена данная процедура, с группой больных, в которой не проводилась первичная остеопластика. При этом он не обнаружил каких-либо очевидных преимуществ. Мало того, было установлено, что у пациентов из первой группы было значительное ограничение роста верхней челюсти в поперечном и переднезаднем направлениях с увеличением тенденции формирования перекрестного прикуса [25]. Еще один из основоположников метода первичной ранней остеопластики Pfeifer G. в 1966 году, после наблюдения за результатами подобных операций, пришел к убеждению об отрицательном воздействии оперативного вмешательства на формирование зубочелюстной системы [26]. В настоящее время первичная КПАО в большинстве клиник не выполняется [5—7].

В связи с недостатками, присущими первичной и третичной костной пластике, интерес со временем все больше смещался в сторону вторичной КПАО. К середине 1960-х годов вторичная остеопластика была внедрена во многие центры [28—30]. Воупе P.J. и Sands N.R. в 1972 году сформулировали современные принципы этой операции [31]. Традиционная вторичная остеопластика проводится в период, когда рост верхней челюсти в трансверзальном и переднезаднем направлениях уже закончен, а продолжается только вертикальный рост челюсти. Проводимая в период между 8—12 годами (когда корень постоянного клыка сформирован на $1/2$ — $2/3$), костная пластика не влияет на развитие средней зоны лица и обеспечивает прочную основу для дальнейшего прорезывания клыка [32, 33]. При проведении поздней вторичной КПАО (после прорезывания клыков) у пациентов наблюдается ускоренная резорбция корня клыка, и им чаще требуется дентальная имплантация [34].

Традиционно клык, прилегающий к расщелине, был ключевым зубом, используемым для определения времени вторичной КПАО. Однако некоторые специалисты начали практиковать выполнение вторичной остеопластики в ранний период сменного прикуса (в 6—8 лет) до прорезывания боковых резцов. В 2007 году Ozawa T. и др. сообщили, что у пациентов с прилегающим к расщелине зачатком латерального резца, которым была проведена вторичная КПАО до прорезывания резца, наблюдалась меньшая резорбция трансплантата. Латеральный резец прорезывался в трансплантат и, таким образом, препятствовал атрофическим процессам в трансплантированной кости. Исследователи пришли к выводу, что вторичную КПАО следует проводить в раннем периоде сменного прикуса при наличии у пациента зачатка бокового резца, так как это позволяет сохранить латеральный резец и привести к симметричной и здоровой окклюзии [35]. В 2016 году Dissaux C. и др., сравнив результаты КПАО у пациентов 5 и 10 лет, пришли к аналогичному выводу, оставив под вопросом влияние ранней операции на рост лица [36]. В 2019 году Doucet J.C. и др.

обнаружили, что КПАО в возрасте 6 лет не влияла на рост средней зоны лица, оцениваемый по SNA (Sella-Nasion-A) углу, по сравнению с традиционной операцией, проводимой в возрасте 9—11 лет [37]. Следовательно, латеральный резец может быть дополнительным ключевым зубом для определения сроков вторичной операции. У пациентов с зачатком латерального резца вторичная КПАО в период раннего сменного прикуса способствует сохранению кости и здоровой окклюзии. Однако чтобы предотвратить резорбцию трансплантата, эту операцию не следует проводить до прорезывания клыков при отсутствии зачатка латерального резца. Опрос, проведенный среди 53 мультидисциплинарных групп специалистов по лечению расщелин лица, показал, что вторичная КПАО в возрасте от 6 до 8 лет и в возрасте от 8 до 13 лет проводилась хирургами со схожей частотой (47 % и 49 % соответственно) у пациентов с расщелинами [38]. Недавние публикации также поддерживают более ранний подход [39, 40].

Помимо рассмотренных видов костной пластики существует также такое понятие, как «бескостная костная пластика» или, по-другому, гингивопериостеопластика (ГПП). ГПП впервые предложил Skoog T. в 1965 году. ГПП — это процедура, при которой деснево-надкостничные лоскуты с обеих сторон расщелины первично ушиваются в младенчестве над мертвым пространством костной щели верхней челюсти [41]. Как правило, в центрах, использующих ГПП, перед операцией сближают альвеолярные сегменты с помощью назоальвеолярного молдинга или активных предоперационных ортодонтических аппаратов, таких как устройство Latham. ГПП, однако, не полностью устраняет необходимость вторичной костной пластики у подавляющего числа пациентов, и было показано, что она вызывает ограничение роста верхней челюсти, что приводит к тому, что большему числу пациентов в дальнейшем потребуются ортогнатические вмешательства [42—44]. Несмотря на все минусы и количество противников, споры вокруг данной процедуры окончательно не разрешены.

Возможно, наиболее убедительный аргумент в пользу гингивопериостеопластики был выдвинут в 2010 году Meazzini M.C. и др. Их протокол коррекции односторонних расщелин предусматривает раннюю гингивоальвеолопластику в возрасте 18—24 месяцев наряду с закрытием расщелины твердого неба. У 100 % пациентов, оперированных по данному протоколу, в дальнейшем не было показаний к выполнению костной пластики. К недостаткам методики авторы все же относят ограничение роста челюстей (у 27 % пациентов в группе ранней костной пластики со временем обнаружены показания к остеотомии по Ле-Фор I по сравнению с 10 % в группе детей со вторичной КПАО) [42]. Однако важно отметить более старший возраст когорты ранней ГПП на момент операции, в отличие от возраста пациентов при традиционной ГПП, а также выполнение ГПП в контексте общего протокола.

Не менее важным вопросом является выбор материалов, с помощью которых осуществляется КПАО.

Костно-пластические материалы: от прошлого к будущему

В литературе описана возможность применения невероятно большого количества костно-пластических материалов при расщелине альвеолярного отростка. Возникают вопросы: «Как не потеряться во всем многообразии? На что опираться?» Ответить на эти вопросы несложно, если вспомнить свойства, которыми должен обладать идеальный костный трансплантат:

- остеокондуктивность, то есть обеспечение каркаса (скаффолда) для роста кости путем врастания клеток из реципиентной области;

- остеоиндуктивность, то есть наличие факторов, привлекающих остеопрогениторные клетки, индуцирующих и моделирующих остеогенез с минимальной воспалительной реакцией;

- остеогенность, то есть способность остеогенных клеток донорской области переноситься вместе с трансплантатом и вносить вклад в процессы формирования новой костной ткани;

- иммунологическая инертность;
- обеспечение структурной поддержки для сопротивления силам мышечного сокращения и рубцовым процессам;
- способность выдерживать раннее возвращение к функционированию;
- минимальная или нулевая донорская морбидность;
- отсутствие токсического и пагубного влияний на реципиентную область;
- отсутствие влияния на рост пациента;
- бюджетность;
- неонкогенность [45].

Тогда возникает другой вопрос: «существует ли материал, отвечающий в полной мере всем этим требованиям?» При всем желании ответить утвердительно на данный момент нельзя. Однако есть материал, обладающий большей частью этих свойств — это аутоматериал. Аутоотрансплантаты до сих пор остаются «золотым стандартом» костной пластики во всем мире. Особенно ценно то, что собственная костная ткань обладает всеми тремя механизмами остеоинтеграции (остеогенностью, остеоиндукцией, остеоиндукцией) [46]. Хотя стоит отметить, что большое значение для приживления имеют также техника операции, подготовка к вмешательству и состояние воспринимающего ложа. Даже способ хранения кости после забора до имплантации в альвеолярный дефект важен. Так, например, Hassanein A.H. и др. в 2012 году сравнили жизнеспособность клеток губчатого трансплантата подвздошной кости при хранении трансплантата на льду и при комнатной температуре. Исследователи пришли к выводу, что хранение трансплантата на льду, а не при комнатной температуре увеличивает выживаемость клеток: через 2 часа после забора тканей в охлажденной кости количество жизнеспособных клеток было больше на 22 % [47].

Несмотря на то, что сегодня в арсенале хирургов нет ничего, что давало бы достоверно лучшие результаты, обладая при этом аналогичным профилем безопасности, чем аутооткани, научные исследования последних лет направлены на поиски заменителей костной ткани, тканевую инженерию, а не на поиски

новых донорских участков [48,49]. Достойная замена аутотрансплантатам позволит значительно сократить время операции и отказаться от травмирования донорских участков.

Итак, рассмотрим наиболее известные в наше время костно-пластические материалы через призму вышеперечисленных свойств. Также проведем сравнительный анализ (см. табл. 1).

Аутотрансплантаты

Наиболее часто донорскими участками для взятия аутотрансплантатов при КПАО являются: гребень подвздошной кости, нижняя челюсть, свод черепа, ребро, бугристость большеберцовой кости. Как правило, используются аваскулярные ауто-трансплантаты. В сложных ситуациях может быть рассмотрено применение свободных лоскутов (см. раздел «Сложные случаи: что делать?»).

В этом разделе будут рассмотрены аваскулярные аутотрансплантаты. Перед тем как перейти к их обсуждению, остановимся на некоторых физиологических особенностях нахождения разных по структуре и происхождению аваскулярных трансплантатов в реципиентной зоне краниофациальной области. В фундаментальных исследованиях 1970—1980-х годов велась дискуссия о различиях в физиологии трансплантатов мембранозного и эндохондрального происхождения. В 1974 году Smith J.D. и др. в исследовании на кроликах обнаружили, что мембранозные аутотрансплантаты (из области черепа) почти не подвержены резорбции, в отличие от эндохондральных (из области подвздошной кости), в которых через год после имплантации наблюдалась резорбция до 64% [45]. В исследовании на кроликах и обезьянах Zins J.E. и др. в 1983 году также определили, что трансплантированная мембранозная кость сохраняет больший объем, чем эндохондральная кость, поскольку первая реваскуляризируется быстрее [12].

В противовес этому Wolfe S.A. выразил мнение, что донорский участок и его происхождение не имеют значения, важна лишь структура трансплантата. Wolfe S.A., впрочем, предпочитал кортикально-губчатым подвздошным транспланта-

там кортикально-губчатые трансплантаты из области черепа [50]. Ozaki W. и др. в 1998—1999 годах на основании ряда исследований на кроликах пришли, по существу, к такому же выводу. Используя флюорохромные маркеры и компьютерные томографы, эти ученые обнаружили, что кортикальные трансплантаты, независимо от эндохондрального или мембранозного происхождения, хорошо сохраняют объем, а губчатая кость нижней челюсти или подвздошной кости демонстрирует наибольшую резорбцию. Кроме того, не было выявлено существенной разницы в скорости резорбции между эндохондральными и мембранозными кортикальными костными трансплантатами. Большая скорость резорбции губчатого вещества связывалась с тем, что силы ремоделирования заставляют губчатые костные аутотрансплантаты развивать более плотную, более взаимосвязанную и более механически стабильную микроархитектуру [51—53]. Таким образом, степень резорбции коррелирует с микроархитектурой ауто-трансплантата, а не с его происхождением. Однако позволим себе напомнить, что кости мембранозного происхождения бедны на губчатую ткань и состоят, в основном, из кортикального вещества. Кости же эндохондрального происхождения позволяют забрать больший объем губчатой ткани при необходимости.

Представляет интерес также исследование Rosenthal A.H. и др. (2003 г.), в котором они тоже на кроликах изучали физиологию пересаженных костных компонентов. Однако, в отличие от исследований Ozaki W., ученые размещали кортикальные и губчатые трансплантаты разного происхождения не в позицию «onlay» (при которой трансплантат накладывают на поверхность дефекта), а в позицию «inlay» (при которой трансплантат размещают внутри дефекта), подобно технике размещения трансплантатов при расщелинах альвеолярного отростка. Результаты показали, что, в отличие от «onlay» размещения костных трансплантатов, при «inlay» позиции все костные трансплантаты хорошо сохраняли свой объем и увеличивались в нем с течением времени. При этом наибольший прирост наблюдался в губчатой ткани эндохондрального происхождения. Вывод таков: наблюдается разная

степень резорбции и остеосинтеза при размещении губчатых трансплантатов в разные позиции; регулируются все эти процессы, судя по всему, местными факторами (скорее всего механической средой). Костные трансплантаты, по-видимому, повторяют характеристики кости, в которую они были помещены, а не сохраняют свои природные характеристики [54].

1. Подвздошная кость

Подвздошная кость уже давно является стандартом, с которым сравнивают другие донорские области. С 70-х по настоящее время, несмотря на многочисленные сравнительные исследования между подвздошным аутоотрансплантатом и другими анатомическими участками и материалами, эта область занимает лидирующие позиции в реконструкции альвеолярных расщелин [10]. Секрет подобного успеха кроется в простоте хирургического доступа и возможности забора достаточного количества материала [31].

Трансплантат может забираться из переднего и заднего участков подвздошного гребня. Наиболее удобен передний участок ввиду возможности двухкомандного подхода и сокращения, таким образом, времени оперативного вмешательства [6,45]. Доступ может осуществляться либо классически (с разрезом 2—4 см), либо малоинвазивно (с помощью различных устройств: трепана, чрескожной иглы, цилиндрического остеотома и т.п.). В систематическом обзоре Saha A. и др. (2019г.) сообщается о таких преимуществах минимально инвазивного доступа перед традиционным, как укорочение времени операции, меньшая потребность в анальгетиках, более быстрая выписка из больницы [55].

Трансплантаты могут представлять собой фрагмент губчатой кости, кортикальной пластинки, братья в виде костной стружки либо содержать как губчатое, так и кортикальное вещество в одном блоке. Немаловажно то, что эта область богата губчатой тканью [45, 56, 57]. Губчатая кость содержит большое количество остеогенных клеток и демонстрирует быструю реваскуляризацию, в отличие от кортикальной кости, которая сохраняет объем

за счет ползучего замещения [58, 59]. Использование губчатой кости подвздошной области при вторичной КПАО клинически дает более успешные результаты [56]. При третичной же КПАО более стабильным, надежным и удобным для дальнейшего протезирования является костный блок подвздошной кости (по сравнению с исключительно губчатым трансплантатом) [57].

Основной недостаток забора кости из подвздошной области — донорская морбидность, главным проявлением которой является послеоперационная боль в области гребня подвздошной кости. Причиной послеоперационных болей в месте забора кости является повреждение сухожилий боковых мышц живота и большой ягодичной мышцы с соответствующей стороны. Интенсивность боли во многом зависит от техники операции, и некоторые исследования сходятся во мнении, что эту боль часто переоценивают [60—62]. Большинство пациентов сообщают о боли низкой интенсивности, купируемой парацетамолом. Vaquain Z.H. и др. (2009) и Matsa S. и др. (2012) сообщают, что пациенты могут ходить в течение 24 часов после операции и восстанавливают нормальную походку максимум через 10 дней [63, 64]. Во времена Bergland O. (1986) или Hall H.D. & Posnick J.C. (1983) пребывание в больнице было довольно длительным, с тех пор оно сократилось до 1 или 2 дней [65]. Также, поскольку большая часть пациентов — дети, открытым оставался вопрос о возможном нарушении роста этой области. Однако эти опасения не подтвердились клинически [64].

Несмотря на все преимущества, объем резорбции подвздошного аутоотрансплантата, согласно данным ряда исследователей, остается высоким (до 40 % в 1 год), что подталкивает некоторых хирургов к использованию других донорских областей [65—67].

2. Нижняя челюсть

Нижняя челюсть — это вторая по популярности после подвздошного гребня донорская зона при КПАО. Как правило, аутоотрансплантат забирается из области подбородочного симфиза [68—70], реже из нижнечелюстной ветви [71, 72]. К основному преимуществу

можно отнести «локализацию» вмешательства, его ограничение одним операционным полем. Причем данное операционное поле является привычным и хорошо знакомым для большинства челюстно-лицевых хирургов. Хотя невозможность привлечения двух бригад и увеличивает время операции, невидимые шрамы, отсутствие выраженных послеоперационных болей, небольшой срок госпитализации делают эту область достаточно привлекательной [73, 74]. Неоднократно было показано, что аутооттрансплантаты из области симфиза при расщелинах могут давать аналогичные результаты по сравнению с подвздошными аутооттрансплантатами [68—70].

Тем не менее, поскольку чаще всего используется симфиз нижней челюсти, существуют ограничения, связанные с количеством материала, доступным для забора. Эти ограничения во многом индивидуальны и связаны с анатомией отдельных пациентов [74]. Поэтому обычно этот аутоматериал используется при небольших односторонних расщелинах альвеолярного отростка [75, 76]. Для получения адекватного объема материала и уменьшения степени повреждения донорской зоны некоторые хирурги вполне успешно практикуют смешивание аутоматериала из области нижней челюсти с другими субстанциями (например, с материалом Bio-Oss, бета-трикальцийфосфатом) [72, 76, 77].

Основными рисками этого донорского участка являются потенциальные повреждения десен или корней зубов, особенно когда трансплантат забирается в раннем возрасте [68, 73]. При использовании нижнечелюстного аутооттрансплантата у детей некоторыми авторами сообщается о более высоком проценте ретинированных клыков по сравнению с подвздошным аутооттрансплантатом [78]. Возможна также денервация тканей при травме нижнего альвеолярного или ментального нервов [72—74]. Кроме того, удаление нижнечелюстного симфиза у взрослых может привести к долговременным стойким дефектам формы нижней челюсти [79]. Тщательное предоперационное планирование помогает снизить риск осложнений до минимальных значений [45, 77].

3. Свод черепа

Аутооттрансплантаты со свода черепа успешно применяются при контурной пластике лицевого скелета, поскольку размещаются при этом в позицию «onlay». В случае же с расщелинами альвеолярного отростка, при которых трансплантаты размещаются в позицию «inlay», ситуация не такая однозначная из-за небольшого количества губчатой кости [54, 80]. Результаты использования этого аутооттрансплантата при расщелинах противоречивы. Одни исследователи сообщают о хороших результатах, сопоставимых с использованием подвздошного трансплантата, и аналогичном или даже более благоприятном профиле резорбции [80—82]. Другие же не находят значительных преимуществ применения этой методики и сообщают о результатах, менее успешных по сравнению с подвздошной костью [21, 83, 84].

В литературе сообщается о невысоком уровне осложнений (от 0,25 % [85] до 5,5 % [86]), но осложнения эти потенциально являются грозными, а потому непонятно, насколько оправдано использование этой донорской зоны. Примеры осложнений: ликворея, разрыв твердой мозговой оболочки, остеомиелит свода черепа, повреждения сосудов, включая синусы, эпи- и субдуральные гематомы, неврологические осложнения [85—87]. Неоднозначно также наличие рубца в волосах: с одной стороны, его удобно скрыть за ними, а с другой — у этих пациентов и без того достаточно шрамов на голове после ряда операций. Кроме того, операционное время при использовании этой зоны увеличивается из-за невозможности двухкомандного подхода. Однако послеоперационная болезненность не сильно выражена и хирургический доступ относительно легок [81].

4. Большеберцовая кость

Большеберцовая кость является хорошо зарекомендовавшим себя донорским участком в ортопедии и травматологии. Большая часть опыта использования большеберцовых трансплантатов приходится на взрослых, в основном при травмах [88]. С точки зрения коррекции расщелин эта зона интересна в качестве альтернативного источника

забора губчатой кости, особенно когда требуется небольшое ее количество. Зона позволяет работать двум хирургам одновременно, характеризуется меньшей интраоперационной кровопотерей и менее выраженными послеоперационными болями по сравнению с подвздошной костью [89, 90].

Тем не менее есть ряд недостатков. У детей в области эпифиза находится зона роста, которую важно оставить интактной, поэтому забор материала у детей должен производиться ниже [89]. Также объем трансплантата, который можно забрать из большой берцовой кости, меньше, чем из подвздошной. По данным литературы, у взрослых он ограничен 25 мл [91, 92]. У детей можно осуществлять забор на обеих ногах при необходимости. Количество кортикальной кости также лимитировано [92, 93]. Забор большого количества материала чреват переломами. Так, например, Hughes C.W. и Revington P.J. столкнулись с двумя переломами большеберцовой кости в группе из 75 пациентов с альвеолярными расщелинами, при том что забор ограничивался лишь 5—10 мл костного вещества [93]. В целом, сложно с уверенностью оценивать результаты использования данной области, так как публикаций на эту тему мало в мировой литературе и по их данным нельзя однозначно судить об эффективности подобного подхода (малые выборки, срок наблюдения, отсутствие 3D оценки) [94—96].

5. Ребро

Ребро, в основном, использовалось для первичной КПАО [97—99], что сейчас является крайне редким вмешательством. Вероятно, в настоящее время центры больше предпочитают первичную ГПП [42], чем извлечение и размещение реберного трансплантата. Показатели успеха несколько сомнительны для обеих методик, хотя, основываясь на существующей литературе, маловероятно наличие каких-либо преимуществ реберного трансплантата перед гингивопериостеопластикой.

В сменном же прикусе ребро точно не является методом выбора, так как препятствует прорезыванию зубов и дальнейшей ортодонтической коррекции [99, 100]. К тому же этот способ забора трансплантата

мешает работе двух команд из-за близости донорского места к голове. Также методика не лишена потенциальных осложнений в виде межреберной невралгии, рубцевания, грудного сколиоза (при заборе хряща), пневмоторакса [101—103].

Вспомогательные материалы

Как уже было сказано выше, эти материалы способствуют сохранению объема трансплантационной кости, уменьшая резорбцию, и ускоряют заживление.

1. PRP/PRF

Субстанции, богатые тромбоцитами, давно используются в разных областях клинической медицины. Тромбоциты, содержащие большое количество факторов роста, оказывают положительное влияние на процессы регенерации. При КПАО добавлением плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP), и фибрина, обогащенного тромбоцитами (PRF), хирурги пытаются препятствовать процессам резорбции костной ткани. Осуществляется это теоретически через улучшение заживления ран, стимуляцию неоангиогенеза и остеогенеза [104]. В клинической же практике результаты от применения этих субстанций варьируют. Стоит отметить, что они также могут зависеть от способов получения PRP и PRF и изначальной концентрации тромбоцитов. Эти параметры, к сожалению, сложно стандартизировать.

В ряде исследований, в которых участвовали как взрослые [104, 105], так и дети [106, 107], при добавлении PRP или PRF к подвздошному ауто-трансплантату сообщается о значительном снижении резорбции костной ткани. Также Dayashankara Rao J.K. и др. [106] отмечают более благоприятное влияние методики с добавлением PRF на состояние пародонта при вторичной КПАО по сравнению с контрольной группой. Однако разногласия остаются, потому что в некоторых исследованиях не выявляется статистически значимая разница при добавлении PRP/PRF к подвздошному трансплантату [108, 109]. Таким образом, применять или не применять PRP/PRF — вопрос спорный в наши дни.

2. Скаффолды

Клеточные матрицы (скаффолды) хорошо изучены и активно применяются при реконструкции альвеолярного отростка и наращивании кости в имплантологии. Этот позитивный опыт, к сожалению, нельзя экстраполировать на пациентов с расщелинами из-за иных физиологических особенностей тканей в области альвеолярного дефекта у пациентов с ВРГН. Информации по использованию скаффолдов в качестве изолированного метода при расщелинах немного в литературе. Чаще всего их используют в качестве добавки к аутологичной кости либо к костному морфогенетическому белку-2 (BMP-2) [110].

Можно выделить два типа клеточных матриц: простые «скаффолды», направляющие неоостеогенез, и «мембранные барьеры» (мембраны), которые также блокируют вращение мягких тканей [10].

Непосредственно скаффолды могут быть разные, например: депротенинизированная бычья кость (DBB), человеческий деминерализованный костный матрикс (DBM), деминерализованный зубной матрикс (DDM) [10]. DBB, по-видимому, не дает каких-либо преимуществ по сравнению с изолированным подвздошным аутооттрансплантатом [111]. Хотя, как способ уменьшения донорской морбидности, DBB успешно используется некоторыми авторами [77, 112]. Elfahmawary T.I. и др. в ходе КЛКТ-анализа определили, что меньшие симфизарные трансплантаты нижней челюсти, аугментированные DBB, были равны более объемным трансплантатам гребня подвздошной кости с точки зрения костного заполнения, резорбции трансплантата и плотности кости через 6 месяцев после операции [113]. DBM, судя по некоторым публикациям, может улучшить результаты по сравнению с использованием изолированного подвздошного аутооттрансплантата. MacIsaac Z.M. и др. сравнили скорость прорезывания клыков через трансплантаты гребня подвздошной кости со скоростью прорезывания через аналогичные трансплантаты в комбинации с DBM. Ученые наблюдали более раннее прорезывание клыков в группе без DBM, но более высокие показатели приживления и выживаемости костного трансплантата в группе с добавлением DBM [114].

Мембраны направляют рост кости и блокируют вращение мягких тканей и, таким образом, имеют тенденцию изолировать и сохранять объем костного трансплантата. Мембранные барьеры тоже бывают разные: мембраны из полимолочной и полигликолевой кислот, биодеградируемые мембраны, бесклеточный дермальный матрикс (ADM) [10]. Некоторые успехи при применении мембран также описаны. Xiao W.L. и др. (2016) провели рандомизированное сравнительное исследование с объемной оценкой двух групп: основная группа с использованием ADM в сочетании с подвздошной костью и контрольная группа без ADM. В этом исследовании приняли участие 60 пациентов. Оценивали резорбцию костного трансплантата с помощью КЛКТ через 1 неделю, 3 месяца и 6 месяцев после операции. Скорость резорбции кости была снижена в группе «ADM + подвздошный аутооттрансплантат» по сравнению с контрольной группой (31,69 % против 36,50 %) [115]. Ершова О.Ю. и др. сообщают о большем успехе при использовании трансплантатов подвздошной кости с созданием ложа для трансплантатов из биодеградируемой мембраны по сравнению с изолированным применением аутооттрансплантатов. Они также отмечают, что, по их мнению, мембрана частично замещает функцию надкостницы, так как у пациентов с ВРГН слизисто-надкостничные лоскуты, укрывающие трансплантат, часто рубцово изменены, истончены [116].

Заменители кости

К этой группе материалов относят вещества, показывающие в ряде исследований сходные с аутооттрансплантатами результаты, и вещества, на которые возлагаются такие надежды, требующие дополнительных исследований.

1. Биокерамика

Биокерамика гипотетически может представлять собой идеальный заменитель кости. Дело в том, что она обладает хорошей биосовместимостью и остеоиндуктивным потенциалом. Также этот материал представляет собой каркас, который медленно рассасывается, позволяя новой кости вырасти и стабили-

лизироваться. Причем скорость рассасывания при производстве можно регулировать путем изменения соотношения компонентов кальция и фосфата [10].

Однако на данном этапе крайне мало исследований посвящено использованию биокерамики при расщелинах, необходимы дальнейшие исследования на эту тему. Но те исследования, которые опубликованы, свидетельствуют об обнадеживающих результатах. Результаты, сопоставимые с аутокостью, были обнаружены при использовании биостекла и бета-трикальцийфосфата (b-TCP) [117, 118]. При использовании гидроксиапатита и сульфата кальция сообщалось о результатах, превосходящих аутоматериал [119, 120].

2. Композитные материалы с добавлением BMP-2

Костный морфогенетический белок-2 (BMP-2) является наиболее известным фактором роста, индуцирующим костеобразование. Этот фактор роста обычно комбинируется с другими материалами, такими как бесклеточная коллагеновая губка (ACS), b-TCP, DBM [10]. На данный момент отсутствуют стандартизированные протоколы применения BMP-2. Наиболее часто используемая концентрация BMP-2, по данным литературы, составляет 1,5 мг/мл [121—123]. Ниже этой концентрации костный заменитель полностью неэффективен [121], высокие же концентрации могут приводить к осложнениям из-за гиперстимуляции тканей. Goss J.A. и др. выявили корреляцию между повышенными дозами BMP-2 и увеличением частоты стенозов носа [124].

Большая часть публикаций показывает аналогичную эффективность при применении смеси BMP-2 с ACS/ b-TCP/ DBM/ гидрогелем по сравнению с применением в моноварианте подвздошного трансплантата [123, 125, 126]. Scalzone A. и др. в систематическом обзоре 2019 г., сравнивающим методику с использованием BMP-2 и методику с использованием только аутокости при вторичной КПАО, пришли к такому же выводу [127]. Результаты, сходные с аутокостью, представляют ценность ввиду полного отсутствия необходи-

мости травмировать донорские зоны при таком подходе.

Послеоперационный локальный отек десен является частым побочным эффектом использования BMP-2 [121, 125]. Необходимо подчеркнуть также то, что костные морфогенетические белки и их рецепторы связаны с различными видами рака (легких, молочной железы, простаты и т.д.). BMP могут играть роль как промоторов опухоли, так и супрессоров, в зависимости от клеточной среды и дозировки [128]. Однако, судя по имеющимся в настоящее время данным, у пациентов, лечащихся с применением BMP-2, не существует онкологического риска, который бы выходил за рамки исходного фонового риска у тех, кто не подвергался лечению BMP-2 [129—131]. Поскольку данных о долгосрочной эффективности и безопасности BMP-2 у детей пока, на наш взгляд, недостаточно, применять его следует все же с осторожностью.

3. Клеточная терапия

Преимущества лечения культивированными аутогенными клетками состоят в том, что эти клетки не обладают антигенностью. Клеточная терапия является относительно новым направлением, исследований по применению этой технологии крайне мало на момент публикации этой статьи. Клетки, применяемые в этой области, сложны в культивировании, а стоимость проведения таких исследований высока, что, вероятно, сдерживает многих исследователей [10]. В систематическом обзоре 2021 года Alkaabi S.A. и др. обнаружили лишь 3 публикации, в которых говорилось об использовании клеточной терапии без других регенерирующих субстанций. Авторы пришли к заключению о невозможности сделать выводы об эффективности применения методики при расщелинах, ввиду гетерогенности имеющихся данных. Du F. и др. обнаружили аналогичные результаты по сравнению с аутокостью. Bajestan M.N. и др. сообщили о безопасности применения клеток и не предоставили данных об эффективности. Khojasteh A. и др. сравнили использование подвздошного трансплантата с использованием

комбинаций «стволовые клетки + подвздошный или нижнечелюстной трансплантат», выявили большую эффективность комбинированного подхода [132]. Существуют также другие единичные исследования [133, 134], говорящие о более или менее успешных результатах, но их все равно недостаточно для того, чтобы делать полноценные выводы.

Сложные случаи: что делать?

Далеко не всегда использование аваскулярных аутотрансплантатов, заменителей кости и их комбинаций приводит к хорошим результатам. В некоторых случаях даже ряд повторных операций может увенчаться неудачей, и на это есть свои причины. Какие-либо отдельные причины могут приводить к плохим исходам, либо такие исходы может давать комбинация из разных причин. Итак, рассмотрим их.

1. Большой для расщелины размер дефекта (более 10 мм [135]). Местного потенциала регенерации в таких случаях может быть недостаточно для адекватного восстановления непрерывности альвеолярного отростка при использовании аваскулярных костно-пластических материалов [7, 14, 136].

2. Неудовлетворительное состояние воспринимающего ложа. Пациенты с ВРГН в рамках комплексной реабилитации с раннего детства подвергаются вмешательствам в области расщелин. Любая операция является травмой и сопровождается впоследствии образованием рубцов и фиброзом, выраженным в разной степени у разных пациентов. Фиброз и рубцы способствуют ухудшению кровоснабжения тканей и, как итог, гипоксии. Для приживания аутотрансплантата и остеогенеза важно наличие адекватной васкуляризации [14, 22, 116].

3. Состояние полости рта. Полость рта должна быть санирована на момент операции. Кариес, поражения пародонта, неадекватная гигиена полости рта — все это не способствует хорошим результатам [5, 22].

4. Плохая ортодонтическая подготовленность [9, 77]. См. раздел «периоперационный менеджмент».

5. Низкая комплаентность пациента. Для достижения хороших результатов операции в них должны быть заинтересованы все: пациент с ВРГН, врачи, родители (если пациент несовершеннолетний). Необходимо сотрудничество пациента с врачом и строгое выполнение врачебных предписаний (как до, так и после операции) [5].

6. Неудовлетворительное общее состояние пациента. Сюда относят сложный психологический и социальный статус, наличие врожденных и приобретенных соматических заболеваний, сформированные в течение жизни вредные привычки [5]. Общее состояние пациента влияет также на состояние воспринимающего ложа и иногда может характеризовать его комплаентность.

7. Возраст пациента. Размер дефекта может увеличиваться в процессе взросления из-за потери зубов вследствие плохого состояния полости рта. С возрастом состояние реципиентного ложа ухудшается из-за предшествующих оперативных вмешательств. Также, как правило, ухудшается общее состояние организма. Кроме того, могут наблюдаться скелетные аномалии окклюзии зубных рядов, осложненные неудовлетворительным ортодонтическим и ортопедическим лечением [5, 22].

8. Некорректная техника операции, низкий уровень подготовки хирурга, недостаточное количество опыта в лечении данной патологии. Так, к примеру, Sakamoto Y. и др. провели ретроспективный анализ, целью которого было выявить, влияет ли клинический опыт хирурга на выживаемость трансплантатов при костной пластике расщелин альвеолярного отростка или достаточно хирургической подготовки. Исследовали результаты операций одного хирурга, прооперировавшего 100 пациентов с расщелиной альвеолярного отростка с 2012 по 2019 годы. Ученые пришли к выводу, что количество опыта хирурга влияло на результаты КПАО [136].

В случаях, когда дефект не поддается стандартной коррекции, хирург, который ведет паци-

ента, на наш взгляд, должен честно спросить себя: «Верю ли я, что смогу сделать эту операцию этому пациенту лучше, чем последний хирург, или лучше, чем предыдущую? Стоит ли пытаться выполнять одну и ту же операцию очередной раз и ожидать другого результата?» Если хирург не уверен в своих силах, то, возможно, более правильным будет либо перенаправить пациента к другому хирургу (например, микрохирургу), либо (в крайних случаях) прибегнуть к протезированию. Нерациональный подход усложняет условия работы для других специалистов, так как каждое следующее вмешательство ухудшает состояние воспринимающего ложа для последующей операции, что в том числе снижает вероятность успеха [137].

Остается вопрос: «Неужели в случае неудовлетворительных результатов КПАО с использованием аваскулярных костно-пластических материалов не существует более эффективных способов помощи и единственный выход — постановка протеза?» Нет, перед тем как прибегнуть к протезированию, можно рассмотреть вариант использования ревааскуляризуемых костных аутотрансплантатов. Свободные лоскуты могут служить методом «спасения» в действительно сложных случаях. Как правило, такие операции показаны при обширных (для расщелин) дефектах и отсутствии удовлетворительных результатов от ряда аваскулярных костных пластик, чаще у взрослых пациентов [5, 22].

Свободные костные лоскуты также, как и аваскулярные аутотрансплантаты, обеспечивают поддержку для тканей верхней губы и носа, позволяют в дальнейшем устанавливать зубные имплантаты, благодаря восстановлению непрерывности зубного ряда. Главное преимущество ревааскуляризуемых аутотрансплантатов — в их независимости от состояния воспринимающего ложа [7, 14]. Кроме того, было показано, что они могут улучшать локальный статус благодаря новому источнику кровоснабжения [22].

Тип используемого свободного лоскута должен определяться размером дефекта и конечной целью реабилитации. Типичными примерами свободных костных лоскутов являются малобер-

цовый, подвздошный, лопаточный и др. Разными авторами описаны различные варианты применения ревааскуляризованных аутотрансплантатов при расщелинах [138—140]. Костные дефекты при расщелинах альвеолярного отростка обычно ограниченные, за некоторыми исключениями. При обширных дефектах целесообразно применять малоберцовый, лопаточный или подвздошный лоскуты [141]. К примеру, описан способ одномоментного закрытия дефектов альвеолярного гребня при двухсторонних расщелинах подвздошным ревааскуляризуемым лоскутом [140]. При ограниченных же дефектах могут быть рассмотрены височно-теменной костно-фасциальный лоскут, лучевой свободный лоскут предплечья и лоскут медиального мышцелка бедренной кости [139, 141]. Подвздошный лоскут тоже мог бы применяться с этой целью ввиду большого количества преимуществ, однако поскольку он, помимо костного компонента, требует включения в его состав внутренней косой мышцы живота для адекватного его питания, это придает ему дополнительный объем. Лопаточный свободный лоскут трудно адаптировать по форме [139]. Теменной ревааскуляризуемый лоскут неплохо моделируется под ограниченный дефект [142, 143], однако, как и аваскулярные лоскуты со свода черепа, содержит мало губчатого вещества, которое может быть необходимо для полноценного заполнения щели [139, 143]. Таким образом, из костных свободных лоскутов, в большинстве случаев, при резистентных расщелинах альвеолярного отростка применяются лоскуты из областей бедра и предплечья [138].

Лоскут медиального мышцелка бедренной кости

Лоскут медиального мышцелка бедренной кости (medial femoral condyle flap, MFCCF), или, как его называют в России, надкостично-кортикальный бедренный лоскут (НКБЛ), был впервые применен в 1991 году Sakai К. и др. [14, 141]. Этот лоскут небольшой по размерам и форме, забирается на сосудистой ножке из медиальной области бедра, легко адаптируется в реципиентной зоне. После

забора размещается интраорально, выполняются анастомозы: нисходящие коленные артерии и вены анастомозируются с лицевыми артериями и венами «конец-в-конец». Помимо собственного источника кровоснабжения, лоскут содержит в своем составе надкостницу, что помогает поддерживать высокий регенеративный и остеоиндуктивный потенциал в зоне его применения. Большая часть опыта использования НКБЛ относится ко взрослым пациентам [14], хотя недавно (в 2021 г.) Colen D.L. и др. описали методику использования MFCSF у детей. Эти авторы сообщают о безопасности его применения в педиатрии. Также описывают технику, позволяющую избежать травмирования зон роста [144].

Исследований с использованием НКБЛ для пациентов с ВРГН не так много, однако те, которые есть сегодня, говорят об эффективности метода. В ЦНИИС и ЧЛХ в 2017—2019 гг. изучали пациентов с расщелиной альвеолярного отростка в возрасте 18—47 лет. 22 пациента разделили на 2 группы: основную группу из 11 пациентов, коррекция расщелин которой осуществлялась с использованием НКБЛ, и контрольную группу из 11 пациентов, костную пластику которым осуществляли аваскулярными аутооттрансплантатами. 18 из 22 пациентов имели в анамнезе от 1 до 3 неудачных костно-пластических операций различными аваскулярными трансплантатами, у 4 пациентов попыток устранения дефекта не проводилось. В основной группе у 9 из 11 пациентов получены хорошие результаты (в 2 случаях отторжение), в контрольной группе получены 10 неудовлетворительных результатов и 1 удовлетворительный результат. Также у обеих групп до и после операции исследовался характер кровотока. У всех пациентов до операции были зарегистрированы нарушения кровотока в области расщелины. После операции в группе пациентов с применением микрохирургической техники отмечалось значительное улучшение микроциркуляции (увеличение перфузии, скорости кровотока, индекса PEI, уменьшение времени накопления контраста), в отличие от контрольной группы,

в которой существенных изменений характера кровотока не наблюдалось. Также исследователи отметили отсутствие резорбции реваскуляризованных аутооттрансплантатов через 6 месяцев после операции. Таким образом, применение НКБЛ может быть неплохим выбором для некоторых пациентов [22]. Gaggi A. и др. (2011 г.) исследовали группу из 5 взрослых пациентов, имеющих альвеолярные расщелины, не поддающиеся стандартным методам лечения. Всех пациентов оперировали с трансплантацией НКБЛ. Авторы сообщили о хороших результатах во всех случаях, отторжений лоскутов и серьезных осложнений не было ни у одного пациента [139]. Ряд других авторов также демонстрирует обнадеживающие результаты при применении MFCSF у пациентов с расщелинами [145, 146].

Лучевой свободный лоскут предплечья

Лучевой свободный лоскут предплечья (radial forearm free flap, RFFF), впервые описанный в 1983 году, является «рабочей лошадкой» во многих направлениях реконструктивной хирургии. Его мягкотканый компонент тонкий, гибкий, он имеет длинную надежную сосудистую ножку (лучевой сосудистый пучок), что позволяет использовать большие участки кожи при небольшом объеме подкожной жировой клетчатки. Однако, когда забирается участок лучевой кости, создается высокий риск переломов. При заборе мягкотканого компонента может потребоваться закрытие донорской зоны аутооттрансплантатом кожи [139, 141]. Что касается его применения в педиатрии, авторы данного обзора не нашли данных о безопасности применения данного лоскута с включением костного компонента у детей. Однако, несмотря на минусы, значительное преимущество RFFF в том, что он позволяет устранить одномоментно с ограниченным костным дефектом почти любые мягкотканые дефекты реципиентной области при ороназальном сообщении, для закрытия которых может быть недостаточно близлежащих тканей [138]. Сравнительная характеристика костно-пластических материалов представлена в Таблице.

Таблица

Сравнительная характеристика костно-пластических материалов

Тип материала	Преимущества	Недостатки	Особенности
АТ из гребня подвздошной кости	Гистосовместимость Неиммуногенность Возможность забора большого количества материала Простота хирургического доступа Одновременная работа двух команд	Больше болезненность Видимые рубцы Резорбция до 40 % в 1 год	«Золотой стандарт», особенно с минимально инвазивной техникой
Нижнечелюстной АТ	Гистосовместимость Неиммуногенность Одно операционное поле Отсутствие видимых послеоперационных рубцов Меньше послеоперационная болезненность	Возможность сосудистой/нервной травмы (подбородочный нерв, нижний альвеолярный нерв) Количественные ограничения при заборе материала Риск повреждения зубов и десен, нарушения прорезывания клыков. При неправильной технике возможна деформация нижней челюсти	-
АТ кости свода черепа	Гистосовместимость Неиммуногенность Возможность скрыть рубцы Меньше послеоперационная болезненность Легкий доступ	Потенциальные серьезные осложнения (ликворея, разрыв твердой мозговой оболочки, повреждение сосудов, включая синусы, эпи- и субдуральная гематома) Наличие рубца на голове	-
АТ из большой берцовой кости	Гистосовместимость Неиммуногенность Альтернативный источник губчатой кости Одновременная работа двух команд Меньше послеоперационная болезненность Меньше интраоперационная кровопотеря	Риск переломов Возможность повреждения зоны роста у детей Количественные ограничения при заборе материала	-
Реберный АТ	Гистосовместимость Неиммуногенность	Больше болезненность Возможность сосудистой/нервной травмы (межреберная невралгия) Больше операционное время Видимые рубцы Риск интраоперационного пневмоторакса Плохо поддается ортодонтической коррекции	Исторически применялся для первичной КПАО
Биокерамика	Биосовместимость Хорошие osteoconductive и osteoinductive свойства Снижение времени операции и морбидности Снижение величины кровопотери Меньше болезненность Результаты аналогичны аутокости	-	Необходимы дальнейшие исследования, данных недостаточно для полноценного анализа
Композитные материалы с добавлением BMP-2	Снижение времени операции и морбидности Снижение величины кровопотери Меньше болезненность Результаты аналогичны аутокости	Высокая стоимость Местные тканевые реакции (отек десен) Стенозы носа при повышенных дозах Роль BMP в развитии онкологических процессов	Необходимы дальнейшие исследования BMP-2 используется в комбинации, как правило, со скаффолдами или биокерамикой
Клеточная терапия	Гистосовместимость Неиммуногенность Снижение времени операции и морбидности Снижение величины кровопотери Меньше болезненность Результаты аналогичны аутокости (?)	Высокая стоимость Сложность культивирования клеток	Необходимы дальнейшие исследования, данных недостаточно для полноценного анализа

Окончание таблицы

Тип материала	Преимущества	Недостатки	Особенности
MFCF	Гистосовместимость Неиммуногенность Успех не зависит от состояния принимающего ложа Минимальная донорская морбидность Подходит для применения у детей Не подвержен резорбции	Длительная операция, требующая микрохирургических навыков Риск переломов при объемном заборе кости Длительный период госпитализации Риск отторжения лоскута Операция требует планирования	Способ «спасения» Свободный лоскут, источник васкуляризации: нисходящие коленные сосуды. Реципиентные сосуды: лицевые сосуды
RFFF	Гистосовместимость Неиммуногенность Успех не зависит от состояния принимающего ложа Не подвержен резорбции Позволяет одновременно закрыть дефекты мягких тканей Длинная сосудистая ножка	Длительная операция, требующая микрохирургических навыков Высокий риск переломов лучевой кости Высокая донорская морбидность Длительный период госпитализации Риск отторжения лоскута Операция требует планирования Нет данных о безопасности применения лоскута с включением кости у детей	Способ «спасения» Свободный лоскут, источник васкуляризации: лучевые сосуды. Реципиентные сосуды: лицевые сосуды

Примечание: АТ, аутотрансплантат; BMP-2, костный морфогенетический белок-2; MFCF, лоскут медиального мышцелка бедренной кости; RFFF, лучевой свободный лоскут предплечья.

Table

Comparative characteristics of osteoplastic materials

Material type	Advantages	Disadvantages	Peculiarities
Iliac crest BG	Histocompatibility Nonimmunogenic Ability to obtain large amount of material for grafting Ease of surgical access Simultaneous work of two teams	Increased pain Visible scars Resorption up to 40 % in 1 year	Current gold standard, particularly with minimally invasive technique
Mandible BG	Histocompatibility Nonimmunogenic Same operative field Absence of visible postoperative scars Decreased postoperative pain	Vascular or neurologic injury (mental nerve, inferior alveolar nerve) Decreased volume of bone graft The risk of damage to teeth and gums, disruption of canine eruption If the technique is incorrect, deformation of the lower jaw is possible	-
Calvarial BG	Histocompatibility Nonimmunogenic Hidden scar Decreased postoperative pain Ease of surgical access	Potential serious complications (cerebrospinal fluid leak, dural tear, vascular injury including sinuses, epi- and subdural hematoma) The presence of a scar on the head	-
Tibial BG	Histocompatibility Nonimmunogenic An alternative source of cancellous bone Simultaneous work of two teams Decreased postoperative pain Decreased blood loss	Risk of fractures Possibility of damage to the growth plate in children Decreased volume of bone graft	-
Rib BG	Histocompatibility Nonimmunogenic	Increased pain Vascular or neurologic injury (intercostal neuralgia) Increased operative time Visible scars Risk of intraoperative pneumothorax Poor orthodontic tooth movement	Historically used for primary BG

End of the table 1

Material type	Advantages	Disadvantages	Peculiarities
Bioceramics	Biocompatibility Good osteoconductive and osteoinductive properties Reduced operation time and morbidity Decreased postoperative pain Decreased blood loss The results are similar to autologous bone	-	Further research is needed, the data is insufficient for a full analysis
BMP-2 Composite Bone Substitutes	Reduced operation time and morbidity Decreased postoperative pain Decreased blood loss The results are similar to autologous bone	High price Local tissue reactions (swelling of the gums) Nasal stenosis at higher doses The role of BMP in the development of oncological processes	Further research is needed BMP-2 is typically used in combination with scaffolds or bioceramics
Cell therapy	Histocompatibility Nonimmunogenic Reduced operation time and morbidity Decreased postoperative pain Decreased blood loss The results are similar to autologous bone (?)	High price Difficulty in culturing cells	Further research is needed, the data is insufficient for a full analysis
MFCF	Histocompatibility Nonimmunogenic Success does not depend on the condition of the receiving bed Minimal donor morbidity Suitable for use in children Not subject to resorption	Lengthy operation requiring microsurgical skills Risk of fractures when harvesting large amounts of bone Long-term hospitalization Risk of flap failure The operation requires planning	The method of «salvation» Free flap, source of vascularization: descending genicular vessels. Recipient vessels: facial vessels.
RFFF	Histocompatibility Nonimmunogenic Success does not depend on the condition of the receiving bed Not subject to resorption Possibility of immediate closure of soft tissue defect Long vascular pedicle	Lengthy operation requiring microsurgical skills High risk of radius fractures High donor morbidity Long-term hospitalization Risk of flap failure The operation requires planning There is no data on the safety of bone flaps in children	The method of «salvation» Free flap, source of vascularization: radial vessels. Recipient vessels: facial vessels.

Note: BG, bone graft; BMP-2, bone morphogenetic protein-2; MFCF, medial femoral condyle flap; RFFF, radial forearm free flap.

Периоперационный менеджмент

Успех оперативного вмешательства зависит от многих факторов.

1. Предоперационная подготовка

Перед операцией следует:

1. Оценить совместно с ортодонтом необходимость предоперационного ортодонтического лечения. Оптимальной является ситуация, когда до операции верхняя челюсть уже расширена и зубы по возможности выровнены в зубной дуге. Доказано, что у ортодонтически подготовленных пациентов степень послеоперационной резорбции

трансплантата выражена меньше и, соответственно, результаты операции лучше [9, 77, 147]. Хирургическое вмешательство следует рассматривать как компонент комплексного ортодонтического лечения, а не наоборот.

2. Выбрать оптимальный возраст вмешательства (по возможности). Если пациент — кандидат на вторичную КПАО, при нахождении зачатка бокового резца на функциональной стороне расщелины существует необходимость выполнения костной пластики в более раннем возрасте (в раннюю фазу сменного прикуса). Если зачатка бокового резца нет, то целесообразно брать па-

циента на операцию перед прорезыванием клыка [35—37].

3. Оценить размеры дефектов мягких тканей и костей. Оценка мягкотканного дефекта нужна для того, чтобы выбрать оптимальный по форме и размеру лоскут с учетом сохранения его кровоснабжения для укрытия трансплантата. Оценка размеров костного дефекта верхней челюсти проводится с целью планирования объемов трансплантируемого костного фрагмента, который необходимо взять для устранения расщелины [83].

В последнее время приобретает популярность определение объема дефектов альвеолярной расщелины с помощью 3D-технологий. Клиническая оценка не всегда точна и надежна. Чтобы оценить максимально точно объем и архитектуру дефекта, по данным КТ с использованием специального программного обеспечения моделируют дефект. Модели печатают на 3-D принтере. 3D-печатные модели полезны, поскольку они обеспечивают тактильные ощущения, которые могут помочь хирургам понять неправильную анатомическую структуру, ограничения при реконструкции и фактический объем кости. Более того, модели позволяют хирургам планировать операции и напрямую определять объем необходимого трансплантата. Глобально данная технология помогает снизить количество реопераций так как они в том числе связаны с неправильным определением нужного количества материала [77, 148, 149].

4. Выбрать подходящий костно-пластический материал, принимая во внимание в том числе возраст пациента. При вторичной КПАО целесообразно применение губчатого трансплантата, в более старшем возрасте — кортикального/кортикально-губчатого [9, 56, 57].

5. Подготовить пациента соматически и санировать полость рта. Любые очаги инфекции повышают риск возникновения осложнений. Обострение хронических заболеваний и острые заболевания снижают жизненные силы организма и тоже не способствуют хорошим исходам. Поражения полости рта также должны быть устранены заранее [5,22].

6. Учитывать, что при наличии двухсторонней расщелины в план лечения должно входить 2 оперативных вмешательства, также важно [9, 77].

2. Хирургическое вмешательство

Во время операции необходимо выполнить 3 основополагающие вещи [6, 150, 151].

Во-первых, закрыть ороназальную фистулу. Следствием наличия сообщения между полостями носа и рта является склонность к возникновению заболеваний ЛОР-органов и полости рта из-за совмещения разных экобиотопов [152, 153].

Во-вторых, разместить в расщелину альвеолярного отростка достаточный объем костно-пластического материала.

В-третьих, обеспечить адекватное укрытие трансплантата слизисто-надкостничными лоскутами. Ткани должны быть ушиты герметично, но без натяжения.

Ход операции [6, 150, 151]:

Водным раствором хлоргексидина орошают полость носа и рта, протирают зубы. В области вмешательства осуществляют инфильтрацию тканей физиологическим раствором с добавлением местного анестетика и адреналина. Дизайн разрезов индивидуален и зависит в том числе от предполагаемого плана перемещения мягких тканей (рис. 1а). Разрез делают вдоль альвеолярной щели, доходящей до задней поверхности оставшегося носогубного свища на твердом небе. Иногда задняя часть свища полностью выявляется только во время диссекции. Разрез на вестибулярной стороне альвеолярной щели простирается к грушевидному отверстию (рис. 1б). Осуществляют диссекцию поднадкостнично, после чего приступают к ушиванию слизистых носа и неба. На слизистую носа, проходящую вдоль дна полости носа и частично вывернутую из области расщелины, накладывают швы «изнутри кнаружи» (по направлению от задней части фистулы к преддверию рта). Иногда мешают нижние носовые раковины, и требуется их перемещение или редукция. Затем ушиваются слизисто-надкостничные лоскуты твердого неба и язычной поверхности альвеолярного отростка (рис. 1в).

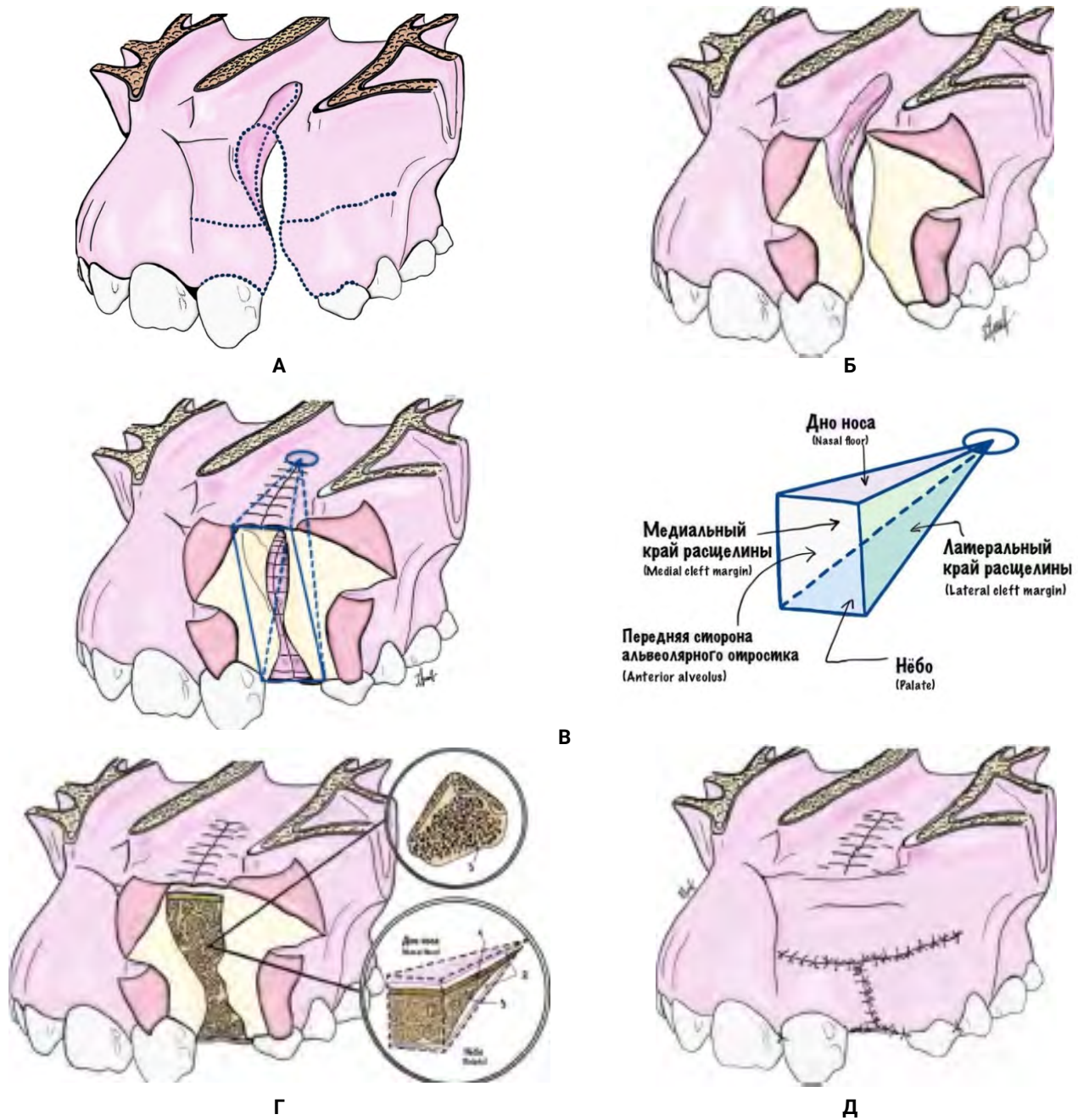


Рисунок 1. Костная пластика расщелины альвеолярного отростка по de Barros Dias B.S. и др. [155], ход операции. **А** – По запланированным линиям осуществляют разрезы (линии отмечены пунктиром); **Б** – вид операционной раны в процессе диссекции после осуществления разрезов; **В** – ушиваются слизистые носа и неба; **Г** – в область дефекта укладывается костно-пластический материал, например, как на рисунке, где 1 – кортикальная пластинка, 2 – выстилка из мембраны, 3 – губчатый аутографт; **Д** – вид раны после операции

Figure 1. Alveolar cleft grafting by de Barros Dias B.S. et al. [155], progress of the operation. **A** – Cuts are made along the planned lines (the lines are marked with a dotted line); **B** – the appearance of surgical wound during the dissection process after making the incisions; **B** – the mucous membranes of the nose and palate are sutured; **Г** – osteoplastic material is placed in the area of the defect, for example, as in the picture, where 1 – cortical plate, 2 – membrane lining, 3 – cancellous autograft; **Д** – the appearance of wound after surgery

После создания «кармана», который можно представить в виде четырехугольной пирамиды (рис. 1в), в него плотно размещается костно-пластический материал (рис. 1г; табл. 1). Некоторые хирурги практикуют «укрепление» дна полости носа кортикальной пластинкой аутокости [151]. Распространенной практикой является выстилание «кармана» различными мембранами [7, 115, 116]. При необходимости костно-пластический материал фиксируется титановыми мини-пластинами, либо биорезорбируемыми пластинами. Фиксация биорезорбируемыми пластинами требует от хирурга большей квалификации, но имеет преимущества: такие пластины меньше препятствуют прорезыванию зубов, не требуют повторного вмешательства с целью их удаления, снижают влияние на рост и развитие верхней челюсти, уменьшают объем фиксирующей конструкции, что способствует более благоприятному заживлению [7, 9, 154].

В конце накладываются швы на вестибулярной стороне альвеолярного отростка верхней челюсти, таким образом, дефект «закрывается» (рис. 1д). Для лучшей мобильности лоскутов при больших дефектах могут делаться насечки на надкостнице (послабляющие разрезы). Однако это требует осторожности, так как деваскуляризация десневых лоскутов не является хорошей перспективой. Также иногда не представляется возможным закрыть дефект без натяжения прилежащими к расщелине тканями. В таких случаях могут рассматриваться более сложные лоскуты, например: слизисто-мышечный лоскут на лицевой артерии (FAMM), ротационный щечный лоскут в виде «пальца», язычный лоскут и другие [137].

3. Послеоперационное ведение.

Назначение антибиотиков при КПАО, как правило, ограничивается одним днем. Пролонгированные схемы, согласно данным литературы, не имеют существенных преимуществ [150, 156]. Из антибиотиков обычно используются цефалоспорины, клиндамицин и амоксициллин [157]. Для уменьшения послеоперационной боли могут применяться различные способы обезболивания: наркотические и ненаркотические анальгетики, блокады нервов и др. При этом нужно ориентироваться на выраженность болевых ощущений

с использованием, например, визуально-аналоговой шкалы [150, 158]. Особое внимание уделяется гигиене полости рта. После операции можно сразу начинать чистить зубы мягкой зубной щеткой и применять хлоргексидиновые ванночки для рта 2 раза в день в течение 1 недели. Пациентам рекомендуют вставать и ходить сразу после операции. В течение двух недель пациенты находятся на «мягкой» диете, на 1 месяц ограничиваются интенсивные физические нагрузки. Швы снимаются через 2 недели. Ортодонтическое лечение можно продолжать через 6 недель [150]. Также важен мониторинг внутриротового отека сразу после операции, особенно среди пациентов, которым использовали ВМР-2, так как есть риск возникновения затруднения дыхания и тризма [157, 158].

Для оценки послеоперационных результатов могут использоваться различные шкалы: Bergland, Chelsea, Kindelan и др. Эти шкалы применимы для 2D рентгеновских снимков. Недостаток их в том, что эксперты могут трактовать результаты по-разному, оценку сложно стандартизировать. Трехмерный рентгенографический анализ является более точным, но связан с повышенными дозами облучения [159].

В отдаленном послеоперационном периоде могут планироваться такие вмешательства, как дентальная имплантация, ортогнатические операции, эстетические операции. Эти «маневры» помогают наиболее полно реабилитировать пациентов и улучшить качество их жизни [5].

Выводы

1. Пациенты с ВРГН нуждаются в комплексной реабилитации. Важной частью этой реабилитации является операция по восстановлению непрерывности альвеолярного отростка верхней челюсти. В наши дни оптимальным возрастом для выполнения этого вмешательства является промежуток с 6 до 12 лет. В случае наличия зачатка бокового резца, судя по последним данным, более предпочтителен период раннего сменного прикуса (6—8 лет). В противоположном случае операцию лучше выполнить до прорезывания клыка (9—12 лет).

2. Аутоотрансплантаты остаются «золотым стандартом» костной пластики. Аваскулярный аутоотрансплантат из области гребня подвздошной кости занимает лидирующие позиции и является в наши дни стандартом, с которым сравнивают другие костно-пластические материалы.

3. Несмотря на то, что аутоотрансплантаты до сих пор являются «рабочими лошадками», фокус внимания с них все больше смещается в сторону регенеративной медицины, а не на поиск новых донорских участков. Научное сообщество возлагает надежды на будущие достижения в области регенеративной медицины, ведь в перспективе они могут помочь хирургам полностью избавиться от травмирования донорских участков.

4. Подход к пациентам с расщелиной альвеолярного отростка должен быть дифференцированным. Методика, работающая у одного пациента, может оказаться порочным кругом для другого. Важно учитывать возраст пациента, анамнез, местный и общий статусы и другие показатели для выбора наиболее корректной тактики ведения пациента.

References/Библиографический список

1. Neudakhin EV, Prityko AG, Kugushev AYU, Meshcheryakova TI, Suleymanov AB. Pathogenic pattern of somatic disorders in children with congenital cleft lip and palate in associated connective tissue dysplasia. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2021;4(4):362—369. (In Russian). doi:10.32364/2618-8430-20214-4-362-369 [Неудакхин Е.В., Притыко А.Г., Кугушев А.Ю., Мещереякова Т.И., Сулейманов А.Б. Патогенетические особенности соматической патологии у детей с врожденной расщелиной губы и нёба при сопутствующей дисплазии соединительной ткани // РМЖ. Мать и дитя. 2021. Т. 4. № 4. С. 362—369.]
2. Abdurakhmanov AZ, Postnikov MA, Yakubova ZKh, Pankratova NV. Prevalence of cleft lip and cleft palate in some regions of eurasia. *Avicenna Bulletin*. 2021;23(2):262—268. (In Russian). doi:10.25005/2074-0581-2021-23-2-262-268 [Абдурахманов А.З., Постников М.А., Якубова З.Х., Панкратова Н.В. Распространенность врожденной расщелины верхней губы и нёба в некоторых регионах Евразии // Вестник Авиценны. 2021. Т. 23. № 2. С. 262—268.]
3. Turner SR, Rumsey N, Sandy JR. Psychological aspects of cleft lip and palate. *European Journal of Orthodontics*. 1998;20(4):407—415. doi:10.1093/ejo/20.4.407
4. Yusof MS, Mohd Ibrahim H. The impact of cleft lip and palate on the quality of life of young children: A scoping review. *Med J Malaysia*. 2023;78(2):250—258.

5. Chkadua TZ, Romanova EM, Gileva KS, Mokhirev MA, Kudryavcev AV, Arutyunov GR, Davydenko PL. Rehabilitation of the patient with unilateral cleft lip and palate (case report). *Russ J of Dent*. 2018;22(5):249—254. (In Russian). doi:10.18821/1728-2802-2018-22-5-249-254 [Чкадуа Т.З., Романова Е.М., Гилева К.С., Мохирев М.А., Кудрявцев А.В., Арутюнов Г.Р., и др. Комплексная реабилитация пациента с одосторонней врожденной расщелиной губы, неба и альвеолярного отростка (клиническое наблюдение) // Российский стоматологический журнал. 2018. Т. 22. № 5. С. 249—254.]
6. Kesting M, Lutz R. Surgery of the Alveolar Cleft: Secondary Bone Grafting of Alveolar Clefts. In: Kesting M, Lutz R, Weber M, editors. *A Visual Guide for Cleft Surgeons*. Cham: Springer; 2023. p. 91—97. doi:10.1007/978-3-031-33521-1_4
7. Kylakov AA, editor. *Oral and maxillofacial surgery: national guidelines*. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. 692 p. (In Russian). [Челюстно-лицевая хирургия: национальное руководство / под ред. А.А. Кулакова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 692 с.]
8. Muthusubramanian V, Harish KM. Alveolar Bone Grafting. In: Bonanthaya K, Panneerselvam E, Manuel S, Kumar VV, Rai A, editors. *Oral and Maxillofacial Surgery for the Clinician*. Singapore: Springer; 2021. p. 1655—1673. doi:10.1007/978-981-15-1346-6_74
9. Yakovlev SV, Topolnitsky OZ, Pershina MA, Shonicheva YuA, Gurgenzadze AP, Makeev AV, Beglaryan AA, Bakshi TA. Alveolar cleft bone grafting at different age periods. *Pediatric dentistry and dental prophylaxis*. 2022;22(3):162—169. (In Russian). doi:10.33925/1683-3031-2022-22-3-162-169 [Яковлев С.В., Топольницкий О.З., Першина М.А., Шоничева Ю.А., Гургенадзе А.П., Макеев А.В., и др. Костная пластика расщелины альвеолярного отростка в различные возрастные периоды // Стоматология детского возраста и профилактика. 2022. Т. 22. № 3. С. 162—169.]
10. Dissaux C, Ruffenach L, Bruant-Rodier C, George D, Bodin F, Rémond Y. Cleft Alveolar Bone Graft Materials: Literature Review. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2021;59(3):336—346. doi:10.1177/10556656211007692
11. Smith JD, Abramson M. Membranous vs Endochondral Bone Autografts. *Archives of Otolaryngology — Head and Neck Surgery*. 1974;99(3):203—205. doi:10.1001/archotol.1974.00780030211011
12. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus Endochondral Bone. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1983;72(6):778—784. doi:10.1097/00006534-198312000-00005
13. Veselá B, Švandová E, Bobek J, Lesot H, Matalová E. Osteogenic and Angiogenic Profiles of Mandibular Bone-Forming Cells. *Front Physiol*. 2019;10. doi:10.3389/fphys.2019.00124
14. Verbo EV, Butsan SB, Gileva KS. *Facial reconstructive surgery. Modern methods and principles*. Moscow: GEOTAR-media, 2022. 572 p. (In Russian). [Вербо Е.В., Буцан С.Б., Гилева К.С. Реконструктивная хирургия лица. Современные методы и принципы. М.: ГЭОТАР-медиа, 2022. 572 с.]
15. Witsenburg B. The reconstruction of anterior residual bone defects in patients with cleft lip, alveolus and palate a review. *Journal of Maxillofacial Surgery*. 1985;13:197—208. doi:10.1016/s0301-0503(85)80048-5
16. Koberg WR. Present view on bone grafting in cleft palate (a review of the literature). *Journal of Maxillofacial Surgery*. 1973;1:185—193. doi:10.1016/s0301-0503(73)80039-6

17. von Eiselsberg F. Zur Technik der Uranoplastik, *Archiv klin Chir Bd 64. Heft*. 1901;3:509—529. (In German).
18. Lexer E. Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über Gelenkversteifung und Gelenktransplantation. *Arch f Klin Surg Chir*. 1908;86:939—954. (In German).
19. Drachter R. Die Gaumenspalte und deren operative Behandlung. *Deutsche Zeitschrift f Chirurgie*. 1914;131(1—2):1—89. (In German). doi:10.1007/bf02797875
20. Zreaqat MH, Hassan R, Hanoun A. Cleft Lip and Palate Management from Birth to Adulthood: An Overview. *Insights into Various Aspects of Oral Health*. InTech; 2017. [Accessed 2024 March 31]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68448>
21. LaRossa D, Buchman S, Rothkopf DM, Mayro R, Randall P. A comparison of iliac and cranial bone in secondary grafting of alveolar clefts. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96(4):789—799.
22. Romanova EM. Primenenie revaskularizirovannogo nadkostnichno-kortikal'nogo bedrennogo autotransplantata u vzroslykh pacientov s rasshchelinoj guby i nyoba [dissertation]. Moscow; 2019. [Accessed 2024 March 31]. Available from: https://web.archive.org/web/20220308082818/http://www.cniis.ru/downloads/dis/dis_Romanov.pdf. (In Russian). [Романова Е.М. Применение реvascularизированного надкостнично-кортикального бедренного аутографтата у взрослых пациентов с расщелиной губы и нёба: дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2019. Дата обращения: 31.03.2024.]
23. Brauer RO, Cronin TD, Reaves EL. Early maxillary orthopedics, orthodontia and alveolar bone grafting in complete clefts of the palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1962;29(6):625—641. doi:10.1097/00006534-196206000-00001
24. Skoog T. The management of the bilateral cleft of the primary palate (lip and alveolus). *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1965;35(1):34—44. doi:10.1097/00006534-196501000-00005
25. Jolleys A, Robertson NRE. A study of the effects of early bone-grafting in complete clefts of the lip and palate — Five year study. *British Journal of Plastic Surgery*. 1972;25:229—237. doi:10.1016/s0007-1226(72)80055-9
26. Pfeiffer G. Die sekundäre osteoplastische Stabilisierung des beweglichen Zwischenkiefers bei frühoperierten doppelseitigen Kieferspalten. In: Axhausen W, Buck-Gramcko D, de la Camp HB, Schuchardt K, editors. *Chirurgia Plastica et Reconstructiva*, vol 2. Berlin: Springer. p. 96—109. (In German). doi:10.1007/978-3-662-21700-9_8
27. Rehrmann A. The effect of early bone grafting on the growth of upper jaw in cleft lip and palate children. A computer evaluation. *Minerva Chir*. 1971;26(16):874—877.
28. Schmid E. Die aufbauende Kieferkammplastik. *Ost. Z Stomatol*. 1954;51:582—583. (In German).
29. Nordin KE. Bone grafting to alveolar process clefts following orthodontic treatment of secondary cleft palate deformity. In: Skoog T, Ivy RH, editors. *Transactions of the International Society of Plastic Surgery*. First Congress, Baltimore: Williams and Williams; 1957. p. 228—232.
30. Johanson B, Ohlsson A. Die Osteoplastik bei Spätbehandlung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. *Langenbecks Arch Klin Chir*. 1960;295:876—85. (In German).
31. Boyne PJ, Sands NR. Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. *J Oral Surg*. 1972;30(2):87—92.
32. Hall HD, Posnick JC. Early results of secondary bone grafts in 106 alveolar clefts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1983;41(5):289—294. doi:10.1016/0278-2391(83)90295-1
33. Dempf R, Teltzrow T, Kramer FJ, Hausamen JE. Alveolar Bone Grafting in Patients with Complete Clefts: A Comparative Study between Secondary and Tertiary Bone Grafting. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2002;39(1):18—25. doi:10.1597/1545-1569_2002_039_0018_abgipw_2.0.co_2
34. Vandersluis YR, Fisher DM, Stevens K, Tompson BD, Lou W, Suri S. Comparison of dental outcomes in patients with nonsyndromic complete unilateral cleft lip and palate who receive secondary alveolar bone grafting before or after emergence of the permanent maxillary canine. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2020;157(5):668—679. doi:10.1016/j.ajodo.2019.11.012
35. Ozawa T, Omura S, Fukuyama E, Matsui Y, Torikai K, Fujita K. Factors Influencing Secondary Alveolar Bone Grafting in Cleft Lip and Palate Patients: Prospective Analysis Using CT Image Analyzer. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2007;44(3):286—291. doi:10.1597/06-054
36. Dissaux C, Bodin F, Grollemund B, Bridonneau T, Kauffmann I, Mattern JF, Bruant-Rodier C. Evaluation of success of alveolar cleft bone graft performed at 5 years versus 10 years of age. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2016;44(1):21—26. doi:10.1016/j.jcms.2015.09.003
37. Doucet JC, Russell KA, Daskalogiannakis J, Mercado AM, Emanuele N, James L, Hathaway RR, Long RE. Facial Growth of Patients With Complete Unilateral Cleft Lip and Palate Treated With Alveolar Bone Grafting at 6 Years. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2018;56(5):619—627. doi:10.1177/1055665618792791
38. Jodeh DS, Pringle AJ, Crisp T, Rottgers SA. Factors Influencing Timely Preparation of Alveolar Bone Grafting: A Survey of the ACPA. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2020;57(9):1061—1068. doi:10.1177/1055665620924935
39. Mundra LS, Lowe KM, Khechoyan DY. Alveolar Bone Graft Timing in Patients With Cleft Lip & Palate. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2021;33(1):206—210. doi:10.1097/scs.00000000000007890
40. Brudnicki A, Regulski PA, Sawicka E, Fudalej PS. Alveolar Volume Following Different Timings of Secondary Bone Grafting in Patients with Unilateral Cleft Lip and Palate. A Pilot Study. *JCM*. 2021;10(16):3524. doi:10.3390/jcm10163524
41. Skoog T. The use of periosteal flaps in the repair of clefts of the primary palate. *Cleft Palate J*. 1965;2:332—339.
42. Meazzini MC, Rossetti G, Garattini G, Semb G, Brusati R. Early Secondary Gingivo-Alveolo-Plasty in the treatment of unilateral cleft lip and palate patients: 20 years experience. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2010;38(3):185—191. doi:10.1016/j.jcms.2009.06.001
43. Wang YC, Liao YF, Chen PKT. Outcome of gingivoperiosteoplasty for the treatment of alveolar clefts in patients with unilateral cleft lip and palate. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;51(7):650—655. doi:10.1016/j.bjoms.2012.09.012
44. Matic DB, Power SM. Evaluating the Success of Gingivoperiosteoplasty versus Secondary Bone Grafting in Patients with Unilateral Clefts. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008;121(4):1343—1353. doi:10.1097/01.prs.0000304604.89450.ae

45. Caccamese JF. Donor Site Options. In: Ricalde P, editor. *Cleft Maxillary Reconstruction*. Cham: Springer; 2023. p. 77—88. doi:10.1007/978-3-031-24636-4_5
46. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology — is it still a «gold standard»? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1). doi:10.1186/s40729-017-0084-4
47. Hassanein AH, Greene AK, Arany PR, Padwa BL. Intraoperative Cooling of Iliac Bone Graft: An Experimental Evaluation of Cell Viability. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(7):1633—1635. doi:10.1016/j.joms.2011.07.005
48. Wickramasinghe ML, Dias GJ, Premadasa KMGP. A novel classification of bone graft materials. *J Biomed Mater Res*. 2022;110(7):1724—1749. doi:10.1002/jbm.b.35029
49. Volkov AV, Muraev AA, Zharkova II, Voinova VV, Akoulina EA, Zhuikov VA, Khaydapova DD, Chesnokova DV, Menshikh KA, Dudun AA, Makhina TK, Bonartseva GA, Asfarov TF, Stamboliev IA, Gazhva YV, Ryabova VM, Zlatev LH, Ivanov SY, Shaitan KV, Bonartsev AP. Poly(3-hydroxybutyrate) /hydroxyapatite/ alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;114:110991. doi:10.1016/j.msec.2020.110991
50. Wolfe SA. Iliac or cranial bone for secondary grafting of residual alveolar clefts. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1991;88(5):924. doi:10.1097/00006534—199111000—00061
51. Buchman SR, Ozaki W. The Ultrastructure and Resorptive Pattern of Cancellous Onlay Bone Grafts in the Craniofacial Skeleton. *Annals of Plastic Surgery*. 1999;43(1):49—56. doi:10.1097/0000637-199907000-00008
52. Ozaki W, Buchman SR. Volume Maintenance of Onlay Bone Grafts in the Craniofacial Skeleton: Micro-architecture versus Embryologic Origin. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1998;102(2):291—299. doi:10.1097/00006534-199808000-00001
53. Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(1):139—147.
54. Rosenthal AH, Buchman SR. Volume Maintenance of Inlay Bone Grafts in the Craniofacial Skeleton. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003;112(3):802—811. doi:10.1097/01.prs.0000069713.62687.f5
55. Saha A, Shah S, Waknis P, Bhujbal P, Aher S, Vaswani V. Comparison of minimally invasive versus conventional open harvesting technique for iliac bone graft in secondary alveolar bone grafting in cleft palate patients: a systematic review. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2019;45(5):241. doi:10.5125/jkaoms.2019.45.5.241
56. Kortebein MJ, Nelson CL, Sadove AM. Retrospective analysis of 135 secondary alveolar cleft grafts using iliac or calvarial bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1991;49(5):493—498. doi:10.1016/0278-2391(91)90172-i
57. Zhou WN, Pan YC, Tang YC, Hou W, Wu DM, Yuan H, Wan LZ, Du YF, Jiang HB. Comparative Outcomes of Block and Cancellous Iliac Bone Grafting in Older Unilateral Alveolar Cleft Patients. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2019;56(7):936—943. doi:10.1177/1055665618822410
58. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1983;(174):28—42.
59. Denny AD, Talisman R, Bonawitz SC. Secondary Alveolar Bone Grafting Using Milled Cranial Bone Graft: A Retrospective Study of a Consecutive Series of 100 Patients. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1999;36(2):144—153. doi:10.1597/1545-1569_1999_036_0144_sabgum_2.3.co_2
60. Kalk WWI, Raghoebar GM, Jansma J, Boering G. Morbidity from iliac crest bone harvesting. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1996;54(12):1424—1429. doi:10.1016/s0278-2391(96)90257-8
61. Eufinger H, Leppänen H. Iliac crest donor site morbidity following open and closed methods of bone harvest for alveolar cleft osteoplasty. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2000;28(1):31—38. doi:10.1054/jcms.2000.0105
62. Rawashdeh MA. Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;37(3):223—227. doi:10.1016/j.ijom.2007.11.009
63. Baqain ZH, Anabtawi M, Karaky AA, Malkawi Z. Morbidity From Anterior Iliac Crest Bone Harvesting for Secondary Alveolar Bone Grafting: An Outcome Assessment Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;67(3):570—575. doi:10.1016/j.joms.2008.09.023
64. Matsa S, Murugan S, Kannadasan K. Evaluation of Morbidity Associated with Iliac Crest Harvest for Alveolar Cleft Bone Grafting. *J Maxillofac Oral Surg*. 2011;11(1):91—95. doi: 10.1007/s12663-011-0249-2
65. Perry CW, Lowenstein A, Rothkopf DM. Ambulatory Alveolar Bone Grafting. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2005;116(3):736—739. doi: 10.1097/01.prs.0000176533.42460.f6
66. Khojasteh A, Kheiri L, Motamedian SR, Nadjmi N. Regenerative medicine in the treatment of alveolar cleft defect: A systematic review of the literature. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2015;43(8):1608—1613. doi: 10.1016/j.jcms.2015.06.041
67. Feichtinger M, Zemann W, Mossböck R, Kärcher H. Three-dimensional evaluation of secondary alveolar bone grafting using a 3D- navigation system based on computed tomography: a two-year follow-up. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;46(4):278—282. doi: 10.1016/j.bjoms.2007.12.010
68. Koole R. Ectomesenchymal Mandibular Symphysis Bone Graft: An Improvement in Alveolar Cleft Grafting? *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1994;31(3):217—223. doi: 10.1597/1545-1569_1994_031_0217_emsbga_2.3.co_2
69. Sales PH da H, Cetira Filho EL, Silva PG de B, Costa FWG, Leão JC. Effectiveness of Autogenous Chin Bone Graft in Reconstructive Surgery of Cleft Patients: A Systematic Review With Meta-Analysis and Algorithm of Treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2023;81(8):988—1000. doi: 10.1016/j.joms.2023.04.011
70. Movahedian Attar B, Naghdi N, Etemadi Sh M, Mehdizadeh M. Chin Symphysis Bone, Allograft, and Platelet-Rich Fibrin: Is the Combination Effective in Repair of Alveolar Cleft? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(5):1026—1035. doi: 10.1016/j.joms.2016.12.026
71. Blatter J, May L, De Buys Roessingh A, Medinger L, Broome M. The Mandibular Ramus: An Alternative Donor Site for Secondary Alveolar Bone Grafting in Clefts of the Alveolus. *Journal*

- of *Craniofacial Surgery*. 2019;30(8):2590—2592. doi: 10.1097/scs.0000000000005684
72. Khajehahmadi S, Rahpeyma A. Mandibular ramus cortical tenting graft and particulate allograft in the management of unilateral alveolar cleft. *Ann Maxillofac Surg*. 2019;9(2):355. doi:10.4103/ams.ams_96_19
73. Booi A, Raghoobar GM, Jansma J, Kalk WWI, Vissink A. Morbidity of Chin Bone Transplants Used for Reconstructing Alveolar Defects in Cleft Patients. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2005;42(5):533—538. doi:10.1597/03-158.1
74. Andersen K, Nørholt SE, Knudsen J, Küseler A, Jensen J. Donor site morbidity after reconstruction of alveolar bone defects with mandibular symphyseal bone grafts in cleft patients-111 consecutive patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;43(4):428—432. doi:10.1016/j.ijom.2013.09.007
75. Shirzadeh A, Rahpeyma A, Khajehahmadi S. A Prospective Study of Chin Bone Graft Harvesting for Unilateral Maxillary Alveolar Cleft During Mixed Dentition. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76(1):180—188. doi:10.1016/j.joms.2017.07.143
76. Weijs WLJ, Siebers TJH, Kuijpers-Jagtman AM, Bergé SJ, Meijer GJ, Borstlap WA. Early secondary closure of alveolar clefts with mandibular symphyseal bone grafts and β -tri calcium phosphate (β -TCP). *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;39(5):424—429. doi:10.1016/j.ijom.2010.02.004
77. Ivanov AL, Reshetnyak EI, Starikova NV, Nadtochiy AG. Osteoplasty of the maxilla in patients with unilateral cleft lip and palate by a mandibular bone graft with the use of 3d computer modeling. *Al'm klin med*. 2017;45(6):502—510. (In Russian). doi:10.18786/2072-0505-2017-45-6-502-510 [Иванов А.Л., Решетняк Е.И., Старикова Н.В., Надточий А.Г. Костная пластика верхней челюсти у пациентов с односторонней расщелиной губы и нёба ауто трансплантатом с нижней челюсти с использованием методов трехмерного компьютерного моделирования // Альманах клинической медицины. 2017. Т. 45. № 6. С. 502—510.]
78. Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Schlegel AK, Hirschfelder U, Wiltfang J. Analysis of bone resorption after secondary alveolar cleft bone grafts before and after canine eruption in connection with orthodontic gap closure or prosthodontic treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;61(11):1245—1248. doi: 10.1016/s0278-2391(03)00722-5
79. Dik EA, de Ruiter AP, van der Bilt A, Koole R. Effect on the contour of bone and soft tissue one year after harvesting chin bone for alveolar cleft repair. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;39(10):962—967. doi: 10.1016/j.ijom.2010.06.001
80. Han K, Jeong W, Yeo H, Choi J, Kim J, Son D, Oh S, Kim C. Long-term results of secondary alveolar bone grafting using a technique to harvest pure calvarial cancellous bone: Evaluation based on plain radiography and computed tomography. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2017;70(3):352—359. doi: 10.1016/j.bjps.2016.10.018
81. Hudak KA, Hettlinger P, Denny AD. Cranial Bone Grafting for Alveolar Clefts. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2014;133(5):662e-668e. doi: 10.1097/prs.000000000000109
82. Bagnarosa T, Ferri J, Grégoire G, Baralle MM, Drumez E, Touzet-Roumazielle S. Three-dimensional Assessment of Autologous Calvarial Bone Grafting for Alveolar Clefts Reconstruction in Pediatric Population: A Retrospective Study. *J Craniofac Surg*. 2023;34(1):70—75. doi: 10.1097/SCS.0000000000008880
83. Cohen M, Figueroa AA, Haviv Y, Schafer ME, Aduss H. Iliac versus cranial bone for secondary grafting of residual alveolar clefts. *Plast Reconstr Surg*. 1991;87(3):423—428.
84. Sadove AM, Nelson CL, Eppley BL, Nguyen B. An evaluation of calvarial and iliac donor sites in alveolar cleft grafting. *Cleft Palate J*. 1990;27(3):225—229. doi:10.1597/1545-1569(1990)027<0225:aeocai>2.3.co;2
85. Tessier P. Autogenous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg*. 1982;9(4):531—538.
86. Jackson IT, Helden G, Marx R. Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986;44(12):949—955. doi:10.1016/s0278-2391(86)80048-9
87. Fearon JA. A Magnetic Resonance Imaging Investigation of Potential Subclinical Complications after in Situ Cranial Bone Graft Harvest. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2000;105(6):1935—1939. doi:10.1097/00006534-200005000-00003
88. Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary Alveolar Bone Grafting: the Dilemma of Donor Site Selection and Morbidity. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;46(8):665—670. doi:10.1016/j.bjoms.2008.07.184
89. Baumhauer J, Pinzur MS, Donahue R, Beasley W, DiGiovanni C. Site Selection and Pain Outcome After Autologous Bone Graft Harvest. *Foot Ankle Int*. 2013;35(2):104—107. doi:10.1177/1071100713511434
90. Besly W, Booth PW. Technique for harvesting tibial cancellous bone modified for use in children. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1999;37(2):129—133. doi:10.1054/bjom.1998.0433
91. Iankovan V, Stronczek M, Telfer M, Peterson LJ, Stassen LFA, Ward-booth P. A prospective study of trephined bone grafts of the tibial shaft and iliac crest. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1998;36(6):434—439. doi:10.1016/s0266-4356(98)90459-4
92. Chen YC, Chen CH, Chen PL, Huang IY, Shen YS, Chen CM. Donor site morbidity after harvesting of proximal tibia bone. *Head Neck*. 2006;28(6):496—500. doi: 10.1002/hed.20452
93. Hughes CW, Revington PJ. The proximal tibia donor site in cleft alveolar bone grafting: experience of 75 consecutive cases. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2002;30(1):12—16. doi: 10.1054/jcms.2001.0268
94. Sivarajasingam V, Pell G, Morse M, Shepherd JP. Secondary Bone Grafting of Alveolar Clefts: A Densitometric Comparison of Iliac Crest and Tibial Bone Grafts. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2001;38(1):11—14. doi: 10.1597/15451569_2001_038_0011_sbgoac_2.0.co_2
95. Vura N, Gaddipati R, Ramisetty S, Thumu SK, Bhukya L. The Use of Tibial Autogenous Cancellous Bone for Late Secondary Alveolar Bone Grafting in Cleft Patients: A Prospective Study. *J Maxillofac Oral Surg*. 2020;20(2):276—281. doi:10.1007/s12663—020—01350-x
96. Al Harbi H, Al Yamani A. Long-term follow-up of tibial bone graft for correction of alveolar cleft. *Ann Maxillofac Surg*. 2012;2(2):146. doi:10.4103/2231-0746.101341
97. Schuchardt K, Pfeiffer G, Kriens O. Primary osteoplasty in patients with cleft lip, alveolus and palate. Experiences based on 419 cases. In: Sanvenero- Rosselli G, Boggio-Robutti G, editors.

Transactions of the Fourth International Congress Series No. 174; 1969. p. 356—61.

98. Robinson F, Wood B. Primary bone grafting in the treatment of cleft lip and palate with special reference to alveolar collapse. *British Journal of Plastic Surgery*. 1969;22(3—4):336—342. doi:10.1016/s0007-1226(69)80136-0

99. Freihofner HPM, Borstlap WA, Kuijpers-Jagtman AM, Voorsmit RACA, van Damme PA, Heidbüchel KLWM, Borstlap-Engels VMF. Timing and transplant materials for closure of alveolar clefts. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 1993;21(4):143—148. doi:10.1016/s1010-5182(05)80102-7

100. Steinberg B, Padwa BL, Boyne P, Kaban L. State of the Art in Oral and Maxillofacial Surgery: Treatment of Maxillary Hypoplasia and Anterior Palatal and Alveolar Clefts. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1999;36(4):283—291. doi: 10.1597/1545—1569_1999_036_0284_sotaio_2.3.co_2

101. Eppley BL. Donor Site Morbidity of Rib Graft Harvesting in Primary Alveolar Cleft Bone Grafting. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005;16(2):335—338. doi: 10.1097/00001665-200503000-00027

102. Laurie SWS, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-Site Morbidity after Harvesting Rib and Iliac Bone. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1984;73(6):933—938. doi: 10.1097/00006534-198406000-00014

103.103. Ohara K, Nakamura K, Ohta E. Chest Wall Deformities and Thoracic Scoliosis after Costal Cartilage Graft Harvesting. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1997;99(4):1030—1036. doi:10.1097/00006534—199704000—00017

104. Marukawa E, Oshina H, Iino G, Morita K, Omura K. Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2011;39(4):278—283. doi: 10.1016/j.jcms.2010.04.017

105. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004;62(5):555—558. doi: 10.1016/j.joms.2003.08.023

106. Dayashankara Rao JK, Bhatnagar A, Pandey R, Arya V, Arora G, Kumar J, Bootwala F, Devi WN. A comparative evaluation of iliac crest bone graft with and without injectable and advanced platelet rich fibrin in secondary alveolar bone grafting for cleft alveolus in unilateral cleft lip and palate patients: A randomized prospective study. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021;122(3):241—247. doi: 10.1016/j.jormas.2020.07.007

107. Shawky H, Seifeldin SA. Does Platelet-Rich Fibrin Enhance Bone Quality and Quantity of Alveolar Cleft Reconstruction? *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2016;53(5):597—606. doi: 10.1597/14-290

108. Saruhan N, Ertas U. Evaluating of Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Alveolar Cleft With Iliac Bone Graft By Means of Volumetric Analysis. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2018;29(2):322—326. doi:10.1097/scs.0000000000004125

109. Sakio R, Sakamoto Y, Ogata H, Sakamoto T, Ishii T, Kishi K. Effect of Platelet-Rich Plasma on Bone Grafting of Alveolar Clefts. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017;28(2):486—488. doi:10.1097/scs.0000000000003345

110. Moussa NT, Dym H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. *Dental Clinics of North America*. 2020;64(2):473—490. doi:10.1016/j.cden.2019.12.011

111. Thuaksuban N, Nuntanarant T, Pripatnanont P. A comparison of autogenous bone graft combined with deproteinized bovine bone and autogenous bone graft alone for treatment of alveolar cleft. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;39(12):1175—1180. doi:10.1016/j.ijom.2010.07.008

112. Aly LA, Hammouda N. Secondary closure of alveolar cleft with resorbable collagen membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone. *Ann Maxillofac Surg*. 2016;6(2):165. doi:10.4103/2231-0746.200351

113. Elfaramawi TI, Faramawey MI, Dahaba MM, Hakam MM. Deproteinized Bovine Bone Graft in Maxillary Alveolar Cleft Reconstruction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(9):e14. doi:10.1016/j.joms.2015.06.023

114. MacIsaac ZM, Rottgers SA, Davit AJ, Ford M, Losee JE, Kumar AR. Alveolar Reconstruction in Cleft Patients. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2012;130(3):625—632. doi: 10.1097/prs.0b013e31825dcb75

115. Xiao WL, Zhang DZ, Chen XJ, Yuan C, Xue LF. Osteogenesis effect of guided bone regeneration combined with alveolar cleft grafting: assessment by cone beam computed tomography. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016;45(6):683—687. doi: 10.1016/j.ijom.2016.01.013

116. Ershova OJu, Leonov AG, Tkachenko AE, Dolgoplova GV. Experience of the use of biodegradable membranes in alveolobonegrafting (cyte) in children with congenital cleft lip, palate and alveolar bone. *Vestn Ural Med Akad Nauki*. 2016;(3):27—32. (In Russian). doi: 10.22138/2500-0918-2016-15-3-27-32 [Ершова О.Ю., Леонов А.Г., Ткаченко А.Е., Долгополова Г.В. Опыт использования биодеградируемой мембраны при альвеолопластике у детей с врожденной расщелиной верхней губы, нёба и альвеолярного отростка // Вестник уральской медицинской академической науки. 2016. № 3. С. 27—32.]

117. Yuan KF, Lai QG, Qi C, Guo XH, Shi RJ, Xu X, Wei FC. Clinical study of bioglass for repairing alveolar cleft. *Shanghai J Stomatol*. 2004;13(5):465—468. (In Chinese, English abstract).

118. Janssen NG, Schreurs R, de Ruiter AP, Sylvester-Jensen HC, Blintheim G, Meijer GJ, Koole R, Vindenes H. Microstructured beta-tricalcium phosphate for alveolar cleft repair: a two-centre study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019;48(6):708—711. doi: 10.1016/j.ijom.2018.11.009

119. Benlidayi ME, Tatli U, Kurkcu M, Uzel A, Oztunc H. Comparison of Bovine-Derived Hydroxyapatite and Autogenous Bone for Secondary Alveolar Bone Grafting in Patients With Alveolar Clefts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(1): e95-e102. doi:10.1016/j.joms.2011.08.041

120. Lazarou SA, Contodimos GB, Gkegkes ID. Correction of Alveolar Cleft With Calcium-Based Bone Substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2011;22(3):854—857. doi:10.1097/scs.0b013e31820f7f19

121. Neovius E, Lemberger M, Docherty Skogh AC, Hilborn J, Engstrand T. Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2013;66(1):37—42. doi: 10.1016/j.bjps.2012.08.015

122. Trujillo RL, Kadioglu O, Currier GF, Smith KS, Yetkiner E. Volumetric Cleft Changes in Treatment With Bone Morphogenetic Protein/ β -Tricalcium Phosphate Versus Grafts From the

- Iliac Crest or Symphysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76(9):1991—1997. doi:10.1016/j.joms.2018.03.009
- 123.Canan LW Jr, da Silva Freitas R, Alonso N, Tanikawa DYS, Rocha DL, Coelho JCU. Human Bone Morphogenetic Protein-2 Use for Maxillary Reconstruction in Cleft Lip and Palate Patients. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(6):1627—1633. doi:10.1097/scs.0b013e31825c75ba
- 124.Goss JA, Hunter MS, Armbrecht ES, Lin AY. Higher Dosages of BMP-2 in Alveolar Cleft Repair Result in Higher Rates of Postoperative Nasal Stenosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015;136:4. doi:10.1097/01.prs.0000472274.92050.67
- 125.Hammoudeh JA, Fahradyan A, Gould DJ, Liang F, Imahiyerobo T, Urbinelli L, Nguyen JT, Magee W, Yen S, Urata MM. A Comparative Analysis of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 with a Demineralized Bone Matrix versus Iliac Crest Bone Graft for Secondary Alveolar Bone Grafts in Patients with Cleft Lip and Palate: Review of 501 Cases. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2017;140(2):318e-325e. doi:10.1097/prs.0000000000003519
- 126.Liang F, Yen S, Florendo E, Urata M, Hammoudeh J. 3D Cone Beam Computed Tomography Volumetric Outcomes of rhBMP-2/ Demineralized Bone Matrix vs. Iliac Crest Bone Graft for Alveolar Cleft Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015;136:3—4. doi:10.1097/01.prs.0000472273.84427.35
- 127.Scalzone A, Flores-Mir C, Carozza D, d'Apuzzo F, Grassia V, Perillo L. Secondary alveolar bone grafting using autologous versus alloplastic material in the treatment of cleft lip and palate patients: systematic review and meta-analysis. *Prog Orthod*. 2019;20(1). doi:10.1186/s40510-018-0252-y
- 128.Singh A, Morris RJ. The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010;21(4):299—313. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.06.003
- 129.Sayama C, Willsey M, Chintagumpala M, Brayton A, Briceño V, Ryan SL, Luerssen TG, Hwang SW, Jea A. Routine use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterior fusions of the pediatric spine and incidence of cancer. *PED*. 2015;16(1):4—13. doi:10.3171/2014.10.peds14199
- 130.Kelly MP, Savage JW, Bentzen SM, Hsu WK, Ellison SA, Anderson PA. Cancer Risk from Bone Morphogenetic Protein Exposure in Spinal Arthrodesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2014;96(17):1417—1422. doi: 10.2106/jbjs.m.01190
- 131.Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, Comer G, Kopjar B. Cancer Risk After Use of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 for Spinal Arthrodesis. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2013;95(17):1537—1545. doi: 10.2106/jbjs.l.01483
- 132.Alkaabi SA, Alsabri GA, NatsirKalla DS, Alavi SA, Mueller WEG, Forouzanfar T, Helder MN. A systematic review on regenerative alveolar graft materials in clinical trials: Risk of bias and meta-analysis. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2022;75(1):356—365. doi: 10.1016/j.bjps.2021.08.026
- 133.Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus. *Annals of Anatomy — Anatomischer Anzeiger*. 2012;194(6):545—548. doi:10.1016/j.aanat.2012.06.002
- 134.Al-Ahmady HH, Abd Elazeem AF, Bellah Ahmed NE moataz, Shawkat WM, Elmasry M, Abdelrahman MA, Abderazik MA. Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2018;46(9):1593—1600. doi: 10.1016/j.jcms.2018.05.049
- 135.Mahardawi B, Boonsiriseth K, Pairuchvej V, Wongsirichat N. Alveolar cleft bone grafting: factors affecting case prognosis. *JKAOMS*. 2020;46(6):409—416. doi: 10.5125/jkaoms.2020.46.6.409
- 136.Sakamoto Y, Ogata H, Miyamoto J, Kishi K. The role of surgeon's learning on the outcomes of alveolar bone graft for cleft repair. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2022;75(6):1937—1941. doi:10.1016/j.bjps.2021.11.114
- 137.Drew SJ, Edwards SP. Special Situations. In: Ricalde P, editor. *Cleft Maxillary Reconstruction*. Cham: Springer; 2023. p. 113—125. doi: 10.1007/978-3-031-24636-4_8
- 138.Zemann W, Kruse AL, Lüebbers HT, Jacobsen C, Metzler P, Obwegeser JA. Microvascular Tissue Transfer in Cleft Palate Patients. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2011;22(6):2006—2010. doi:10.1097/scs.0b013e31823197d8
- 139.Gaggl A, Bürger H, Virnik S, Schachner P, Chiari F. The Microvascular Corticocancellous Femur Flap for Reconstruction of the Anterior Maxilla in Adult Cleft Lip, Palate, and Alveolus Patients. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2012;49(3):305—313. doi:10.1597/10-220
- 140.Altuntaş SH, Aydın MA. The Use of the Free Iliac Bone Flap by Shaping Like Puzzle for a Wide Alveolar Defect in a Bilateral Cleft Lip and Palate with Rudimentary Premaxilla. *J Craniofac Surg*. 2022;33(2): e107-e109. doi:10.1097/SCS.00000000000007936
- 141.Patel NK, Tipps JA, Bartlett SP, Kovach SJ, Levin LS, Mendenhall SD. Expanding Indications of the Medial Femoral Condyle Free Flap: Systematic Review in Head and Neck Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery—Global Open*. 2023;11(4): e4925. doi:10.1097/gox.0000000000004925
- 142.Patent RUS № 2797101/ 31.05.2023. Gileva KS, Efremova RI, Botoev SR. Sposob ustraneniya ogranichenny'x defectov chelyustej. [Accessed 2024 March 31]. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/f0/7e/71/406e4518d57c51/RU2797101C1.pdf> (In Russian). [Патент РФ на изобретение № 2797101/ 31.05.2023. Гилева К.С., Ефремова Р.И., Ботоев С.Р. Способ устранения ограниченных дефектов челюстей. Дата обращения: 31.03.2024.]
- 143.Parhiscar A, Har-El G, Turk JB, Abramson DL. Temporoparietal osteofascial flap for head and neck reconstruction. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002;60(6):619—622. doi:10.1053/joms.2002.33104
- 144.Colen DL, Kania KE, Othman S, Levin LS, Reece EM, Pederson WC, Innocenti M, Kovach SJ. The Medial Femoral Condyle Flap in the Pediatric Patient. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2021;147(4):613e-622e. doi: 10.1097/prs.00000000000007778
- 145.Abraha BT, Day KD, Padilla PL, Henry SL, Kelley PK, Harshbarger RJ. Medial Femoral Condyle Flap for Persistent Alveolar Cleft Reconstruction. *FACE*. 2020;1(2):146—150. doi:10.1177/2732501620973031
- 146.Akdag O, Erkol EE, Yildiran G, Koplay TG, Sutcu M, Tosun Z. Reconstruction of Previously Failed Alveolar Bone Grafts with Medial Femoral Condyle Flap in Pediatric Cleft Lip and Palate Patients. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2022;75(10):3768—3773. doi:10.1016/j.bjps.2022.06.040
- 147.Chang CS, Wallace CG, Hsiao YC, Chiu YT, Pai BCJ, Chen IJ, Liao VE, Liou EJW, Chen PKT, Chen JP, Noordhoff MS. Difference

in the Surgical Outcome of Unilateral Cleft Lip and Palate Patients with and without Pre-Alveolar Bone Graft Orthodontic Treatment. *Sci Rep*. 2016;6(1). doi:10.1038/srep23597

148. Chen S, Liu B, Yin N, Wang Y. In-Depth Volumetric Analysis of Alveolar Cleft Defects Using Three-Dimensionally Printed Models. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2020;31(6):1790—1792. doi:10.1097/scs.0000000000006596

149. Muraev AA, Gazhva YV, Ivashkevich SG, Riabova VM, Korotkova NL, Semyonova YA, Metsuku IN, Faizullin RL, Ivanov SY. A Novel Approach to Alveolar Bone Complex Defects 3D Reconstruction. *Sovrem Tehnol Med*. 2017;9(2):37. doi:10.17691/stm2017.9.2.04

150. Ricalde P. Surgical Repair of Maxillary Unilateral Cleft Defect. In: Ricalde P, editor. *Cleft Maxillary Reconstruction*. Cham: Springer; 2023. p. 89—104. doi: 10.1007/978-3-031-24636-4_6

151. Craven C, Cole P, Hollier L, Stal S. Ensuring Success in Alveolar Bone Grafting. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2007;18(4):855—859. doi: 10.1097/scs.0b013e31806849fa

152. Bogoroditskaya AV, Radzig EYu, Sarafanova ME, Prityko AG. Clinical management of children with congenital cleft lip and palate: an interdisciplinary problem. *Pediatria n.a. G.N. Speransky*. 2015;94(3):78—81. (In Russian). [Богородицкая А.В., Сарафанова М.Е., Радциг Е.Ю., Притыко А.Г. Тактика ведения детей с врожденной расщелиной верхней губы и нёба: междисциплинарная проблема // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2015. Т. 94. № 3. С. 78—81.]

153. Khaletskaya VN, Kovach IV. Condition of hard tissues of teeth and periodontium in children with a cleft of the soft and hard palate in an early replaceable bite. *Dentistry Bulletin*. 2016;97(4):38—42. (In Russian). [Халецкая В.Н., Ковач И.В. Состояние твердых тканей зубов и пародонта у детей с расщелиной мягкого и твердого неба

в раннем сменном прикусе // Вестник стоматологии. 2016. Т. 97. № 4. С. 38—42.]

154. Ivanov AL, Reshetnyak EI, Starikova NV, Udalova NV, Nadtochy AG. Resorbable vs nonresorbable fixation in alveolar bone grafting in unilateral cleft lip and palate patients. *Stomat*. 2018;97(1):40. (In Russian). doi:10.17116/stomat201897140—46 [Иванов А.Л., Решетняк Е.И., Старикова Н.В., Удалова Н.В., Надточий А.Г. Оценка эффективности резорбируемой и нерезорбируемой фиксации трансплантата при костной пластике верхней челюсти у детей с односторонней расщелиной губы и неба // Стоматология. 2018. Т. 97. № 1. С. 4046.]

155. de Barros Dias BS, Schneider T, Ladvoat Cintra HP. Platelet-rich fibrin in the Alveolar Bone graft in cleft lip and palate patient. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent*. 2018;1:27—31.

156. Fenske F, Stoltze A, Neuhaus M, Zimmerer R, Häfner J, Kloss-Brandstätter A, Lethaus B, Sander AK. Evaluating the efficacy of single-shot versus prolonged antibiotic prophylaxis in alveolar cleft osteoplasty — A retrospective cohort study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2023;51(10):644—648. doi:10.1016/j.jcms.2023.09.002

157. McCrary H, Skirko JR. Bone Grafting of Alveolar Clefts. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 2021;33(2):231—238. doi:10.1016/j.coms.2021.01.007

158. Raghavan U, Rao D, Ullas G, Vijayadev V. Postoperative Management of Cleft Lip and Palate Surgery. *Facial plast Surg*. 2018;34(06):605—611. doi:10.1055/s-0038—1676381

159. Kinard B, Posnick JC. Patient Outcomes for Maxillary Cleft Management: Literature Review and Guiding Principles. In: Ricalde P, editor. *Cleft Maxillary Reconstruction*. Cham: Springer; 2023. p. 167—183. doi:10.1007/978-3-031-24636-4_11

Ответственный за переписку: Иманова Ханна Захид кызы — стажер-исследователь кафедры челюстно-лицевой хирургии им. акад. Н.Н. Бажанова, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Российская Федерация, 199992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. E-mail: hannaimanova@yandex.ru

Кузнецов А.М. ORCID 0000-0002-7254-4205

Иманова Х.З. SPIN 9492-9905, ORCID 0000-0001-8335-8283

Гусаров А.М. SPIN 4604-5103, ORCID 0000-0002-6583-4685

Яцкевич О.С. SPIN 7120-8088, ORCID 0009-0009-8599-115X

Зорич М.Е. SPIN 4171-2542, ORCID 0009-0007-0074-6389

Короткова Н.Л. SPIN 8709-8397, ORCID 0000-0001-7812-1433

Копылова У.О. ORCID 0009-0007-3203-8985

Нагайченко А.М. ORCID 0000-0002-3014-4924

Corresponding author: Imanova Khanna Zakhid kyzy — research intern of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery named after acad. N.N. Bazhanov, Sechenov First Moscow State Medical University, 199992, Trubeckaya st., 8—2, Moscow, Russian Federation. E-mail: hannaimanova@yandex.ru

Kuznetsov A.M. ORCID 0000-0002-7254-4205

Imanova Kh.Z. ORCID 0000-0001-8335-8283

Gusarov A.M. ORCID 0000-0002-6583-4685

Yatskevich O.S. ORCID 0009-0009-8599-115X

Zorych M.E. ORCID 0009-0007-0074-6389

Korotkova N.L. ORCID 0000-0001-7812-1433

Kopylova U.O. ORCID 0009-0007-3203-8985

Nagaichenko A.M. ORCID 0000-0002-3014-4924



ФАРМАКОЛОГИЯ PHARMACOLOGY


DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-537-547
EDN HFDTYZ

ORIGINAL RESEARCH
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

New approaches to quality control of drugs from the group of branched polymers on the example of dextran

Lianna A. Marchenkova , Ainaz Safdari , Elena V. Uspenskaya  

RUDN University, Moscow, Russian Federation

 uspenskaya_ev@pfur.ru

Abstract. Relevance. Colloidal blood substitutes — polyglukins — have been used in infusion therapy for 70 years and are widely represented in modern pharmaceutical regulatory documentation. Glucose polymer with a (1 → 6) glycosidic linkages (dextran), as the main active pharmaceutical ingredient of polyglukins, has exceptional properties, such as long-term circulation in the bloodstream, inertness, volemic, detoxification, and antithrombotic effects. Quality authentication control of polyglukins usually includes FT-IR spectroscopy, while systems of polymeric micelles require characterization of dispersion and the electrophoretic properties that are in unambiguous correspondence with their biological activity. The aim of the study was to develop new approaches based on laser scattering methods to identify polymer-based blood substitute drugs to complement existing regulatory documentation, and assess their biological activity using the *Spirotox* method. **Materials and Methods.** Reopolyglukin (Rpg) — an aqueous solution of dextran with a molecular weight of 30—40 kDa (Dex35) and 0.9% sodium chloride; water with different contents of the heavy isotope ^3H , Malvern Zetasizer ZSP equipment for measuring hydrodynamic radius (d , nm), zeta potential of colloids (ξ , mV); Biotesting method with *Spiostomum ambigua* cell for evaluating survival time in different dilutions of Rpg. **Results and Discussion.** Determination of submicron dispersity in the initial Rpg and in dilutions of water isotopologues indicates the presence of particles $d_{50}(\text{Median}) = 10$ nm with a volume concentration $V = 18\%$ and a low polydispersity index $\text{PDI} \sim 0.2$. It is shown that the size distribution of nanoparticles is influenced by a noticeable effect is the concentration of the isotope. Biopharmaceutical analysis with the usage of Protozoa based on the Arrhenius kinetic model showed a decrease in the toxicity of aqueous solutions of Rpg in an environment with a reduced content of the isotope ^3H . New approaches based on the use of laser analysis methods have been developed to characterize the dispersion properties and colloidal stability of polymer-based blood substitutes. **Conclusion.** The results obtained can be included into the new edition of a pharmacopeial article on Reopolyglukin preparations.

© Marchenkova L.A., Safdari A., Uspenskaya E.V., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Keywords: hemodynamic blood substitutes, dextran, *Leuconostoc mesenteroides* producer, laser light scattering, colloidal stability, polydispersity index, optical activity

Funding. This publication has been supported by the RUDN University Scientific Projects Grant System, project № 033320-0-000.

Author contributions. Marchenkova L.A., Safdari A. — experimental part, processing and presentation of results, literature review; Uspenskaya E.V., Marchenkova L.A. — conception and design of the manuscript. All authors made significant contributions to the conception, conduct of the study and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

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

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgments. The authors are thankful to the leadership of the RUDN Medical Institute for equipping the department with high-tech equipment for conducting scientific research.

Consent for publication — not applicable.

Received 08.05.2024. Accepted 12.06.2024

For citation: Marchenkova LA, Safdari A, Uspenskaya EV. New approaches to quality control of drugs from the group of branched polymers on the example of dextran. *RUDN Journal of Medicine*. 2024; 28(4):537–547. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-537-547. EDN: HFDTYZ

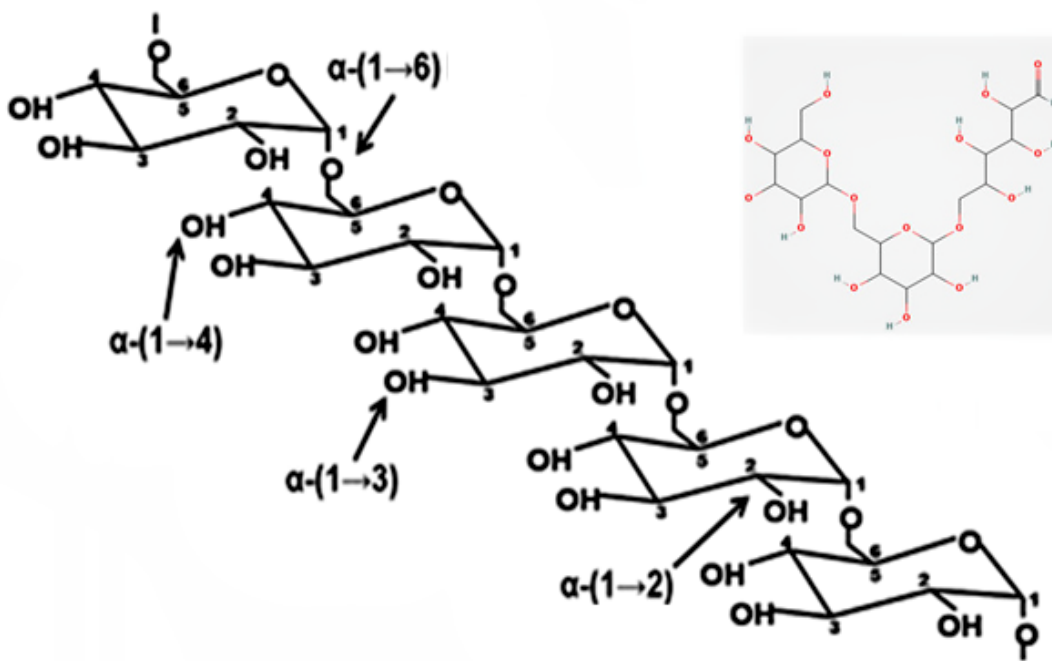
Introduction

Dextran (Dxt) — is a polysaccharide composed of glucose monomers linked by α -1,6-glycoside bonds in a 1:6. ratio. Additionally, the Dextran molecule may feature α -1,2, α -1,3 and α -1,4-bonds forming side chains containing approximately $2 \cdot 10^5$ units of glucose [1] (Fig. 1).

It is known that the glycoside bond (1 → 6) is atypical for plants (starch) and animals (glycogen), and there are no body enzymes capable of breaking down such polysaccharides. However, this characteristic gives dextran a significant advantage as a blood substitute — the duration of circulation in the bloodstream and withdrawal almost unchanged, which eliminates its cumulation [2]. The bacteria of the *Lactobacillaceae* family (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides* biological species) and *Weissella* (*Weissella cibaria*, *Weissella confusa*) possess probiotic potential and produce dextran from sucrose (dextranase enzyme) which finds application in the pharmaceutical industry [3]. Depending on the environmental conditions (T, C° and pH) it is possible to obtain a low-

(Mr 20—50 kDa), medium- (Mr 50—70 kDa) and high-molecular (Mr >100 kDa) dextrans [4]. The most demanded in medicine are dextrans with a molecular mass of 30—40 kDa and 70 kDa, characterized by inertia, volumetric, detoxifying, diuretic, antithrombotic effect [5]. However, in the sugar industry, dextrans are undesirable compounds causing significant production losses due to *Leuconostoc* bacteria living on the sugar beet [6].

The history of the dextran's application began in 1943 at the Department of Physical Chemistry, University of Uppsala (Sweden), headed by Nobel laureate T. Svedberg. When developing new technologies for sugar factories of Sockerbolaget AB company, dextran was obtained as a "by-product" [7]. Together with pharmaceutical companies, the technology was brought to the MacroDEX commercial product status [8]. Dextran-based drugs (Mr 35—40 kDa and 50—70 kDa) belong to the group of hemodynamic blood substitutes designed to restore hemodynamic disorders (blood microcirculation) and to treat shock of various origins. Quality



2, 3, 4, 5-tetrahydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-[[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhexanal

Figure 1. 2D-Chemical structure of Dextran (Mg ~ 40,000 Da) (inset shows a Dxt dimer with a side substituent)

control of parenteral, sterile dextran-based drugs — polyglukins — includes determination of authenticity by polarimetric, spectrometric (FT-IR) and chemical methods. Purity is determined according to pH, viscosity, average molecular weight, density, biological toxicity tests. However, particle size analysis for ‘Particle size’ and ‘Visible mechanical inclusions’ are not available in the current “DEXTRAN 40, 60, 70 FOR INJECTION” Standarts [9]. It is known that particle size correlates with stability, solubility, bioavailability, and rate of redistribution in the body. In addition, the control of invisible mechanical inclusions — foreign insoluble particles (except gas bubbles), that may accidentally be present in medical products, is necessary to prevent their entry into the systemic circulation.

The aim of the study was to develop a new approach based on laser scattering methods for the identification of drugs — polymer blood substitutes to supplement existing standards, as well as to evaluate their biological activity using the *Spirostomum ambigua* biotesting method.

Materials and Methods

The object of the study was the drug reopolyglukin (batch № 016167/01 of RP “Belpharm”, Republic of Belarus), which is an aqueous solution of 0.9% sodium chloride and dextran with a molecular mass of 30—40 kDa (Dex35). Composition per 1 ml: dextran (avg. mol. mass 30,000—40,000) — 100 mg (as a 10% solution in water for injection); as an excipient, NaCl — 9 mg. Theoretical osmolarity — 330 mOsm/L. The solution is transparent, colorless, or slightly yellow. The drug was used in its initial concentration or diluted 1:100 with the use of solvents: bidistilled water (ratio /~140 ppm, electrical resistance >18 MΩ × cm⁻¹ at 25 °C, TOC ≤ 5 ppb, Merck Millipore), deuterium depleted water (²H/¹H~4 ppm, Merck, Darmstadt, Germany), and heavy water (99,9% D₂O, ALDRICH, Darmstadt, Germany).

The particle size was analyzed by laser light scattering (Dynamic Light Scattering, DLS) using a laser nanosizer Zetasizer Nano ZSP (Malvern, UK). For measuring the size of submicron (nano-) particles

from 0.1 nm to 10 000 nm in the studied samples of Rpg 10% and the 1:100 dilution, DLS technology was used to measure the diffusion of particles due to Brownian motion followed by size conversion to the Stokes-Einstein equation (1) [10]:

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R}, \quad (1)$$

where D is the diffusion coefficient, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, η is the viscosity of the liquid, R is the hydrodynamic radius of the particle.

To characterize the width of the particle size distribution, the polydispersity index (PDI) was used as a measure of the heterogeneity of particle sizes in the sample. PDI values are calculated by fitting the autocorrelation function in the DLS software. Since the polydispersity of a sample is the standard deviation of the distribution divided by the average radius, to calculate the polydispersity index the resulting value is squared:

$$PDI = \frac{\mu_2}{G^2}, \quad (2)$$

where G^2 is $(G)^2$ and G is the average decay rate, which is proportional to the average translational diffusion coefficient D, which is used to calculate the radius.

The study of the biological activity of Rpg dilute aqueous was conducted using the cell culture *Spirostomum ambigua* (*S. ambigua*) [11]. The mechanism of ligand-receptor interaction includes the stage of interaction of the xenobiotic with the cell, the disintegration of the intermediate complex, accompanied by a change in the concentration of the cell biosensor due to conformational changes in the receptor, degradation, synthesis of new receptors, and formation of the $C \times L_n$ intermediate state (Fig. 2).

Statistical data processing was conducted using the Student's t-test, as well as the one-way analysis of variance (ANOVA, Analysis Of Variance) developed by Sir Ronald Aylmer Fisher in the Origin Pro program.

The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

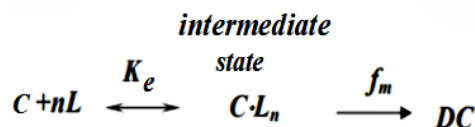


Figure 2. Kinetic scheme of ligand-receptor interaction *S. ambigua* with toxicant: C-cell, L-ligand, n-stoichiometric coefficient, $C \times L_n$ – intermediate state (cell after interaction with the ligand), K_e is the equilibrium constant fast stage, f_m is the rate constant of the cell transition to the dead state, DC is a dead cell [12]

Results and Discussion

Estimation of the size, size distribution, and ζ -potential of dextran colloids based on dynamic light scattering data

Particle size and particle size distribution are very important factors for assessing the effectiveness of a medication 13. Functions of light scattering intensity (I, %) were obtained and analyzed for the characterization of dispersed systems and description of the properties of colloidal particles in the liquid dextran pharmaceutical solution, including the hydrodynamic diameter of particles (d, nm); volume concentration (V, %) — hydrodynamic diameter of particles (d, nm); the grain size distribution of the sample (polydispersity index, PDI), as well as ζ -potential (mV) as an indicator of particle surface charge and the measure of electrostatic interaction.

According to the Mie theory and the Rayleigh-Gans-Debye (RGD) approximation, light scattering occurs independently on each particle [14, 15]. The total intensity of the scattered light is proportional to the concentration of particles in the sample. The RGD approximation may be disrupted with increasing concentration due to the interaction that occurs between particles [16, 17]. This is reflected in the relation between the diffusion coefficient D and the particle radius (see eq. 1). In connection with this, we also conducted studies of the effect of dilutions of 1:100 on the dispersion properties of a Rpg solution (Fig. 3).

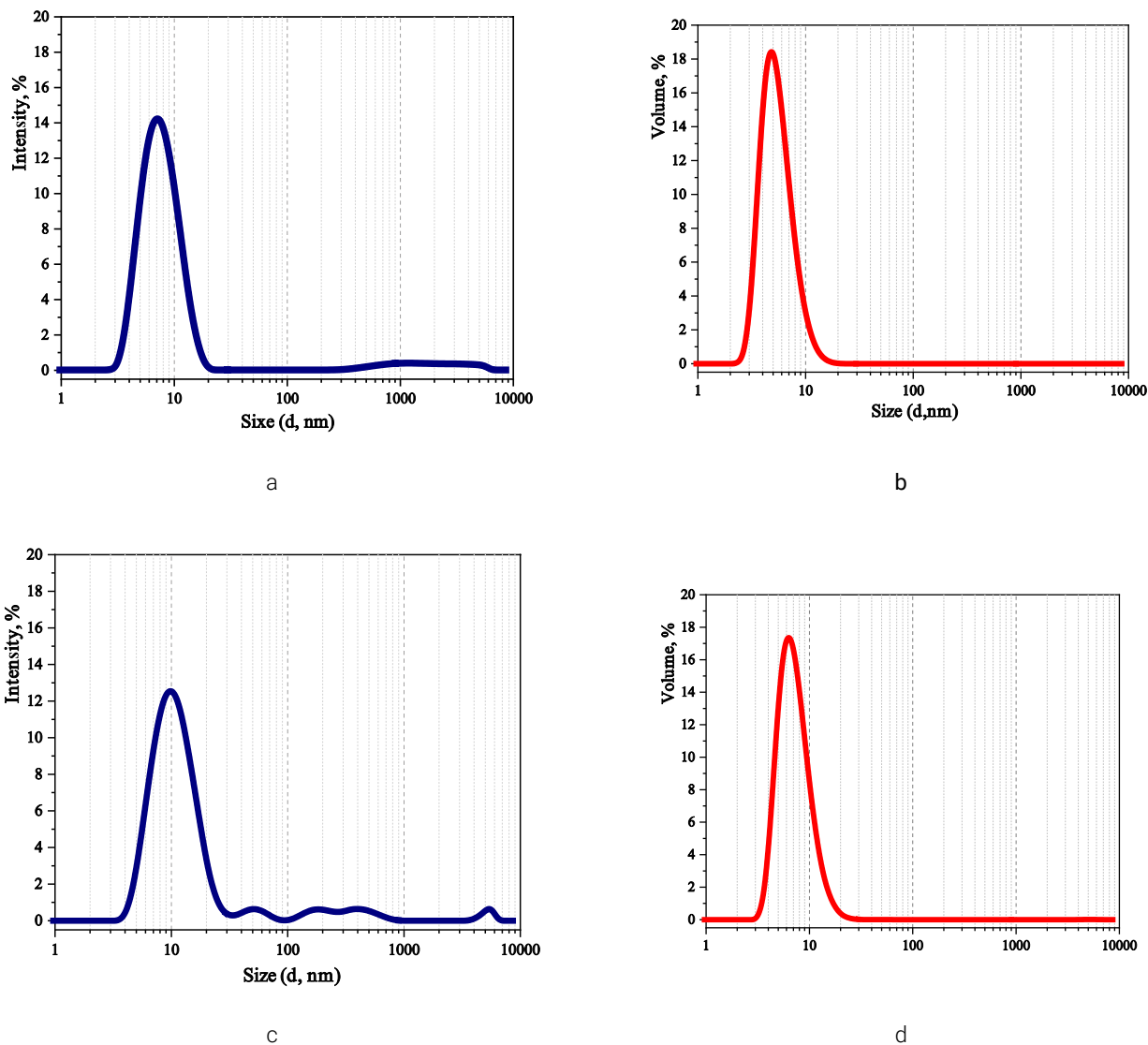


Figure 3. Size distribution of nanoparticles in the reopolyglukin solution in units of intensity (I, %) and volume concentration (V, %): (a) and (b) in the original 10% solution; (c) and (d) at a dilution of 1:100

The figures show unimodal, narrow peaks of colloidal particle distribution in dextran 10% solution, both in intensity units (I, %) and volume concentration units (V, %): $D_{I, Mean} = 7,6 \text{ nm}$ \cup $D_{V, Mean} = 5,6 \text{ nm}$.

The monodispersity of the sample is confirmed by the polydispersity index $PDI = 0,22$, the values of which are sensitive to the presence of aggregates in solutions:

the homogeneity of particles in the population leads to a narrow resultant size distribution and small PDI values, which determines the monodispersity of the sample (see. fig. 3 (a, b)). The polydispersity index value in the diluted 1:100 sample Rpg decreases ($PDI = 0,20$), which suggests a greater homogeneity of the colloidal solution (Table 1).

Table 1

Characteristics of dispersibility of colloidal blood substitute samples according to DLS method

Test sample	Size ± SD, nm		Polydispersity index, PDI	Zeta potential, mV
	Intensity, %	Volume, %		
Reopolyglukin 10%	7,6 ± 2,6	5,6 ± 1,9	0,22	-0,7
Dilution 1:100 (0,1%)	10,7 ± 4,0	7,4 ± 2,7	0,20	-0,6

The reopolyglukin solution contains, according to the pharmaceutical prescription, 0.9% sodium chloride solution. It can be seen that the introduction of electrolyte into the solution causes the dynamic equilibrium between the counterions of the adsorption and diffuse layers to shift towards the adsorption layer. Some fraction of counterions of the diffuse layer passes to the adsorption layer, the diffuse layer shrinks, and the zeta potential value decreases (Table 1).

It is known that in deuterium—depleted water in the content of heavy isotope of hydrogen — deuterium — the

rate of chemical reactions, as well as solvation of ions and their mobility, changes [18]. The so-called kinetic isotope effect is manifested, which gives a control function to the kinetic properties of aqueous media. In connection with the interest to study the relationship between the deuterium content and the disperse properties of the colloidal system of reopolyglukin, we have tested the properties of colloidal systems when diluted with samples of deuterium—depleted water (light water), with natural content (bidistilled) and heavy D₂O water (Fig. 4, Table 2).

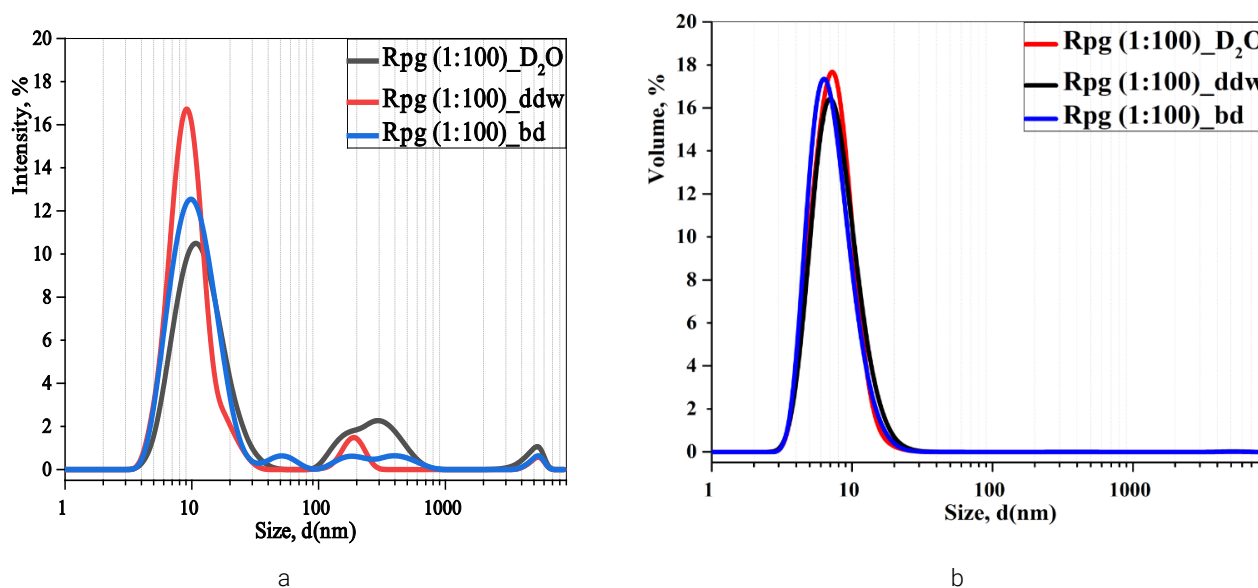


Figure 4. Size distribution of nanoparticles in reopolyglukin solution in 1:100 dilution with bidistilled water, with reduced deuterium content (“light” water) and heavy water D₂O: (a) in intensity units (I, %); (b) volume concentration (V, %)

Table 2

Characteristics of dispersibility of colloidal blood substitute samples according to the DLS method at dilution with the different deuterium content water

Dilute samples (1:100)	Size \pm SD, nm		Polydispersity index, PDI	Zeta potential, ξ mV
	Intensity, %	Volume, %		
Deuterium-depleted water ("light" water)	7,9 \pm 2,2	6,4 \pm 1,8	0,45	-5,7
Bidistilled water	10,7 \pm 4,0	7,4 \pm 2,7	0,20	-0,6
D ₂ O (heavy water)	10,2 \pm 2,9	8,0 \pm 2,4	0,21	-8,65

It can be seen that the smallest size of colloidal particles is characterized by a 1:100 dilution of Rpg in water depleted in deuterium content (red distribution curve). Despite the presence of an additional peak at 190 nm, which is reflected in the PDI value, the volume occupied by nanoparticles in the ddw dilution is the smallest. The smallest fraction of scattered light is the least in heavy water dilution medium (black distribution curve) with an extra peak of the submicron size group at 300 nm. The table data also demonstrates differences in the zeta potential in colloidal blood substitute media with different concentrations of the heavy hydrogen isotope: D₂O and "light" water show greater diffuse layer blurring (Table 2). The impact of the NaCl electrolyte (0.9% solution) on the thickness of the diffuse layer of ions of the double electric layer is most pronounced when in the presence of colloidal blood substitute containing a natural deuterium content of approximately 145 ppm: $\xi = -0,6$ mV (Table 2).

Arrhenius kinetics model-based biopharmaceutical analysis with *Sp. ambigua* protozoa

The rate of mortality of the test item was examined using the Arrhenius hypothesis to evaluate the biological activity of samples that were diluted Rpg with a solvent that contained varying amounts of isotopologues: based on graphical dependencies in the "lifetime — T, K" coordinates, the activation energy of the cell transition process to the DC state could be found (Fig. 2):

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T},$$

where k is the rate constant, E_a is the activation energy (kJ/mol), R is the gas constant (8.314 J/(mol K)), A is the pre-exponential factor, T is temperature (K).

According to the proposed dependency, a cellular biosensor that is similar to an enzyme-substrate complex forms in an intermediate state during the ligand-induced death process. The apparent activation energy (E_a) of 176 kJ/mol was determined using the tangent of the straight line's angle of inclination to the abscissa axis in semilogarithmic coordinates: E_a = 176 kJ/mol (Fig. 5).

Conclusion

The research, which included the use of aqueous isotopologues for the preparation of dilutions, examined the dispersed submicron, nanosized, and biopharmaceutical properties of the colloidal blood substitute reopolyglukin, which contains dextran with a molecular weight of 30—40 kDa (Dex35). The results are presented for the first time in this work. The lack of directions for dispersion phase particle characterization was revealed by a review of current dextran regulation papers. Then, the polydispersity index, the size of colloids, and the electrokinetic potential can be used as standards for medication quality control.

It was feasible to assess the apparent activation energy of death and the average life span of ciliates in different reopolyglukin media by describing their behavioral characteristics using the cellular biosensor *Spirostomum ambigua*.

The outcomes of a comprehensive investigation into the characteristics of a reopolyglukin solution 10% can function as the primary or essential supplementary examinations required to ascertain the legitimacy and biological efficacy/toxicity of colloidal blood substitutes, which are extensively employed in the management of shock states.

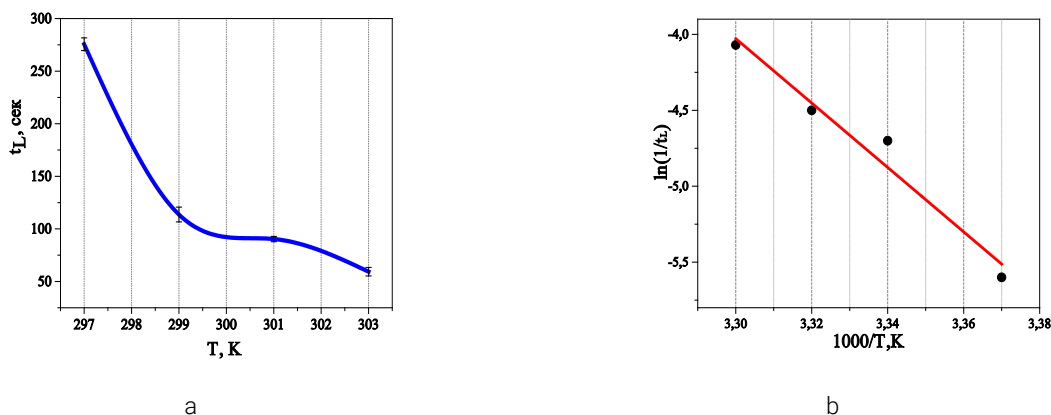

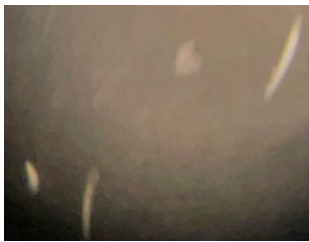
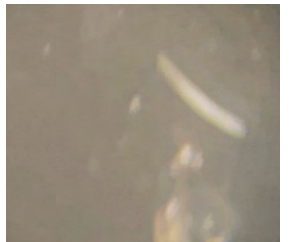


Figure 5. Dependence of *Sp. ambigua* cell biosensor lifetime (“dose-response”) in reopolyglukin dilution with bidistilled water (1:100): (a) direct coordinates; (b) semi-logarithmic coordinates (n=3)

A remarkable observation is the variation in the behavioral characteristics of the cellular biosensor cultured in a medium containing several aqueous isotopologues diluted 1:100. (Table 3).

Table 3

Results of the Spirotox method in the study of biological activity of dilutions (1:100) of reopolyglukin by aqueous isotopologues*

Test parameters	Reopolyglukin sample diluted 1:100		
	Light water (ddw) D/H=4 ppm	Bidistilled water (bd) D/H=140 ppm	Heavy water 99,9% D ₂ O
Behavioral character of ciliates in a cultivated environment	Free, active movement in volume throughout the entire cultivation period	In the first 2 minutes: loss of orientation in space, slow movement. After 2 minutes: free, active movement in volume	At the time of planting in the medium and throughout the entire cultivation period, there is a loss of orientation in space and slow movement within the volume
			
Lifetime, (T=297 K)	276±8,7	235±6,2	143±12,6

Note: *insets are images of *Spirostomum ambigua* cells in cultured medium.


References/Библиографический список

1. Thomas H, Tim L, Brigitte H, Stephanie H. Functional Polymers Based on Dextran. *Advances in Polymer Science*. 2006; 205:199—291. doi: 10.1007/12_100. ISBN 978-3-540-37102-1
2. Wang M, Xian Y, Lu Z, Wu P, Zhang G. Engineering polysaccharide hydrolases in the product-releasing cleft to alter their product profiles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;256 (2):128416. doi: 10.1016/j.ijbiomac
3. Ernst L, Offermann H, Werner A, Wefers D. Comprehensive structural characterization of water-soluble and water-insoluble homoexopolysaccharides from seven lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 2024;1(323):121417. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121417.
4. Dahiya D, Nigam PS. Dextran of Diverse Molecular-Configurations Used as a Blood-Plasma Substitute, Drug-Delivery Vehicle and Food Additive Biosynthesized by *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Weissella*. *Applied Sciences*. 2023;13:12526. doi: 10.3390/app132212526
5. Soeiro VC, Melo KRT, Alves MGCF, Medeiros MJC, Grilo MLPM, Almeida-Lima J et al. Dextran: Influence of Molecular Weight in Antioxidant Properties and Immunomodulatory Potential. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17:1340. doi: 10.3390/ijms17081340
6. Li M, Li J, Qin X, Cai J, Peng R, Zhang M. The effects of dextran in residual impurity on trehalose crystallization and formula in food preservation. *Food Chemistry*. 2024;1(442):138326. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.138326
7. Grönwall A, Ingelman B. Dextran as a Substitute for Plasma. *Nature*. 1945;155: 45. doi: 10.1038/155045a0
8. Rostenberg I, Hernández-Téllez A, Romero-Villaseñor G, Mora G, Guizar-Vázquez J, Cantú JM. Effects of dextran 70 (Macrodex) in a type 3 mucopolysaccharidosis. *Annales Genetique*. 1973;16(2):121—2.
9. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition, [Electronic resource]. — access: Available online: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> (Accessed 3 June 2024).
10. Zhdanov VP. How the partial-slip boundary condition can influence the interpretation of the DLS and NTA data. *Journal of biological physics*. 2020;46:169—176.
11. Shimada M, Hayakawa MM, Suzaki T, Ishida H. Morphological reconstruction during cell regeneration in the ciliate *Spirostomum ambiguum*. *European Journal of Protistology* 2024;28(94):126079. doi: 10.1016/j.ejop.2024.126079.
12. Uspenskaya EV, Pleteneva TV, Hanh MH, Kazimova IV. Assessment of biology activity of the peeling substances by the physicochemical approaches on the *Spirostomum ambiguum* cell model. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2021;13(7):82—86. doi: 10.22159/ijpps.2021v13i7.41927
13. Beran K, Hermans E, Holm R, Sepassi K, Dressman J. Projection of Target Drug Particle Size in Oral Formulations Using the Refined Developability Classification System (rDCS). *Pharmaceutics*. 2023;15,1909. doi: 10.3390/pharmaceutics15071909
14. Shapovalov K. Light scattering of cylindrical particles in Rayleigh-Gans-Debye approximation. 1. Rigorously oriented particles. *Atmospheric and Oceanic Optics*. 2004;17:350—353.
15. Lapuerta M, González-Correa S, Cereceda-Bali F, Moosmüller H. Comparison of Equations Used to Estimate Soot Agglomerate Absorption Efficiency with the Rayleigh-Debye-Gans Approximation. *Journal Quantitative Spectroscopy Radiative Transfer*. 2021; 262:107522, 10.1016/j.jqsrt.2021.107522.
16. Jiamin W, Yongman K, Martin J, Mulvihill TK. Dilution destabilizes engineered ligand-coated nanoparticles in aqueous suspensions Tokunaga. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2018;37(5) doi: 10.1002/etc.4103
17. Kirichenko MN, Masalov AV, Chaikov LL, Zaritsky AR. Relationship of sizes and concentrations of particles in undiluted and diluted blood plasma according to light scattering data // *Short messages on physics FIAN*. 2015. № 2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sootnoshenie-razmerov-i-kontsentratsiy-chastits-v-nerazbavlennoy-i-razbavlennoy-plazme-krovi-podannym-svetorasseyaniya> Accessed 03 May 2024). (In Russian) [Кириченко М.Н., Масалов А.В., Чайков Л.Л., Зарицкий А.Р. Соотношение размеров и концентраций частиц в неразбавленной и разбавленной плазме крови по данным светорассеяния // Краткие сообщения по физике ФИАН. 2015. № 2.].
18. Uspenskaya EV, Pleteneva TV, Kazimova IV, Syroeshkin AV. Evaluation of Poorly Soluble Drugs' Dissolution Rate by Laser Scattering in Different Water Isotopologues. *Molecules*. 2021; 26:601. doi: 10.3390/ molecules26030601

Разработка новых подходов к контролю качества лекарственных средств группы разветвленных полимеров на примере декстрана

Л.А. Марченкова , А. Сафдари , Е.В. Успенская  

Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, г. Москва, Российская Федерация

 uspenskaya_ev@pfur.ru

Аннотация. Актуальность. Коллоидные кровезаменители полиглюкины — применяются в инфузионной терапии на протяжении 70 лет и широко представлены в современной фармацевтической нормативной документации. Полимер глюкозы с (1 → 6)-типом связи (декстран), как основной активный фармацевтический ингредиент полиглюкинов,

обладает исключительными свойствами, такими, как длительной циркуляцией в кровотоке, инертностью, волеми-ческим, детоксикационным, антитромботическим действием. Контроль качества полиглюкинов на подлинность включает, как правило, спектрометрию в ИК-области, тогда как системы полимерных мицелл требуют характеристику дисперсных и электрофоретических свойств, находящихся в однозначном соответствии с их биологической активностью. Цель работы — разработка новых подходов на основе методов лазерного рассеяния к идентификации препаратов-полимерных кровезаменителей для дополнения существующей нормативной документации, а также оценки их биологической активности методом Spirotox. *Материалы и методы.* Реополиглюкин (Rpg) — водный раствор декстрана молекулярной массой 30—40 кДа (Dex35) и 0,9 % хлорида натрия; вода с различным содержанием тяжелого изотопа; оборудование Malvern Zetasizer ZSP для измерения гидродинамического радиуса, дзета-потенциала коллоидов; Spirotox-тест для оценки биологической активности различных разведений Rpg. *Результаты и обсуждение.* Определение субмикронной дисперсности в исходном Rpg и в разведениях водных изотопологов демонстрирует присутствие частиц $d_{50}(\text{Median}) \sim 10$ нм с объемной концентрацией $V=18\%$ и низким значением индекса полидисперсности $PDI \sim 0,2$. Показано, что на распределение наночастиц по размерам оказывает заметное влияние концентрация изотопа ^2H . Биофармацевтический анализ с применением простейших на модели Аррениусовской кинетики показал снижение токсичности водных растворов Rpg в среде с пониженным содержанием изотопа ^2H . *Выводы.* Разработаны новые подходы, основанные на применении лазерных методов анализа, для характеристики дисперсных свойств и коллоидной устойчивости полимерных кровезаменителей. *Выводы.* Полученные результаты могут быть включены в новую редакцию фармакопейных статей на препараты Реополиглюкина.

Ключевые слова: гемодинамические кровезаменители, декстран, *Leuconostoc mesenteroides* продуцент, лазерное светорассеяние, коллоидная устойчивость, индекс полидисперсности, оптическая активность

Информация о финансировании. Публикация выполнена в рамках проекта № 033320-0-000 Системы грантовой поддержки научных проектов РУДН.

Вклад авторов: Марченкова Л.А., Сафдари А. — экспериментальная часть, обработка и представление результатов, литературный обзор; Успенская Е.В., Марченкова Л.А. — концепция и дизайн рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарность. Авторы выражают благодарность руководству Медицинского института РУДН за оснащение кафедры высокотехнологичным оборудованием для проведения научных исследований.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 08.05.2024. Принята 12.06.2024.

Для цитирования: Marchenkova L.A., Safdari A., Uspenskaya, E.V. New approaches to quality control of drugs from the group of branched polymers on the example of dextran // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 537–547. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-537-547. EDN: HFDTYZ

Corresponding author: Uspenskaya Elena Valer'yevna — Doctor of Pharmacy, Associate Professor, Professor of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry in RUDN University, 117198, Miklukho-Maklaya st., 6, Moscow, Russian Federation. E-mail: uspenskaya_ev@pfur.ru

Marchenkova L.A. ORCID 0009-0006-9170-1313

Safdari A. ORCID 0009-0004-5238-5042

Uspenskaya E.V. ORCID 0000-0003-2147-8348

Ответственный за переписку: Успенская Елена Валерьевна — д.фарм.н., доцент, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН, Российская Федерация 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8. E-mail: uspenskaya_ev@pfur.ru

Марченкова Л.А. ORCID 0009-0006-9170-1313

Сафдари А. ORCID 0009-0004-5238-5042

Успенская Е.В. ORCID 0000-0003-2147-8348



ГИНЕКОЛОГИЯ GYNECOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-548-559

EDN HHATKB


ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ
REVIEW

Факторы риска рецидивирования вульво-вагинальных инфекций

Е.В. Колесникова¹ , Л.К. Осипова¹  , А.В. Жаров^{1,2} 

¹ Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация

² Краевая клиническая больница № 2, г. Краснодар, Российская Федерация

 milka82@list.ru

Аннотация. *Актуальность.* На сегодняшний день воспалительные и невоспалительные инфекции нижних отделов урогенитального тракта представляют серьезную медицинскую проблему и являются одной из ведущих причин обращения за медицинской помощью к гинекологам. Эти инфекции составляют значительную долю (от 55 до 80 %) среди заболеваний репродуктивной системы. Наиболее часто встречающимися симптомами вульво-вагинальных инфекций (ВВИ) являются дискомфорт в области половых органов, выделения, зуд, поверхностная диспареуния и неприятный запах. Кроме основных клинических признаков воспаления при ВВИ может присутствовать картина дисбиоза влагалища, протекающая без явных признаков воспаления. Таким образом, ВВИ проявляются широким спектром клинических симптомов и являются собирательным понятием нескольких нозологических единиц. *Выводы.* Несмотря на существование большого количества методов диагностики и лечения ВВИ крайне актуальной и сложной остается проблема рецидивирующих вульво-вагинальных инфекций, которые могут приводить к различным патологическим состояниям как в репродуктивной системе, так и в психоэмоциональной и сексуальной сфере пациенток. Эти состояния требуют своевременного выявления и эффективного лечения. Поэтому особую актуальность сегодня приобретает научный поиск, направленный на выявление причин (факторов риска) рецидивирования заболевания. Однако даже при исключении распространенных факторов риска часто не удается предотвратить обострение дисбиоза влагалища у пациенток.

Ключевые слова: дисбиоз влагалища, рецидивирующий дисбиоз влагалища, дисбиоз влагалища и витамин Д, фолиевая кислота, железо, витамин Д, фолиевая кислота, железо и врожденный иммунитет

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

© Колесникова Е.В., Осипова Л.К., Жаров А.В., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Вклад авторов. Разработка концепции — Колесникова Е.В., Жаров А.В. Дизайн исследования — Колесникова Е.В., Осипова Л.К. Сбор и обработка материала, проведение исследования — Осипова Л.К. Подготовка визуализации данных — Колесникова Е.В., Осипова Л.К. Написание текста — Колесникова Е.В., Осипова Л.К. Подготовка и редактирование — Колесникова Е.В., Жаров А.В. Утверждение окончательного варианта статьи — Колесникова Е.В., Жаров А.В. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение — неприменимо.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию — неприменимо.

Поступила 18.03.2024. Принята 10.04.2024.


Для цитирования: Колесникова Е.В., Осипова Л.К., Жаров А.В. Факторы риска рецидивирования вульво-вагинальных инфекций // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 4. С. 548–559. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-548-559. EDN: HHATKB

Risk factors for recurrence of vulvovaginal infections

Ekaterina V. Kolesnikova¹ , Lyudmila K. Osipova¹  , Alexander V. Zharov^{1, 2} 

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² Regional Clinical Hospital No. 2, Krasnodar, Russian Federation

 milka82@list.ru

Abstract. Relevance. Currently, inflammatory and non-inflammatory infections of the lower urogenital tract are a serious medical problem and are one of the main reasons for seeking medical help from gynecologists. These infections account for a significant share (from 55 to 80 %) of diseases of the reproductive system. The most common symptoms of vulvovaginal infections (VVI) are discomfort in the genitals, discharge, itching, superficial dyspareunia and unpleasant odor. In addition to the main clinical signs of inflammation, there may be the symptoms of vaginal dysbiosis that occurs without obvious signs of inflammation. Thus, VVI is manifested by a wide range of clinical symptoms and is a collective term for several nosological entities. **Conclusion.** Despite the existence of various methods for diagnosing and treating VVI, the problem of recurrent vulvovaginal infections, which can lead to various pathological conditions both in the reproductive system and in the psychoemotional and sexual sphere of patients, remains extremely relevant and complex. These diseases require timely detection and effective treatment. Therefore, scientific research aimed at identifying the causes (risk factors) of relapse of the disease is becoming especially relevant today. However, even with the exclusion of general risk factors, the exacerbation of vaginal dysbiosis in patients is often impossible to prevent.

Keywords: vaginal dysbiosis, recurrent vaginal dysbiosis, vaginal dysbiosis and vitamin D, folic acid, iron, vitamin D, folic acid, iron and innate immunity

Funding. The authors declare no external funding.

Author contributions. Concept development — Kolesnikova E.V., Zharov A.V. Research design — Kolesnikova E.V., Osipova L.K. Collecting and processing material, conducting research — Osipova L.K. Data visualization preparation — Kolesnikova E.V., Osipova L.K. Writing text — Kolesnikova E.V., Osipova L.K. Text preparation and editing — Kolesnikova E.V., Zharov A.V. Approval of the final version of the article — Kolesnikova E.V., Zharov A.V. All the authors made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflicting interests.

Ethics approval — not applicable.

Acknowledgments — not applicable.

Consent for publication — not applicable.

Received 18.03.2024. Accepted 10.04.2024.

For citation: Kolesnikova EV, Osipova LK, Zharov AV. Risk factors for recurrence of vulvovaginal infections. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(4):548–559. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-4-548-559. EDN: ННАТКВ

Введение

Вульво-вагинальные инфекции (ВВИ) крайне распространены среди женщин во всех странах мира, независимо от их социально-экономического положения. Эти инфекции составляют значительную долю (от 55 до 80 %) среди заболеваний репродуктивной системы [1]. Часто встречающимся признаком ВВИ является дискомфорт в области половых органов, выделения, зуд, поверхностная диспареуния и неприятный запах. При этом они не всегда представлены классическим воспалением, а могут носить характер дисбиоза, характеризующегося изменением микрофлоры без воспаления слизистой оболочки вульвы и влагалища. По сути, дисбиоз влагалища является собирательным термином, включающим в себя как бактериальный вагиноз (БВ), так и кандидозный вульвовагинит (КВВ), неспецифический (аэробный) вагинит (АВ), а также смешанный вагинит и различные варианты их комбинаций [2]. Крайне значимой медико-социальной проблемой являются рецидивирующие вульвовагинальные инфекции (РВВИ), которые могут приводить к выраженным психосоматическим расстройствам и сексуальной дисфункции, снижать трудоспособность женщин и качество их жизни в целом [3]. Кроме того, РВВИ способствуют развитию инфекций мочевыводящих

путей, воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), повышают риск заражения инфекциями, передающимися половым путем (ИППП), включая ВИЧ, вирус простого герпеса (ВПГ), вирус папилломы человека (ВПЧ), и, как следствие, повышая риск развития неопластических процессов в шейке матки, влагалище и вульве [4–6]. В результате многочисленных исследований установлена тесная связь РВВИ с бесплодием, угрозой выкидыша и преждевременных родов, несвоевременным излитием околоплодных вод, внутриутробным инфицированием плода, воспалительными процессами в послеродовом и послеабортном периоде [7]. Таким образом, РВВИ оказывают крайне негативное влияние как на физическое, так и на психологическое здоровье женщины, требуют своевременного выявления и эффективного лечения. Особую актуальность на сегодняшний день приобретает научный поиск, направленный на выявление причин (факторов риска) рецидивирования заболевания [9, 10].

Распространенность

В целом частота распространенности вагинальных дисбиозов колеблется от 60 до 90 % [11]. Распространенность БВ зависит от возраста женщин

и варьирует от 15 до 80 %, АВ — от 7,9 до 23,7 %, а с КВВ хотя бы раз в жизни сталкивалось 70—75 % женщин [12]. Хотя прямая зависимость между возрастом и наличием БВ не установлена, у женщин и девушек младше 25 лет заболевание встречается реже. Кроме возраста, имеет значение также расовая принадлежность женщин. Так, у афроамериканок и латиноамериканок БВ встречается гораздо чаще, чем у женщин народов Севера [13]. Частота же рецидивирования БВ в среднем составляет от 50 до 67 % [9]. При этом рецидивирующим считается БВ, повторный эпизод которого (после лечения) возникает через 3 месяца и раньше, а рецидивирующим КВВ — в случае более 4 повторяющихся эпизодов в течение года (встречается у 40—50 % женщин) [14]. В России в целом от рецидивирующих ВВИ страдают 30—40 % женщин репродуктивного возраста, при этом лидирует рецидивирующий БВ (50—70 %), а второе место по распространенности занимает рецидивирующий КВВ (в среднем 30 %) [15]. По данным НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, 40—50 % женщин с РВВИ имеют три и более эпизодов обострений в течение года, и 20—30 % женщин с РВВИ имеют пять и более эпизодов в течение года [16].

Факторы риска рецидивирования ВВИ

РВВИ являются полиэтиологичным заболеванием. При этом ключевую роль в развитии РВВИ играет дисбаланс микрофлоры влагалища, вызванный эндогенными и экзогенными факторами, поиск которых продолжается и в настоящее время.

Инфекционные факторы

ИППП нередко сочетаются с нарушением биоценоза влагалища. Так, женщины с БВ имеют в 3,5 раза выше риск заражения *Mycoplasma genitalium*, в отличие от женщин с нормоценозом [17]. Также часто обнаруживается сочетание БВ с инфекциями, вызванными *T. vaginalis*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, ВПЧ и ВИЧ, причем БВ и ИППП имеют агонистические отношения. С одной стороны,

низкая численностью *Lactobacillus spp.* и более высокий рН влагалища при БВ способствует росту микроорганизмов, вызывающих ИППП, с другой — наличие ИППП повышает риск развития вагинального дисбиоза, например, КВВ — на 34,74 % [18, 5]. Повышенный риск инфицирования и персистенции ВПЧ у женщин с дисбиозом влагалища связывают со снижением таких защитных факторов, как молочная кислота, перекись водорода и антимикробных пептидов [19]. Кроме того, *Lactobacillus spp.*, являющиеся источником бактериоцинов и компонентов клеточных стенок бактерий, могут модулировать иммунные реакции хозяина, включая противовирусные и противоопухолевые компоненты локального иммунитета [20—23]. Отсутствие *Lactobacillus spp.* и l-молочной кислоты, обладающей вирулицидной активностью при низком рН, связывают также с выделением вируса простого герпеса 2 (ВПГ-2), в то же время эпизоды заражения или обострения ВПГ-2 на 30 % увеличивают риск развития БВ [18]. Таким образом, наличие вагинального дисбиоза требует обязательной диагностики всех ИППП и своевременного их лечения. Говоря об инфекционных факторах риска, нельзя не упомянуть, что часто бактерии существуют в сложных полимикробных сообществах (биофлексах), окруженных внеклеточным матриксом [20]. Так, у пациенток с БВ в 70 % случаев встречаются ассоциации различных грамотрицательных микроорганизмов (доминируют чаще *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.*) и в 30 % случаев — грамположительных, с преобладанием *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* [12]. Способность к формированию биофленок может являться одной из причин устойчивости дисбиозов к стандартной терапии, а также возможной причиной рецидивирования заболевания [24]. Многочисленные исследования показали, что микробиота кишечника также играет важную регулирующую роль в поддержании здорового состояния репродуктивного тракта. Установлено, что *Lactobacillus*, колонизирующие ректальную область, являются резервуаром вагинальных *Lactobacillus*, а нарушение видового состава микробиома кишечника со снижением количества лактобактерий (дисбактериоз) часто

приводит к снижению их численности в вагинальном микробиоме и развитию дисбиоза [25]. Таким образом, микрофлора кишечника играет ключевую роль в поддержании нормального биотопа урогенитального тракта, а хронический дисбактериоз кишечника может быть причиной возникновения РВВИ.

Генетические и этнические факторы

Влагалищный микробиом может зависеть от генетических факторов и этнической принадлежности. Как уже было сказано выше, чаще БВ встречается у афроамериканок (51 %), реже (32 %) — у латиноамериканок и европеоидов (23 %), а у коренных народов Севера ханты и манси — лишь у 7 % женщин [26]. С одной стороны, данные различия могут быть обусловлены особенностями питания, уровнем стресса и сексуального поведения женщин разной этнической принадлежности [26]. Однако ряд авторов считает, что более значимую роль, чем культурные различия, в формировании вагинального микробиома играют генетические факторы (особенности иммунной системы, особенно врожденного иммунитета, лиганды на поверхности эпителиоцитов, количество и состав вагинального секрета и др.) [27]. Например, у европейских, кавказских и азиатских женщин отмечается большее видовое разнообразие лактобацилл в вагинальном микробиоме, чем у афроамериканок и латиноамериканок [28], а недавнее исследование Колде и соавторов в рамках проекта «Микробиом человека» выявило большое сходство в составе микробиома между родственниками первой степени родства [29]. С другой стороны, недавние исследования, при проведении которых применялись культурно-зависимые и независимые подходы, вовсе не выявили этнических различий в распространенности бессимптомного БВ у женщин негроидной и европеоидной рас [30]. В то же время результаты масштабного исследования GWAS (Genome-wide association study), представленные в 2024 году, указывают на наличие у женщин с рецидивирующим вагинитом одного ассоциированного варианта на хромосоме 10 и одного потенциально

ассоциированного гена KRT6A, экспрессирующегося во время дифференциации в эпителиальных тканях, что подтверждает роль генетики в развитии РВВИ [31]. В любом случае исследований генотипирования, связанных с особенностями вагинального микробиома, недостаточно, и данное направление требует дальнейшего изучения [9].

Гормональные факторы

На состояние вагинального микробиома значительно влияет гормональный статус женщины. Созревание многослойного плоского эпителия и синтез в нем гликогена происходят под действием эстрогенов. Имеет значение и влияние гормонального фона на состояние локального иммунитета слизистых. Известно, что изменения вагинального микробиома отмечаются в препубертатном и постменопаузальном периодах, при беременности, а также на фоне приема гормональных контрацептивов [32]. Даже в течение менструального цикла вагинальный микробиом претерпевает определенные изменения, в первую очередь в виде увеличения или снижения численности лактобацилл и анаэробов, а также изменения рН вагинального секрета [33]. Данные изменения также обусловлены физиологическими колебаниями уровня половых гормонов в течение менструально-овариального цикла. Именно эти особенности объясняют наиболее частое возникновение рецидивов БВ и других ВВИ во время или сразу после менструации, когда количество *лактобацилл* снижается и увеличивается альфа-разнообразие вагинального микробиома [34]. В перименопаузальном и постменопаузальном периодах наряду с гормональными колебаниями меняется количественный и видовой состав вагинального микробиома, а снижение уровня эстрогенов приводит к атрофии и снижению содержания гликогена в эпителии, являющегося основным питательным веществом для лактобактерий [35]. Однако на изменение и разнообразие вагинального микробиома в этом периоде могут оказывать влияние также репродуктивный анамнез женщины, использование контрацепции и другие факторы [35]. Тем не менее,

гипоэстрогенное состояние однозначно необходимо рассматривать как фактор риска РВВИ и проводить своевременную его коррекцию. Что же касается беременности, то в течение всего гестационного процесса уровни эстрогена и прогестерона увеличиваются, достигая пика в третьем триместре и возвращаясь к исходным значениям через пять дней после родов. По мере развития беременности изменяется и состав вагинального микробиома: микробное разнообразие уменьшается, а количество различных видов *Lactobacillus* увеличивается [33]. Однако в литературе имеются противоположные результаты относительно увеличения или уменьшения разнообразия вагинального микробиома у беременных, что, возможно, объясняется различным этническим происхождением исследуемых женщин [33]. В то же время вагинальный микробиом у беременных при преждевременных родах часто характеризуется снижением распространенности *Lactobacillus* наряду с увеличением количества *Lactobacillus iners*, рассматриваемых сегодня как фактор риска преждевременных родов в сроке более 16 недель беременности.

Зачастую противоречивые данные научной литературы указывают на изменения вагинального микробиома у женщин, использующих гормональную контрацепцию. Так, некоторые авторы указывают на снижение уровня вагинальных *Lactobacillus* и, как следствие, активацию условно-патогенной микрофлоры у женщин на фоне приема эстроген-содержащих комбинированных оральных контрацептивов (КОК) [10]. В то же время другие авторы не обнаружили связи между применением КОК, ЛНГ-ВМС и составом/разнообразием вагинального микробиома [36], а довольно большой ряд исследователей, напротив, утверждают, что КОК оказывают благотворное влияние на вагинальный микробиом и доминирование *Lactobacillus* [37]. Тем не менее, с учетом отсутствия крупных достоверных научных исследований о возможном системном влиянии КОК на состав вагинального микробиома нельзя полностью исключить из возможных факторов риска РВВИ длительное использование гормональной контрацепции.

В последние годы появился ряд работ, указывающих на нарушения в состоянии вагинального микробиома у пациенток с синдромом поликистозных яичников (СПЯ), что также подтверждает влияние гормонального статуса на состав микрофлоры и риск развития РВВИ. Так, в 2020 году Хонг и соавторы установили большее альфа-разнообразие, достоверное снижение количества лактобактерий и увеличение численности бактерий родов *Mycoplasma* и *Prevotella* у женщин с СПЯ относительно контрольной группы [38]. Авторы даже предложили рассматривать *Mycoplasma* в качестве потенциального биомаркера СПЯ. Схожие результаты были получены и в крупном поперечном исследовании, проведенном в 2023 году на 1446 участниках (713 больных СПЯ и 733 исследуемых из контрольной группы): у больных СПЯ в сравнении с контролем выявлены более высокое разнообразие вагинального микробиома, более низкий уровень *Lactobacillus* и повышенное содержание *Gardnerella* и *Ureaplasma*. При этом количество *G. vaginalis* положительно коррелировало с сывороточными уровнями АМГ, эстрадиола и прогестерона ($p = 0,004; 0,005; 0,03$ соответственно). Не исключена и роль кишечного дисбактериоза, нередко встречающегося у больных с СПЯ, на развитие у них вагинального дисбиоза и РВВИ [33].

Гигиенические, сексуальные и поведенческие факторы

Значимое влияние на состояние вагинального микробиома и риск рецидива ВВИ оказывают особенности интимной гигиены, образа жизни и сексуальных отношений женщины. Так, вагинальное спринцевание связано с повышенным риском БВ, способствует воспалительным процессам и повышает риск проникновения и колонизации патогенных бактерий [5]. Crapp S.E. и соавторы указали на негативное влияние на биоценоз влагалища частого использования женщинами для интимной гигиены моющих средств и гелей для душа, а тем более применение не предназначенных для интимной области дезинфицирующих средств,

влажных салфеток, масел, кремов и лосьонов для тела [39]. В то же время Vitew A. и соавторы показали, что редкая интимная гигиена, как и редкая смена нижнего белья, повышают риск развития БВ [40]. В качестве возможного фактора риска вагинального дисбиоза рассматриваются также частое и длительное применение вагинальных тампонов, негативно влияющих на иммунный барьер и клеточную целостность, а также длительное использование ежедневных гигиенических прокладок [12]. Таким образом, в качестве однозначного фактора РВВИ можно рассматривать вагинальные спринцевания, в то время как влияние широкого спектра средств для интимной женской гигиены на вагинальный микробиом требуют дополнительных уточняющих исследований [5].

Среди факторов РВВИ, связанных с сексуальной активностью, рассматриваются большое количество партнеров, использование сексуальных аксессуаров, оральная и анальная секс, а также гомосексуальные и бисексуальные контакты [41]. Кроме того, до настоящего времени ведутся споры о возможности передачи БВ половым путем, или, по крайней мере, о том, что БВ может быть спровоцирован сексуальными контактами [12]. Так, исследования с применением методов секвенирования подтвердили обилие БВ-ассоциированных бактерий в субпрепуциальном пространстве и дистальном отделе уретры у бессимптомных партнеров-мужчин пациенток с рецидивирующим БВ, что может приводить к повторному рецидиву заболевания [24]. Например, пилотное исследование, проведенное в 2021 году, показало снижение частоты рецидивов БВ у женщин, чьи постоянные партнеры прошли комбинированное лечение метронидазолом и местным клиндамициновым гелем. Однако все еще требуются расширенные и углубленные клинические исследования, направленные на изучение ключевых микробных факторов РВВИ, ассоциированных с половыми партнерами [24].

Среди поведенческих факторов риска РВВИ рассматриваются курение, стресс и особенности питания женщин. Так, некоторые эпидемиологические исследования представили курение сигарет в каче-

стве «модифицируемого» фактора риска БВ [42]. Вагинальная флора курильщиц характеризуется меньшим содержанием *лактобацилл*, а также более высоким уровнем биогенных аминов, способных влиять на вирулентность условных патогенов и способствующих появлению неприятного запаха вагинальных выделений [43]. Относительно недавно ученые стали изучать влияние стресса на состояние вагинального микробиома. Известно, что хронический психосоциальный стресс активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую и симпатoadреналовую системы и сопровождается повышением уровня кортизола, который не только приводит к дисфункции врожденного иммунитета слизистых (снижение активности нейтрофилов, антимикробных пептидов и др.), но и блокирует эстроген-индуцированное накопление гликогена в клетках вагинального эпителия, нарушая баланс вагинальной среды [44]. Данный эффект особенно значителен во время беременности, когда плацента и плодные оболочки производят высокие уровни кортикотропин-рилизинг гормона. Однако репрессивная роль кортизола в отложении гликогена в вагинальном эпителии пока доказана только в экспериментах на животных, что требует проведения подобных исследований у людей.

В последние годы в качестве фактора риска РВВИ рассматриваются особенности питания. В первую очередь, это связано с влиянием диеты на состав и функции кишечного микробиома, оказывающего прямое влияние на вагинальный биоценоз [45]. Данная взаимосвязь может частично объяснить большую распространенность БВ в странах с низким уровнем жизни и ограниченными ресурсами, например, в странах Африки [46]. При этом в условиях дефицита питательных веществ в организме возникают нарушения как врожденного, так и приобретенного иммунитета с повышенной восприимчивостью к инфекционным процессам и склонностью к их рецидивированию [45]. С другой стороны, характерная для развитых стран диета, богатая углеводами и жирами, в сочетании с дефицитом молочных продуктов и микроэлементов способствует развитию как метаболических нарушений,

так и дисбиотических процессов в кишечнике и, как следствие, в вагинальном микробиоме, способствуя развитию РВВИ [10]. Важно отметить, что именно дефициту витаминов и микроэлементов посвящено большинство современных исследовательских работ, направленных на изучение взаимосвязи питания с риском развития кишечного и вагинального дисбиозов.

Дефицит микронутриентов как фактор риска РВВИ

В последние годы появляется все больше исследований, направленных на выявление взаимосвязи между дефицитом того или иного микроэлемента или витамина и риском развития дисбиотических процессов в вагинальном микробиоме, включая РВВИ. Особенно много работ посвящено влиянию дефицита витамина D на риск развития БВ и других ВВИ. Так, исследования подтвердили, что дефицит витамина D у беременных связан с повышенным риском развития БВ [47]. При этом дефицит витамина D способствует усиленной выработке провоспалительных цитокинов у беременных, что повышает риск прерывания беременности. Несмотря на результаты некоторых исследований, не выявивших взаимосвязь витамина D с риском развития БВ, большинство авторов все же предлагают рассматривать дефицит данного витамина в качестве одного из факторов риска развития РВВИ как у беременных, так и у небеременных женщин [48]. Наряду с витамином D Matsumoto N. и соавторы в 2021 году также выявили значительную отрицательную корреляцию между количеством *Bacteroides* и *Lachnospiraceae* и потреблением белка, натрия, железа, витаминов B6 и B12, при том, что *Lactobacillus* рассматриваются в качестве довольно устойчивых бактерий относительно факторов окружающей среды, включая дефицит микронутриентов [49]. В более ранних работах также указывается, что потребление фолиевой кислоты, витамина E и кальция снижает риск БВ, а дефицит железа у беременных женщин повышает риск его развития [50]. При этом роль фолиевой кислоты в патогенезе и прогрессировании

БВ и других ВВИ изучена недостаточно. Некоторые работы указывают на негативное влияние дефицита витамина B9 на функционирование различных компонентов иммунной системы, что, в свою очередь, может повысить восприимчивость к БВ и другим ВВИ [51]. К сожалению, исследований на эту тему не так много, лишь в двух работах 2007 и 2011 годов выдвигались предположения, что дефицит фолиевой кислоты связан с риском возникновения БВ, однако точный механизм этой связи оставался неясным [52]. Позже было установлено, что фолиевая кислота участвует в поддержании иммунного ответа, опосредованного Th1, то есть способствует адекватной работе адаптивного иммунитета, что снижает риск развития ВВИ [53]. Эти данные были подтверждены и в недавнем исследовании 2023 года, которое показало, что содержание фолиевой кислоты в сыворотке крови и в эритроцитах отрицательно связано с БВ, а добавки фолатов могут играть важную роль в профилактике и лечении БВ [54]. Что же касается железа, то оно является необходимым металлом для метаболизма и колонизации большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных микроорганизмов, а также грибов, в том числе *C. albicans* [550]. При этом *Lactobacillus* рассматриваются как редкая группа бактерий, не нуждающихся в железе. То есть можно предположить, что в условиях дефицита железа активность *Lactobacillus* не будет меняться, в то время как нуждающиеся в железе условные или абсолютные патогены могут объединяться в микробные ассоциации (био пленки) для удовлетворения своих потребностей в железе, усиливая свои вирулентные свойства [56]. С другой стороны, немаловажную роль железо играет и в функционировании иммунной системы, особенно врожденного иммунитета. Так, железо входит в состав ферментов, отвечающих за переваривание (фагоцитоз) патогенов в макрофагах и нейтрофилах, повышая эффективность и завершенность фагоцитоза и способствуя уничтожению внутриклеточных бактерий, например, гонококков и микоплазм. Установлено, что люди, страдающие нарушениями со стороны гомеостаза железа, склонны к развитию инфекционных заболеваний, вызываемых оппор-

тунистическими патогенами, кроме того, дефицит железа может приводить к активации мицелиальных и дрожжевых грибов [56]. В то же время на течение инфекционного процесса может негативно влиять как дефицит, так и перегрузка железом, усугубляющая его тяжесть [57]. В любом случае не вызывает сомнения значимое влияние статуса железа в организме на развитие инфекционных и дисбиотических процессов. В литературе имеются единичные работы о взаимосвязи уровня железа с персистенцией в организме анаэробов, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* и *S. Albicans* [58]. Так, в исследовании 2016 года представлены результаты более успешной терапии кандидоза ротовой полости при добавлении к противогрибковому лечению препаратов железа [59], а в исследовании 2022 года установлено, что для пациентов с ЖДА характерен дисбактериоз кишечника, особенно в дистальных его отделах [60]. В то же время, лишь одно исследование, посвященное связи дефицита железа с БВ, было проведено в 2005 году и показало, что субклинический дефицит железа на прегравидарном этапе тесно и независимо связан с развитием БВ на ранних сроках беременности. Таким образом, исследования о влиянии дефицита железа на риск развития РВВИ на сегодняшний день практически отсутствуют, что значительно актуализирует научный поиск в данном направлении.

Заключение

Поиск первопричин и факторов риска вагинального дисбиоза, лежащего в основе рецидивирующих вульво-вагинальных инфекций, является сложной и крайне актуальной научной задачей. Коррекция выявленных факторов рецидивирования заболевания может не только обеспечить полноценное лечение, но и длительную профилактику дисбиотических процессов во влагалище. Возрастающий в последние годы интерес к изучению влияния микронутриентного дефицита на развитие рецидивирующих вагинальных инфекций требует проведения дальнейших исследований, которые могут сыграть положительную

роль в лечении, профилактике и снижении частоты рецидивирования вульво-вагинальных инфекций.

Библиографический список/References

1. Strelec IO, Grechkanev GO. Experience of successful combination therapy of frequently recurrent bacterial vaginosis. *Medical almanac*. 2021;3(68): 66—69 (In Russ.) [Стрелец И.О., Гречканев Г.О. Опыт успешной комбинированной терапии часто рецидивирующего бактериального вагиноза. Медицинский альманах. 2021;3(68): 66—69.]
2. Bebneva TN, Dyshkovets AA. Vaginal dysbiosis is an interdisciplinary issue. Perspectives from a gynecologist and immunologist. Methods, options, and prospects for addressing. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2020;3(3): 157—162 (In Russian) [Бибнева Т.Н., Дышковец А.А. Дисбиоз влагалища как междисциплинарная проблема. Взгляд с позиций гинеколога и иммунолога. Методы, пути и перспективы решения. РМЖ. Мать и дитя. 2020;3(3):157—162] doi: 10.32364/2618-8430-2020-3-3-157-162
3. Thomas-White K, Navarro P, Wever F, King L, Dillard LR, Krapf J. Psychosocial impact of recurrent urogenital infections: a review. *Womens Health (Lond)*. 2023;19:17455057231216537. doi: 10.1177/17455057231216537
4. Osipova LK, Kolesnikova EV, Zharov AV, Penzhoyan MA. Obstetric, somatic and infectious risk factors for vulvar lichen sclerosus. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(1):86—103. [Осипова Л.К., Колесникова Е.В., Жаров А.В., Пенжоян М.А. Акушерские, соматические и инфекционные факторы риска склеротического лишая вульвы. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024;28(1):86—103.] doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-1-86-103
5. Mulinganya G, De Vulder A, Bisimwa G, Boelens J, Claeys G, De Keyser K, De Vos D, Hendwa E, Kampara F, Kujirakwinja Y, Mongane J, Mubalama I, Vaneechoutte M, Callens S, Cools P. Prevalence, risk factors and adverse pregnancy outcomes of second trimester bacterial vaginosis among pregnant women in Bukavu, Democratic Republic of the Congo. *PLoS One*. 2021;25;16(10): e0257939. doi: 10.1371/journal.pone.0257939
6. Abramashvili YuG, Kolesnikova NV, Borisova OYu, Guryanova SV. Low molecular weight bioregulator of bacterial origin in condylomatosis therapy optimization. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(2):163—167. doi: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-163-167
7. Kozlova AA, Nikolaeva AV, Pripudnevich TV, Baranov II, Meshalkina IV. Vaginal microbiome in women during pregnancy and postpartum period: dynamics, its link with the intestinal microflora and its influence on microbiota formation in newborns. *Obstetrics and Gynecology: News, Opinions, Training*. 2021;9(4):71—8. (In Russian) [Козлова А.А., Николаева А.В., Припутневич Т.В., Баранов И.И., Мешалкина И.В. Микробиом влагалища женщины во время беременности и в послеродовом периоде: динамика, взаимосвязь с кишечной микрофлорой, влияние на становление микробиоты новорожденного. Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2021;9(4):71—78.] doi: https://doi.org/10.33029/2303-9698-2021-9-4-71-78

8. Kolesnikova EV, Zharov AV, Osipova LK, Dupleev AI. Predicting the development of vulvar lichen sclerosus. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(1):76—85. (In Russian). [Колесникова Е.В., Жаров А.В., Осипова Л.К., Дуплеев А.И. Прогнозирование развития склеротического лишая вульвы. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024;28(1):76—85.]. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-1-76-85
9. Verwijs MC, Agaba SK, Darby AC, van de Wijgert JHM. Impact of oral metronidazole treatment on the vaginal microbiota and correlates of treatment failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;222(2):157.e1—157.e13. doi: 10.1016/j.ajog.2019.08.008
10. Vodstrcil LA, Muzny CA, Plummer EL, Sobel JD, Bradshaw CS. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Med*. 2021;19(1):194. doi: 10.1186/s12916-021-02077-3
11. Dikke GB. Bacterial vaginosis: novel aspects of etiology, pathogenesis, and selection of therapeutic strategy. *Russian Journal of Woman and Child Health*. 2019;2(4):307—313 (In Russian) [Дикке Г.Б. Бактериальный вагиноз: новые аспекты этиопатогенеза и выбора терапевтических стратегий. РМЖ. Мать и дитя. 2019;2(4):307—313]. doi: 10.32364/2618-8430-2019-2-4-307-313
12. Ma X, Wu M, Wang C, Li H, Fan A, Wang Y, Han C, Xue F. The pathogenesis of prevalent aerobic bacteria in aerobic vaginitis and adverse pregnancy outcomes: a narrative review. *Reprod Health*. 2022;19(1):21. doi: 10.1186/s12978-021-01292-8
13. Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, de Salazar A, Plaza-Díaz J, García F. Reviewing the Composition of Vaginal Microbiota: Inclusion of Nutrition and Probiotic Factors in the Maintenance of Eubiosis. *Nutrients*. 2020;12(2):419. doi: 10.3390/nu12020419
14. Cooke G, Watson C, Deckx L, Pirota M, Smith J, van Driel ML. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). *Cochrane Database Syst Rev*. 2022;1(1): CD009151. doi: 10.1002/14651858.CD009151.pub2
15. Ivanova EA, Radzinsky VE, Makarov AV. Recurrent bacterial vaginosis: etiology, pathogenesis, diagnosis, treatment. М.: “GEOTAR-Media”, 2018. 256 p. (In Russian). [Иванова Е.А., Радзинский В.Е., Макаров А.В. Рецидивирующие бактериальные вагинозы: этиология, патогенез, диагностика, лечение. М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2018. 256 с.]
16. Lokken EM, Balkus JE, Kiarie J, Hughes JP, Jaoko W, Totten PA, McClelland RS, Manhart LE. Association of Recent Bacterial Vaginosis With Acquisition of *Mycoplasma genitalium*. *Am J Epidemiol*. 2017;186(2):194—201.
17. Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):35—47. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.019
18. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG*. 2020;127(2):171—180. doi: 10.1111/1471-0528.15854
19. Kira EF, Yatsyshina SA, Dyakonov SA. Microbial secrets. *Status Praesens. Gynecology, obstetrics, infertile marriage*. 2020;4(69):70—75. (In Russian). [Кира Е.Ф., Яцышина С.А., Дьяконов С.А. Микробные тайны. StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак. 2020; 4(69):70—75].
20. Vodstrcil LA, Muzny CA, Plummer EL, Sobel JD, Bradshaw CS. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Med*. 2021;19(1):194. doi: 10.1186/s12916-021-02077-3
21. Guryanova SV. Immunomodulation, Bioavailability and Safety of Bacteriocins. *Life*. 2023;13:1521. doi: https://doi.org/10.3390/life13071521
22. Guryanova SV. Regulation of Immune Homeostasis via Muramyl Peptides-Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin. *Microorganisms*. 2022;10(8):1526. doi: https://doi.org/10.3390/microorganisms10081526
23. Guryanova SV, Gigani OB, Gudima GO, Kataeva AM, Kolesnikova NV. Dual Effect of Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin in Experimental Model of Asthma. *Life*. 2022;12:192. doi: https://doi.org/10.3390/life12020192
24. Nikolaeva AV, Kozlova AA, Baranov II, Pripitnevich TV. Current understanding of the relationship between gut and vaginal microbiotas. *Obstetrics and Gynecology*. 2021;9:5—11. (In Russian). [Николаева А.В., Козлова А.А., Баранов И.И., Припутневич Т.В. Современные представления о взаимосвязи кишечной и вагинальной микробиот. Акушерство и гинекология. 2021;9:5—11]. doi: 10.18565/aig.2021.9.5-11
25. Bezmenko AA, Sadovaya ND. Vaginal and intestinal microbiocenosis composition in pregnant women. *Journal of obstetrics and women's diseases*. 2019; 68(6): 29—36. (In Russian). [Безменко А.А., Садовая Н.Д. Состояние микробиоценозов влагалища и кишечника у беременных. Журнал акушерства и женских болезней. 2019; 68(6):29—36]. doi: 10.17816/JOWD68629-36
26. Salazar AS, Nogueira NF, Rodriguez VJ, Mantero A, Cherenack EM, Raccamarich P, Maddalon M, Brophy T, Montgomerie E, Klatt NR, Jones DL, Alcaide ML. A Syndemic Approach to Explore Factors Associated with Bacterial Vaginosis. *AIDS Behav*. 2022;26(9):3110—3118. doi: 10.1007/s10461-022-03634-4
27. Nakama C, Thompson B, Szybala C, McBeth A, Dobner P, Zwickey H. The Continuum of Microbial Ecosystems along the Female Reproductive Tract: Implications for Health and Fertility. *Pathogens*. 2022;11(11):1244. doi: 10.3390/pathogens11111244
28. Kolde R, Franzosa EA, Rahnavard G, Hall AB, Vlamakis H, Stevens C, Daly MJ, Xavier RJ, Huttenhower C. Host genetic variation and its microbiome interactions within the Human Microbiome Project. *Genome Med*. 2018;10(1):6. doi: 10.1186/s13073-018-0515-8
29. Beamer MA, Austin MN, Avolia HA, Meyn LA, Bunge KE, Hillier SL. Bacterial species colonizing the vagina of healthy women are not associated with race. *Anaerobe*. 2017;45:40—43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.02.020
30. Mutli E, Mändar R, Koort K, Salumets A, Team EBR, Laisk T. Genome-wide association study in Estonia reveals importance of vaginal epithelium associated genes in case of recurrent vaginitis. *J Reprod Immunol*. 2024;162:104216. doi: 10.1016/j.jri.2024.104216
31. Murphy K, Keller M, Anastos K. Impact of reproductive aging on the vaginal microbiome and soluble immune mediators in women living with and at-risk for HIV infection. *PLoS ONE*. 2019;14:e0216049. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216049
32. Bastianelli C, Farris M, Bianchi P. The effect of different contraceptive methods on the vaginal microbiome. *Expert Review of*

- Clinical Pharmacology*. 2021;14(7):1—16. doi: <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1917373>
33. Sobel JD, Kaur N, Woznicki NA, Boikov D, Aguin T, Gill G, Akins RA. Conventional oral and secondary high dose vaginal metronidazole therapy for recurrent bacterial vaginosis: clinical outcomes, impacts of sex and menses. *Infect Drug Resist*. 2019;12:2297—2307. doi: 10.2147/IDR.S213853
 34. Song SD, Acharya KD, Zhu JE, Deveney CM, Walther-Antonio MRS, Tetel MJ, Chia N. Daily Vaginal Microbiota Fluctuations Associated with Natural Hormonal Cycle, Contraceptives, Diet, and Exercise. *mSphere*. 2020;5(4): e00593—20. doi: 10.1128/mSphere.00593-20
 35. Chen Y, Hong Z, Wang W, Gu L, Gao H, Qiu L, Di W. Association between the vaginal microbiome and high-risk human papillomavirus infection in pregnant Chinese women. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):677. doi:10.1186/s12879-019-4279-6
 36. Donders G, Bellen G, Janssens D, Van Bulck B, Hinoul P, Verguts J. Influence of contraceptive choice on vaginal bacterial and fungal microflora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(1):43—48. doi: 10.1007/s10096-016-2768-8
 37. Balle C, Konstantinus IN, Jaumdally SZ, Havyarimana E, Lennard K, Esra R, Barnabas SL, Happel AU, Moodie Z, Gill K, Pidwell T, Karaoz U, Brodie E, Maseko V, Gamielien H, Bosinger SE, Myer L, Bekker LG, Passmore JS, Jaspan HB. Hormonal contraception alters vaginal microbiota and cytokines in South African adolescents in a randomized trial. *Nat Commun*. 2020;11(1):5578. doi: 10.1038/s41467-020-19382-9
 38. Jin C, Qin L, Liu Z, Li X, Gao X, Cao Y, Zhao S, Wang J, Han T, Yan L, Song J, Zhang F, Liu F, Zhang Y, Huang Y, Song Y, Liu Y, Yao Z, Chen H, Zhang Z, Zhao S, Feng Y, Zhang YN, Qian Y, Sun T, Feng Q, Zhao H. Comparative analysis of the vaginal microbiome of healthy and polycystic ovary syndrome women: a large cross-sectional study. *Reprod Biomed Online*. 2023;46(6):1005—1016. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.02.002
 39. Bitew A, Abebaw Y, Bekele D, Mihret A. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Women Complaining of Genital Tract Infection. *Int J Microbiol*. 2017;2017:4919404. doi: 10.1155/2017/4919404
 40. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68:2080—2091. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318404
 41. Olson KM, Boohaker LJ, Schwebke JR, Aslibekyan S, Muzny CA. Comparisons of vaginal flora patterns among sexual behaviour groups of women: implications for the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Sex Health*. 2018;15(1):61—67. doi: 10.1071/SH17087
 42. Nelson TM, Borgogna JC., Michalek RD., Roberts DW, Rath JM, Glover ED, Ravel J, Shardell MD, Yeoman CJ, Brotman RM. Cigarette smoking is associated with an altered vaginal tract metabolomic profile. *Sci. Rep*. 2018;8:852. doi: 10.1038/s41598-017-14943-3
 43. Amabebe E, Anumba DOC. Psychosocial stress, cortisol levels, and maintenance of vaginal health. *Front. Endocrinol*. 2018;9:568. doi: 10.3389/fendo.2018.00568
 44. Nansel TR, Riggs MA., Yu KF, Andrews WW, Schwebke JR, Klebanoff MA. The association of psychosocial stress and bacterial vaginosis in a longitudinal cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(2):381—6. doi: 10.1016/j.ajog.2005.07.047
 45. Tamarelle J, Creze M M, Savathdy V, Phonekeo S, Wallenborn J, Siengsounthone L, Fink G, Odermatt P, Kounnavong S, Sayasone S, Vonaesch P. Dynamics and consequences of nutrition-related microbial dysbiosis in early life: study protocol of the VITERBI GUT project. *Front Nutr*. 2023;10:1111478. doi: 10.3389/fnut.2023.1111478
 46. Rosen EM, Martin CL, Siega-Riz AM, Dole N, Basta PV, Serrano M, Fettweis J, Wu M, Sun S, Thorp JM, Jr, Buck G, Fodor AA., Engel SM. Is prenatal diet associated with the composition of the vaginal microbiome? *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2022;36(2):243—253. doi: 10.1111/ppe.12830
 47. Dunlop AL, Jordan SL, Ferranti EP, Hill CC, Patel S, Hao L, Corwin EJ, Tangpricha V. Total and Free 25-Hydroxy-Vitamin D and Bacterial Vaginosis in Pregnant African American Women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2019;2019:9426795. doi: 10.1155/2019/9426795
 48. Mojtahedi SF, Mohammadzadeh A, Mohammadzadeh F, Jalili Shahri J, Bahri N. Association between bacterial vaginosis and 25-Hydroxy vitamin D: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2023;23(1):208. doi: 10.1186/s12879-023-08120-3
 49. Thoma ME, Klebanoff MA, Rovner AJ, Nansel TR, Neggers Y, Andrews WW, Schwebke JR. Bacterial vaginosis is associated with variation in dietary indices. *J. Nutr*. 2011;141:1698—1704. doi: 10.3945/jn.111.140541
 50. Kurowska K, Kobylińska M, Antosik K. Folic acid — importance for human health and its role in COVID-19 therapy. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2023;74(2):131—141. doi: 10.32394/rpzh.2023.0252
 51. Uribe-Diaz S, Nazeer N, Jaime J, Vargas-Bermúdez DS, Yitbarek A, Ahmed M, Rodríguez-Lecompte JC. Folic acid enhances proinflammatory and antiviral molecular pathways in chicken B-lymphocytes infected with a mild infectious bursal disease virus. *Br Poult Sci*. 2022;63(1):1—13. doi: 10.1080/00071668.2021.1958298
 52. Neggers YH, Nansel TR, Andrews WW, Schwebke JR, Yu KF, Goldenberg RL, Klebanoff MA. Dietary intake of selected nutrients affects bacterial vaginosis in women. *J Nutr*. 2007;137(9):2128—2133. doi: 10.1093/jn/137.9.2128
 53. Cui TT, Luo J, Deng RL, Yang YT, Yin YW, Chen XF, Chen HK, Liao WZ, Huang ZM, Deng XY, Guo XG. Negative associations between folate and bacterial vaginosis in the NHANES 2001 to 2004. *BMC Infect Dis*. 2023;23(1):483. doi: 10.1186/s12879-023-08318-5
 54. Golonka R, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J Innate Immun*. 2019;11(3):249—262. doi: 10.1159/000494627
 55. Yadav R, Noinaj N, Ostan N, Moraes T, Stoudenmire J, Maurakis S, Cornelissen C.N. Structural Basis for Evasion of Nutritional Immunity by the Pathogenic *Neisseriae*. *Front Microbiol*. 2020;10:2981. doi: 10.3389/fmicb.2019.02981
 56. Akinbosede D, Chizea R, Hare SA. Pirates of the haemoglobin. *Microb Cell*. 2022;9(4):84—102. doi: 10.15698/mic2022.04.775
 57. Zhang Y, Sen S, Giedroc DP. Iron Acquisition by Bacterial Pathogens: Beyond Tris-Catecholate Complexes. *Chembiochem*. 2020;21(14):1955—1967. doi: 10.1002/cbic.201900778
 58. Perálvarez-Marín A, Baranowski E, Bierge P, Pich OQ, Lebrette H. Metal utilization in genome-reduced bacteria: Do human mycoplasmas rely on iron? *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:5752—5761. doi: 10.1016/j.csbj.2021.10.022

59. Soriano-Lerma A, García-Burgos M, Alférez MJM, Pérez-Carrasco V, Sanchez-Martin V, Linde-Rodríguez Á, Ortiz-González M, Soriano M, García-Salcedo JA, López-Aliaga I. Gut microbiome-short-chain fatty acids interplay in the context of iron deficiency anaemia. *Eur J Nutr*. 2022;61(1):399—412. doi: 10.1007/s00394-021-02645-6

60. Verstraelen H, Delanghe J, Roelens K, Blot S, Claeys G, Temmerman M. Subclinical iron deficiency is a strong predictor of bacterial vaginosis in early pregnancy. *BMC Infect Dis*. 2005;5:55. doi: 10.1186/1471-2334-5-55

Ответственный за переписку: Осипова Людмила Кирилловна — аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация, 350012, г. Краснодар, ул. Красных Партизан, 6/2. E-mail: milka82@list.ru 89184368304

Колесникова Е.В. SPIN 3707-3561, ORCID 0000-0002-6537-2572

Жаров А.В. SPIN 5292-3261, ORCID 0000-0002-5460-5959

Осипова Л.К. ORCID 0009-0003-0257-6732

Corresponding author: Osipova L.K. — PhD student of the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the FPC and Teaching Staff of the FGBOU VO KubSMU of the Ministry of Health of Russia, 350012, Krasnodar, Krasnykh Partizan st., 6/2, Russian Federation. E-mail: milka82@list.ru

Kolesnikova E.V. ORCID 0000-0002-6537-2572

Zharov A.V. ORCID 0000-0002-5460-5959

Osipova L.K. ORCID 0009-0003-0257-6732

