








doi 10.18699/vjgb-25-03

Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*

В.С. Подвысоцкая^{1, 2} &, Е.В. Григорьева ^{1, 3} & , А.А. Малахова ^{1, 3}, Ю.М. Минина ¹, Ю.В. Вяткин⁴, Е.А. Хабарова^{1, 5}, Дж.А. Рзаев⁵, С.П. Медведев ^{1, 3}, Л.В. Коваленко ⁶, С.М. Закиян ^{1, 3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Новые Программные Системы», Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁶ Сургутский государственный университет, Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, Россия

 evlena@bionet.nsc.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона – тяжелое нейродегенеративное заболевание, поражающее дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции головного мозга. Известные патологические генетические варианты, ассоциированные с болезнью Паркинсона, объясняют причину всего 5 % случаев заболевания, поэтому исследования в этой области актуальны и активно продолжаются. В данной работе мы обнаружили двух пациентов с клиническим диагнозом «болезнь Паркинсона» с генетическим вариантом *LGR4*: с.1087G>T (p.Gly363Cys, rs117543292). Этот ген кодирует мембранный рецептор LGR4 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4), ассоциированный с G-белком, который участвует в регуляции функционирования сигнального пути WNT/β-катенин. Данный сигнальный путь необходим для пролиферации нейронов во время их дифференцировки, поэтому его дисфункция в результате гетерозиготной мутации с.1087G>T в гене *LGR4* нарушает дифференцировку дофаминергических нейронов, что может приводить к болезни Паркинсона. Идеальным инструментом для изучения связи этого генетического варианта с болезнью Паркинсона является клеточная модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их дифференцированных производных – дофаминергических нейронов. В результате репрограммирования эписомными векторами, экспрессирующими белки OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и trp53DD, мононуклеарных клеток периферической крови двух пациентов с вариантом с.1087G>T гена *LGR4* нами были получены и детально охарактеризованы семь линий ИПСК. Данные ИПСК отвечают всем требованиям плюрипотентных клеток, а именно: стабильно пролиферируют, образуют колонии с характерной для плюрипотентных клеток человека морфологией, имеют нормальный диплоидный кариотип, экспрессируют щелочную фосфатазу и маркеры плюрипотентности (OCT4, NANOG, SSEA-4 и SOX2) и способны дифференцироваться в производные трех зародышевых листков – энто-, экто- и мезодерму. Полученные в работе линии ИПСК будут в дальнейшем использованы для создания релевантной модели, направленной на исследование эффекта варианта с.1087G>T гена *LGR4* на развитие патологического фенотипа дофаминергических нейронов.





Ключевые слова: болезнь Паркинсона; репрограммирование; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ген *LGR4*.

Для цитирования: Подвысоцкая В.С., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Коваленко Л.В., Закиян С.М. Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/vjgb-25-03

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Благодарности. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов и дифференциального окрашивания хромосом проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанного бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0015).

Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene

V.S. Podvysotskaya^{1, 2} &, E.V. Grigor'eva ^{1, 3} & , A.A. Malakhova ^{1, 3}, J.M. Minina ¹, Y.V. Vyatkin⁴, E.A. Khabarova^{1, 5}, J.A. Rzaev⁵, S.P. Medvedev ^{1, 3}, L.V. Kovalenko ⁶, S.M. Zakian ^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ NOVEL Ltd., Novosibirsk, Russia

⁵ Federal Neurosurgical Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁶ Surgut State University, Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Ugra, Russia

 evlena@bionet.nsc.ru

Abstract. Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder affecting dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. The known pathological genetic variants may explain the cause of only 5 % of cases of the disease. In our study, we found two patients with a clinical diagnosis of Parkinson's disease with the genetic variant c.1087G>T (p.Gly363Cys) of the *LGR4* gene. The *LGR4* gene encodes the membrane receptor LGR4 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4) associated with the G protein. We hypothesize that the *LGR4* gene may be either a direct cause or a risk factor for this disease, since it is one of the main participants of the WNT/ β -catenin signalling pathway. This signalling pathway is necessary for the proliferation of neurons during their differentiation, which may lead to Parkinson's disease. To study the relationship between this genetic variant and Parkinson's disease, an ideal tool is a cellular model based on induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their differentiated derivatives, dopaminergic neurons. We reprogrammed the peripheral blood mononuclear cells of the two patients with the c.1087G>T variant of the *LGR4* gene with non-integrating episomal vectors expressing OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC and mp53DD proteins. The obtained seven lines of induced pluripotent stem cells were characterised in detail. The iPSCs lines obtained meet all the requirements of pluripotent cells, namely, they stably proliferate, form colonies with a morphology characteristic of human pluripotent cells, have a normal diploid karyotype, express endogenous alkaline phosphatase and pluripotency markers (OCT4, NANOG, SSEA-4 and SOX2) and are capable to differentiate into derivatives of the three germ layers. The iPSC lines obtained in this work can be used as a tool to generate a relevant model to study the effect of the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene on dopaminergic neuron differentiation.

Key words: Parkinson's disease; reprogramming; induced pluripotent stem cells; *LGR4* gene.

For citation: Podvysotskaya V.S., Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Kovalenko L.V., Zakian S.M. Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/vjgb-25-03

Введение

На сегодняшний день болезнь Паркинсона – второе по частоте встречаемости нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера (Wang et al., 2020). Поражая черную субстанцию головного мозга, а именно дофаминергические нейроны, которые являются важной частью регуляции движения, болезнь Паркинсона приводит к тремору, брадикинезии и ригидности. Разрушение дофаминергических нейронов может наблюдаться вследствие нескольких причин. Накопление в них белка альфа-синуклеина и образование телец Леви, дисфункция митохондрий и лизосом, проблемы синаптического транспорта или транспорта везикул – все факторы в совокупности приводят к ускоренной гибели нейронов. К одним из признаков болезни Паркинсона на клеточном уровне относятся оксидативный стресс, возникающий в результате дисфункции митохондрий (Niu et al., 2021), и стресс эндоплазматического ретикулума, являющийся результатом накопления большого количества неправильно свернутых белков (Fernandes et al., 2016; Marciniak et al., 2022).

В настоящее время известно более 20 генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона. К наиболее распространенным относятся мутации в генах *GBA1*, *LRRK2*,

PRKN и *PINK1* (Funayama et al., 2023). Однако всего около 5 % случаев болезни Паркинсона объясняется наследованием одного из генов, ассоциированных с болезнью. Еще 16–36 % проявляются в результате немонотонного наследования. Поэтому активно продолжается поиск генетических вариантов, ассоциированных с возникновением болезни Паркинсона.

Проанализировав результаты экзомного секвенирования более 70 пациентов с клиническим диагнозом «болезнь Паркинсона», наблюдающихся в ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Новосибирск), мы обнаружили двух пациентов разного пола, не являющихся родственниками, несущих вариант c.1087G>T гена *LGR4* (база данных SRA, проект PRJNA563295). В данном гене известно 48 однонуклеотидных замен, три из которых представляют собой патогенные миссенс-мутации c.2531A>G (p.Asp844Gly), c.286A>G (p.Ile96Val) и c.1087G>T (p.Gly363Cys) (Mancini et al., 2023).

LGR4 является G-сопряженным рецептором и играет роль в функционировании сигнальных путей WNT/ β -катенин и цАМФ/протеинкиназа А (Shi et al., 2021). Ранее было показано, что вариант c.1087G>T гена *LGR4* патоген-

ный и приводит к задержке полового развития вследствие нарушения работы сигнального пути WNT/ β -катенин (Mancini et al., 2023), который задействован также в эмбриогенезе в процессах развития таких тканей и органов, как гонады, почки, нервная система, печень и др. Стоит подчеркнуть, что данный сигнальный путь необходим и при развитии и дифференцировке дофаминергических нейронов (Marchetti et al., 2020). Именно благодаря этой связи и участию белка LGR4 в сигнальном пути WNT/ β -катенин мы предполагаем, что генетический вариант LGR4:c.1087G>T может вызвать дисфункцию или гибель дофаминергических нейронов, что потенциально может быть причиной болезни Паркинсона. Для того чтобы изучить взаимосвязь данного генетического варианта с патогенными процессами, вызывающими гибель дофаминергических нейронов, в первую очередь необходимо создать клеточную модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и релевантных типов клеток, дофаминергических нейронов, дифференцированных из них.

Поддержание плюрипотентного состояния ИПСК осуществляется благодаря добавлению в культуральную среду основного фактора роста фибробластов (FGF-basic/bFGF). Для подтверждения свойства плюрипотентности и самообновления клеток проводятся различные тесты (Grigor'eva et al., 2023), такие, например, как качественный (иммунофлуоресцентное окрашивание) и количественный (ПЦР в реальном времени) анализы на уровне экспрессии разных факторов плюрипотентности (NANOG, SSEA-4, OCT4, SOX2, TRA1-81, TRA1-60 и др.). Известно, что при продолжительном культивировании клеток *in vitro* возможны различные аномалии кариотипа (полиплоидизация, транслокации, делеции, анеуплоидии и др.), поэтому анализ кариотипа представляет собой один из ключевых тестов для характеристики полученных линий ИПСК. Основным тестом, свидетельствующем о плюрипотентности клеток, является спонтанная дифференцировка, необходимая для подтверждения способности ИПСК давать клеточные производные всех трех зародышевых листков (экто-, энто- и мезодермы). Более того, для характеристики полученных линий ИПСК проводят: STR-анализ, подтверждающий происхождение полученных линий ИПСК от донора мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови; тесты, свидетельствующие о наличии в ИПСК генетических вариантов донора МНК или подтверждающие наличие генетических модификаций в случае трансгенеза ИПСК; ПЦР на элиминацию экзогенной ДНК/эписом, обеспечивших репрограммирование соматических клеток; регулярные тесты на отсутствие внутрилабораторной контаминации.

Способность ИПСК при направленной дифференцировке давать производные практически любого типа клеток, например нейроны, кардиомиоциты, клетки печени, эндотелиальные и другие клетки, позволяет использовать их для создания клеточных моделей и изучения на релевантных типах клеток патогенеза различных наследственных заболеваний. Так, в результате репрограммирования МНК периферической крови, культивирования полученных ИПСК и дальнейшей дифференцировки их в нейроны, подобные дофаминергическим (Grigor'eva et al., 2023), и

астроциты (Yarkova et al., 2023) будет возможно создание *in vitro* модели болезни Паркинсона. Данная клеточная платформа позволит проанализировать вклад генетического варианта LGR4:c.1087G>T в развитие заболевания, изучить молекулярно-генетические основы патогенеза болезни Паркинсона, проводить поиск мишеней для создания новых лекарственных средств, участвующих в различных сигнальных путях и блокирующих запуск патогенных процессов, вызывающих гибель дофаминергических нейронов, а также тестировать потенциальные медицинские препараты.

Материалы и методы

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Комитетом по этике научных исследований ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирск), протокол № 1 от 14 марта 2017 г. Образцы периферической крови пациентов были предоставлены данным центром. Пациенты подписали информированное добровольное согласие и информационный лист.

Выделение в градиенте фикола МНК из периферической крови. МНК периферической крови выделяли в градиенте фикола и замораживали, как описано ранее (Григорьева и др., 2024).

Репрограммирование пациент-специфичных МНК. Репрограммирование МНК проводили методом нуклеофекции эписомными векторами, экспрессирующими факторы плюрипотентности: SOX2, OCT4, KLF4, L-MYC, LIN28, а также доминант-негативную форму белка p53 мыши – mp53DD (Addgene ID No. 41813–14, 41855–57) по ранее описанной методике (Grigor'eva et al., 2023). Нуклеофекцию выполняли на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза. Первичные колонии ИПСК переносили в лунки площадью 1 см², предварительно покрытые эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ), инактивированные митомицином С (Sigma-Aldrich).

Культивирование пациент-специфичных ИПСК осуществляли на ЭФМ по ранее описанной методике (Yarkova et al., 2024). Дезагрегировали колонии ИПСК TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) и рассаживали один раз в 3–4 дня в соотношении 1:10 с добавлением ROCK ингибитора – 2 мкМ Thiazovivin (Sigma-Aldrich).

Гистохимическое выявление эндогенной щелочной фосфатазы. Щелочную фосфатазу выявляли с использованием набора SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich). Результат анализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon), используя программное обеспечение NIS Elements Advanced Research, версия 4.30.

Имунофлуоресцентное окрашивание проводили по ранее описанной методике (Grigor'eva et al., 2024). Препараты анализировали на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E, используя программное обеспечение NIS Elements Advanced Research, версия 4.30. Список используемых антител приведен в табл. 1.

Спонтанная дифференцировка ИПСК. Для определения потенциала полученных линий ИПСК проводили спонтанную дифференцировку через образование эмбрионных тел с последующей иммунофлуорес-

Таблица 1. Список антител, используемых в работе

Название	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Первичные антитела			
Маркеры плюрипотентности			
Mouse IgG2b anti-OCT-3/4	1:100	Santa cruz Biotechnology, sc-5279	RRID:AB_628051
Mouse IgG3 anti-SSEA-4	1:25	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
Mouse IgG1 anti-NANOG	1:50	Santa cruz Biotechnology, sc-293121	RRID:AB_2665475
Rabbit IgG anti-SOX2	1:400	Cell Signaling, 3579	RRID:AB_2195767
Маркеры мезодермы			
Mouse IgG2a anti-αSMA	1:200	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
Mouse IgG1 anti-CD29	1:100	Thermo Fisher Scientific, 14-0299-82	RRID:AB_1210468
Маркеры энтодермы			
Mouse IgG2a anti-AFP	1:250	Sigma-Aldrich, A8452	RRID:AB_258392
Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1:250	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
Маркеры эктодермы			
Mouse IgG2a anti TUBB3	1:1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
Chicken IgY anti-MAP2	1:1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
Вторичные антитела			
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157
Goat anti-Mouse IgG2b Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21144	RRID:AB_2535780
Goat anti-Mouse IgG3 Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
Goat anti-Mouse IgG (H + L) Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A-21121	RRID:AB_2535764
Goat anti-Chicken IgY (H + L) Alexa Fluor 488	1:400	Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653

центной окраской. ИПСК наращивали на ЭФМ в чашках Петри (20 см²) до плотности 80–90 %, после чего клетки инкубировали 20–40 мин в 0.15 % коллагеназы IV типа (Thermo Fisher Scientific). Далее аккуратно пипетировали для отделения колоний ИПСК от клеток фидера, центрифугировали 5 мин при 100g, сливали супернатант, суспендировали в среде для культивирования ИПСК без bFGF и переносили колонии на покрытую 1 % агарозой чашку Петри (20 см²). Через 14 дней полученные из колоний эмбрионидные тельца распластывали на 8-ячеечные планшеты с ультратонким стеклом (Chambered Coverglass, Thermo Fisher Scientific), покрытые матригелем. Через 7–9 дней фиксировали 10 мин в 4 % параформальдегиде (Sigma-Aldrich) и проводили иммунофлуоресцентный анализ на маркеры трех зародышевых листков. Список антител представлен в табл. 1.

Кариотипирование линий ИПСК. Анализ кариотипа выполняли по ранее отработанной и описанной методике (Yarkova et al., 2023).

Выделение геномной ДНК и РНК. ДНК выделяли с помощью раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen) по протоколу производителя. Для выделения РНК клетки наращивали на площади 8–12 см², лизировали в 0.5–1 мл TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) и

проводили выделение РНК по протоколу производителя. Определяли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра EzDrop 1000C (Blue-Ray Biotech).

Выявление генетического варианта в МНК и ИПСК. Секвенирование экзотов пациентов проводили в ООО «Геноаналитика» (Москва). Геномную ДНК, выделенную из МНК периферической крови, фрагментировали ультразвуком на приборе Covaris S2 до фрагментов длиной 300 пар нуклеотидов. Геномная ДНК (800 нг) была использована для приготовления библиотеки с применением наборов реактивов NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) и Sure Select AllExome V7 (Agilent). Секвенирование библиотек осуществляли на приборе HiSeq 2500 (Illumina), парными чтениями по 150 нуклеотидов с обоих концов. Необработанные результаты секвенирования экзотов пациентов доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295, образцы SAMN42050732 (PD58), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/42050732> (PD58), SAMN42050755, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/42050755> (PD69)).

Наличие варианта с.1087G>T гена *LGR4* определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру полученных линий ИПСК и МНК пациентов (PD58 и PD69), используя праймеры на ген *LGR4* (табл. 2). Контролем служила ДНК

Таблица 2. Список праймеров, используемых в работе

Применение	Ген/локус	Размер, п. н.	Праймеры: прямой/обратный
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544	TTCCACGAGGGTAGTGAAC/ TCGGGGGTGTTAGACAAC
Ген домашнего хозяйства (OT-кПЦР)	<i>B2M</i>	90	TAGCTGTGCTCGCCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (OT-кПЦР)	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGCCTGAAGAAAAC/ AGGGCTGTCTGAATAAGCAG
	<i>OCT4</i>	94	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>SOX2</i>	100	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGCTACTCTGTAACTC
Подтверждение мутации	<i>LGR4</i>	366	GCGTTTCATGGGATGCCTGATAG/ TCTTAGCTCTGCTTCAACGCTTC

условно здорового донора. Реакции проводили на T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (BioLabs), программа: 95 °C в течение 3 мин; 35 циклов: 95 °C в течение 30 с; 65 °C – 30 с; 72 °C – 30 с; и 72 °C в течение 5 мин. Реакции секвенирования проводили с применением Big Dye Terminator V.3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на ABI 3130XL Genetic Analyser в ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/seqest>).

ПЦР анализ на выявление микоплазмы и эписом, используемых для репрограммирования. ПЦР проводили с применением БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Программа: 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 20 с. В качестве позитивного контроля брали фрагменты ДНК *Mycoplasma spp.* из набора «БиоМастер Мусо-визор» для выявления микоплазмы методом ПЦР-РВ (Биолабмикс). Отрицательный контроль – H₂O. Праймеры представлены в табл. 2. После электрофореза результат визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

Количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности. РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV-RH (Биолабмикс). Количественную ПЦР (ОТ-кПЦР) выполняли в системе LightCycler 480 II (Roche) с BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Биолабмикс), программа: 95 °C – 5 мин; 40 циклов: 95 °C – 10 с, 60 °C – 1 мин. В качестве положительного контроля на экспрессию маркеров плюрипотентности брали линию эмбриональных стволовых клеток HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004). Праймеры на маркеры плюрипотентности приведены в табл. 2. Обработка результатов выполнена с помощью ΔΔCT-метода (Livak, Schmittgen, 2001).

STR-анализ. Генетический материал полученных линий ИПСК и МНК пациентов PD58 и PD69 отправляли в ООО «Геноаналитика» (Москва), где и проводили

STR-анализ по 26 локусам с помощью набора реагентов COrDIS ЭКСПЕРТ 26 (Россия).

Результаты и обсуждение

Получение и характеристика клеточной линии

В ходе анализа результатов экзомного секвенирования пациентов с болезнью Паркинсона Федерального центра нейрохирургии Министерства здравоохранения РФ (Новосибирск) были обнаружены пациенты с ранним началом болезни Паркинсона (женщина 37 лет (PD58) и мужчина 66 лет (PD69)), имеющие вариант *LGR4:c.1087G>T* (rs117543292).

Из периферической крови пациентов были выделены МНК, которые затем репрограммировали для возврата к состоянию плюрипотентности с помощью эписомных векторов, кодирующих факторы плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, а также доминант-негативную форму белка p53 мыши – mp53DD (Okita et al., 2013). В процессе выполнения работы были получены 21 линия клеток от PD58 и 10 линий от PD69. Первичный анализ на наличие/отсутствие эписомных векторов и кариотипирование позволили отобрать три линии от первого пациента (ICGi053-A/PD58-4, ICGi053-B/PD58-7 и ICGi053-C/PD58-14) и четыре линии от второго (ICGi054-A/PD69-1/1, ICGi054-B/PD69-2/1, ICGi054-C/PD69-4 и ICGi054-D/PD69-5). Все линии были зарегистрированы в Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Информацию о линиях можно найти в hPSCreg по ссылкам: <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-A>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-B>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-C>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-A>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-B>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-C> и <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-D>.

Все линии обоих пациентов имеют морфологию, характерную для плюрипотентных клеток, плоские однослойные плотные колонии с большим ядерно-цитоплазматическим соотношением, экспрессирующие эндогенную щелочную фосфатазу (рис. 1, а, рис. 2, а).

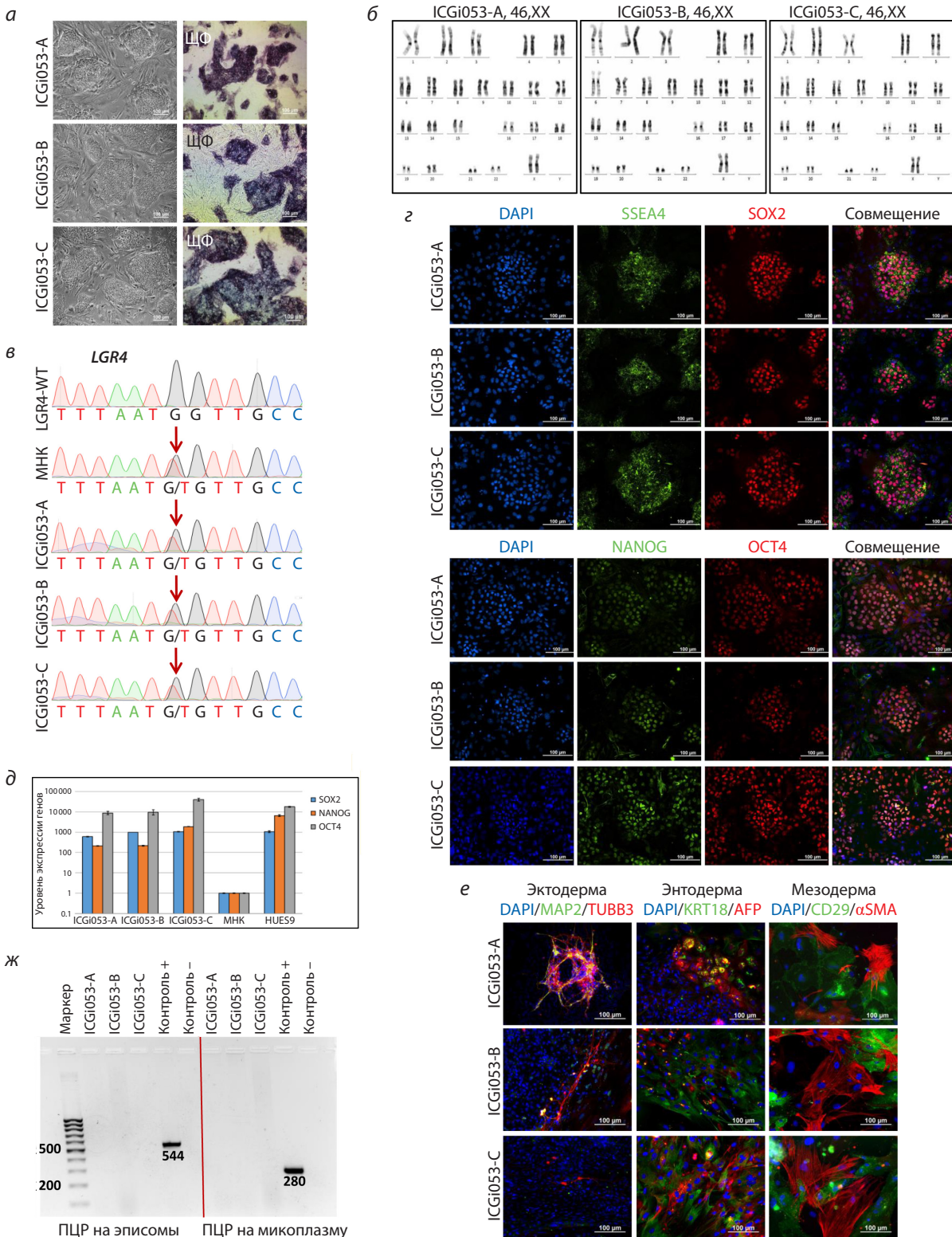


Рис. 1. Характеристика трех линий ИПСК ICGi053-A, ICGi053-B и ICGi053-C.

a – морфология колоний и выявление щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; *б* – кариотипирование линий ИПСК с использованием DAPI-бэндинга; *в* – секвеннограммы ПЦР продуктов, полученных с геномной ДНК пациентки с ранним началом болезни Паркинсона PD58, здорового донора (*LGR4*-WT) и линий ИПСК, которые соответствуют позициям 27377174–27377186 на хромосоме 11 человека (сборка генома GRCh38). Позиция изучаемого варианта гена *LGR4* NC_000011.10:g.27377180C>A. Нуклеотидная замена *LGR4:c.1087G>T* обозначена красной стрелкой; *г* – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый), OCT4 (красный), SSEA-4 (зеленый), SOX2 (красный); ядра окрашены DAPI (синий); *д* – количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG) полученных линий ИПСК, МНК пациента и линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9; *е* – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, полученных при спонтанной дифференцировке, на маркеры эктодермы (TUBB3 (красный), MAP2 (зеленый)), энтодермы (кератин 18/KRT18 (зеленый), AFP (красный)) и мезодермы (αSMA (красный), CD29 (зеленый)); ядра окрашены DAPI (синий); *ж* – результат ПЦР анализа на элиминацию episomных векторов и контаминацию микоплазмой полученных клеток. Масштабные линейки – 100 мкм.

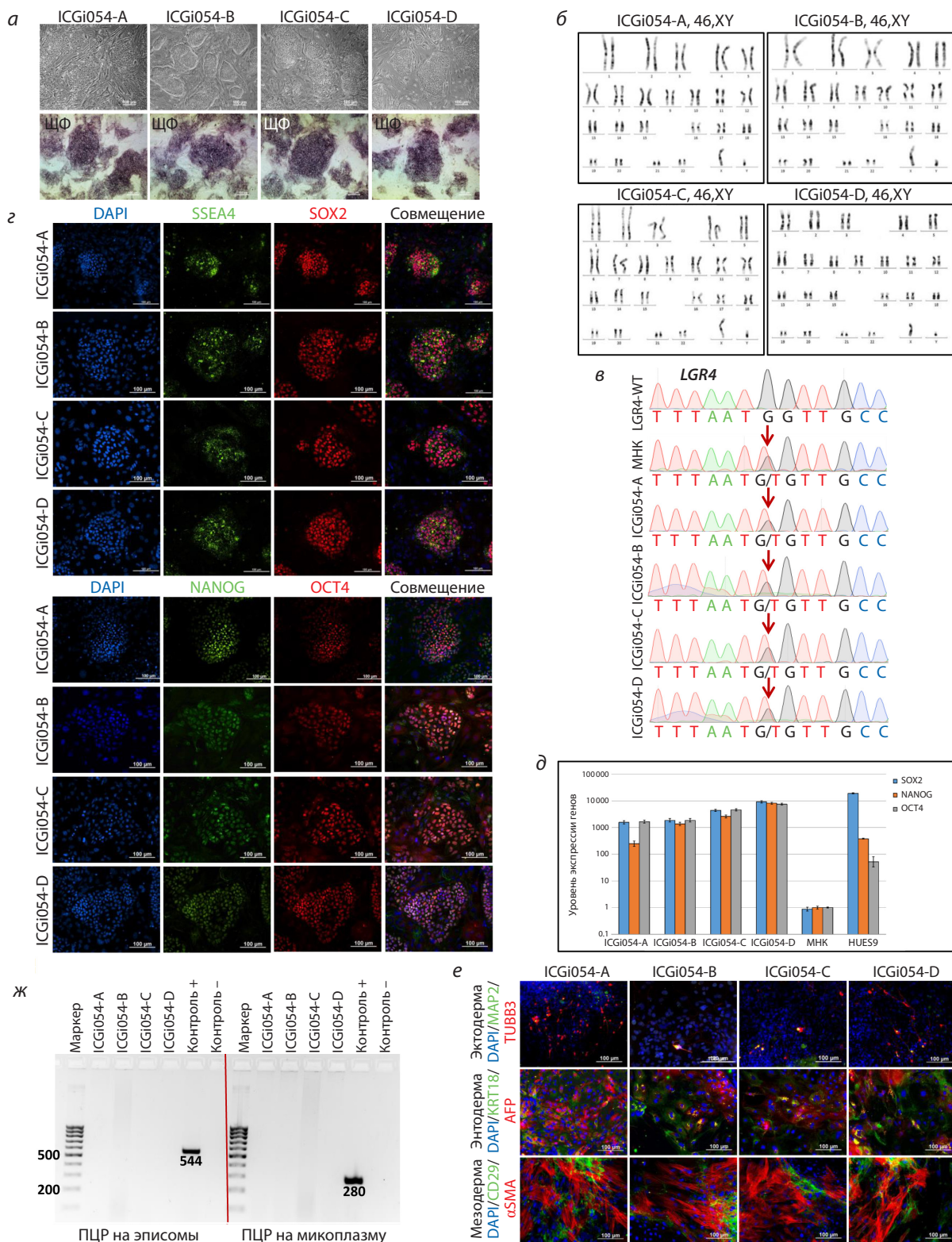


Рис. 2. Характеристика четырех пациент-специфичных линий ИПСК ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C и ICGi054-D.

а – морфология колоний и выявление щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; **б** – кариотипирование линий ИПСК с использованием DAPI-бэндинга; **в** – секвеннограммы ПЦР продуктов, полученных с геномной ДНК пациента с ранним началом болезни Паркинсона PD69, здорового донора (LGR4-WT) и линий ИПСК, которые соответствуют позициям 27377174–27377186 на хромосоме 11 человека (сборка генома GRCh38). Позиция изучаемого варианта гена *LGR4* NC_000011.10:g.27377180C>A. Нуклеотидная замена *LGR4*:с.1087G>Т обозначена красной стрелкой; **г** – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый), OCT4 (красный), SSEA-4 (зеленый), SOX2 (красный); ядра окрашены DAPI (синий); **д** – количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG) полученных линий ИПСК, МНК пациента и линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9; **е** – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, полученных при спонтанной дифференцировке, на маркеры эктодермы (TUBB3 (красный), MAP2 (зеленый)), энтодермы (кератин 18/KRT18 (зеленый), AFP (красный)) и мезодермы (αSMA (красный), CD29 (зеленый)); ядра окрашены DAPI (синий); **ж** – результат ПЦР анализа на элиминацию episomных векторов и контаминацию микоплазмой полученных клеток. Масштабные линейки – 100 мкм.

Таблица 3. Детальный анализ хромосомного состава метафазных пластинок полученных линий ИПСК

Название линии ИПСК	Число метафаз с различным количеством хромосом						Количество проанализированных метафаз	Кариотип диплоидных клеток
	42–44	45	46	47	48–50	80–92		
ICGi053-A	4	3	40	8	2	4	58	46,XX
ICGi053-B	9	3	37	4	0	5	58	46,XX
ICGi053-C	5	4	37	3	1	8	58	46,XX
ICGi054-A	4	8	37	5	2	4	60	46,XY
ICGi054-B	7	4	41	3	1	1	57	46,XY
ICGi054-C	15	5	37	6	1	2	60	46,XY
ICGi054-D	8	10	31	4	1	1	56	46,XY

При анализе кариотипа полученных линий ИПСК было проанализировано от 56 до 60 метафаз. Разложено на хромосомы от 6 до 12 метафаз, что соответствует рекомендациям, основанным на Европейских стандартах для цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований конститутивных и приобретенных хромосомных аномалий (Hastings et al., 2012; ISCN, 2020). Возникновение клеток с количеством хромосом от 42 до 45 является результатом потери отдельных хромосом при приготовлении препаратов. Поскольку таких клеток было мало и они демонстрировали отсутствие разных хромосом, то мы не рассматривали их как образование новых субклонов. Известно, что культивируемым стволовым клеткам характерна анеуплоидия (Menzorov et al., 2016), однако моносомные клетки подвержены апоптозу или менее интенсивной пролиферации, поэтому для культур клеток принято за норму считать линии, у которых более 50 % метафаз имеют полный набор хромосом. Детальный анализ показал, что все линии имеют более 55 % клеток с нормальным диплоидным кариотипом – 46,XX для ICGi053 (см. рис. 1, б) и 46,XY для ICGi054 (см. рис. 2, б). Надо отметить, что при анализе семи полученных линий ИПСК не обнаружено метафазных пластинок со структурными перестройками. Подробная информация по составу проанализированных метафазных пластинок представлена в табл. 3.

Секвенирование по Сэнгеру показало наличие в полученных линиях клеток, так же как и в МНК, варианта *LGR4:c.1087G>T* в гетерозиготном состоянии (см. рис. 1, в, рис. 2, в, генетический вариант обозначен красной стрелкой). Иммунофлуоресцентный анализ линий ICGi053-A (27-й пассаж), ICGi053-B (26-й пассаж), ICGi053-C (27-й пассаж), ICGi054-A (26-й пассаж), ICGi054-B (22-й пассаж), ICGi054-C (25-й пассаж) и ICGi054-D (24-й пассаж) на маркеры плюрипотентности выявил наличие поверхностного антигена SSEA-4 и транскрипционных факторов NANOG, SOX2 и OCT4 (см. рис. 1, г, рис. 2, г). Количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-кПЦР) МНК пациентов, полученных из них линий ИПСК, а также контрольной линии эмбриональных стволовых клеток HUES9 показала повышение уровня экспрессии генов *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* в линиях ИПСК, сопоставимое с уровнем экспрессии в HUES9, по срав-

нению с МНК (см. рис. 1, д, рис. 2, д). Тест линий ИПСК на способность спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, являющийся основным подтверждением статуса плюрипотентности, и дальнейший иммунофлуоресцентный анализ показали наличие экспрессии маркеров эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2)), энтодермы (альфа-фетопротейн (AFP), кератин 18 (KRT18)) и мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), поверхностный маркер CD29) (см. рис. 1, е, рис. 2, е). В процессе культивирования все линии проходили ПЦР тест на контаминацию микоплазмой и элиминацию эписомных векторов (см. рис. 1, ж, рис. 2, ж). STR-анализ тандемных повторов по 26 локусам показал идентичность полученных линий ИПСК МНК пациентов (данные доступны по запросу у авторов). Паспорта клеточных линий, полученных от пациентов PD58 и PD69, представлены в табл. 4 и 5.

Заключение

В результате репрограммирования МНК двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант *c.1087G>T* (rs117543292) гена *LGR4*, были созданы и охарактеризованы семь линий ИПСК – ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C, ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C и ICGi054-D. Полученные линии клеток соответствуют плюрипотентным клеткам человека: имеют характерную морфологию, нормальный кариотип, экспрессируют факторы плюрипотентности, способны спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и имеют такой же генетический вариант *LGR4:c.1087G>T*, как и донорские МНК. Данная работа служит первым и необходимым этапом изучения влияния генетического варианта *LGR4:c.1087G>T* на проявление болезни Паркинсона. Полученные линии ИПСК и их дифференцированные производные являются уникальной клеточной платформой, на которой в дальнейшем возможно будет изучать на молекулярно-генетическом уровне ранние патологические процессы, запускающие каскад сигнальных путей, приводящих к гибели нейронов, проводить поиск мишеней, модулирующих эти сигнальные пути, а также осуществлять тестирование новых потенциальных лекарственных препаратов.

Таблица 4. Паспорт клеточных линий ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C

Уникальный идентификатор	ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C
Альтернативное название линий	PD58-4, PD58-7, PD58-14
Учреждение	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 37 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2022 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Возраст начала симптомов	36 лет
Ген/локус	LGR4:c.1087G>T, rs117543292
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионных телес
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	85 % KnockOut DMEM, 15 % KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркапто-этанол, 1 % пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	TrypLE Express
Кратность пересева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-A https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-B https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-C
Дата паспортизации/депонирования	09.07.2024 (ICGi053-A) 18.07.2024 (ICGi053-B) 22.07.2024 (ICGi053-C)

Таблица 5. Паспорт клеточных линий ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C, ICGi054-D

Уникальный идентификатор	ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C, ICGi054-D
Альтернативное название линий	PD69-1/1, PD69-2/1, PD69-4, PD69-5
Учреждение	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 66 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2022 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Возраст начала симптомов	41 год
Ген/локус	LGR4:c.1087G>T, rs117543292
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионных теллец
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	85 % KnockOut DMEM, 15 % KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркапто-этанол, 1 % пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-1 (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	TrypLE Express
Кратность пересева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-A https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-B https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-C https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-D
Дата паспортизации/депонирования	26.07.2024 (ICGi054-A) 26.07.2024 (ICGi054-B) 29.07.2024 (ICGi054-C) 09.08.2024 (ICGi054-D)

Список литературы / References

- Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76 [Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76]
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-1356. doi 10.1056/NEJMSr040330
- Fernandes H.J.R., Hartfield E.M., Christian H.C., Emmanouilidou E., Zheng Y., Booth H., Bogetoft H., Lang C., Ryan B.J., Sardi S.P., Badger J., Vowles J., Evetts S., Tofaris G.K., Vekrellis K., Talbot K., Hu M.T., James W., Cowley S.A., Wade-Martins R. ER stress and autophagic perturbations lead to elevated extracellular α -synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Stem Cell Rep*. 2016;6(3):342-356. doi 10.1016/j.stemcr.2016.01.013
- Funayama M., Nishioka K., Li Y., Hattori N. Molecular genetics of Parkinson's disease: contributions and global trends. *J Hum Genet*. 2023;68(3):125-130. doi 10.1038/s10038-022-01058-5
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4437. doi 10.3390/ijms24054437
- Grigor'eva E.V., Karapetyan L.V., Malakhova A.A., Medvedev S.P., Minina J.M., Hayrapetyan V.H., Vardanyan V.S., Zakian S.M., Arakelyan A., Zakharyan R. Generation of iPSCs from a patient with the M694V mutation in the *MEFV* gene associated with Familial Mediterranean fever and their differentiation into macrophages. *Int J Mol Sci*. 2024;25:6102. doi 10.3390/ijms25116102
- Hastings R., Howell R., Bricarelli F.D., Kristoffersson U., Cavani S. General guidelines and quality assurance for cytogenetics. *Eur Cytogenet Assoc NewsL*. 2012;29:11-25
- ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. S. Karger AG, 2020. doi 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262
- Mancini A., Howard S.R., Marelli F., Cabrera C.P., Barnes M.R., Sternberg M.J.E., Leprovots M., Hadjidemetriou I., Monti E., David A., Wehkalampi K., Oleari R., Lettieri A., Vezzoli V., Vassart G., Cariboni A., Bonomi M., Garcia M.I., Guasti L., Dunkel L. LGR4 deficiency results in delayed puberty through impaired Wnt/ β -catenin signaling. *JCI Insight*. 2023;5(11):e133434. doi 10.1172/jci.insight.133434
- Marchetti B., Tirollo C., L'Episcopo F., Caniglia S., Testa N., Smith J.A., Pluchino S., Serapide M.F. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair. *Aging Cell*. 2020;19(3):e13101. doi 10.1111/acel.13101
- Marciniak S.J., Chambers J.E., Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(2):115-140. doi 10.1038/s41573-021-00320-3
- Menzorov A., Pristiyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O.L. Cytogenetic analysis and *Dkl1-Dio3* locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cytotechnology*. 2016;68(1):61-71. doi 10.1007/s10616-014-9751-y
- Niu Y., Zhang J., Dong M. Nrf2 as a potential target for Parkinson's disease therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2021;99(7):917-931. doi 10.1007/s00109-021-02071-5
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013;31(3):458-466. doi 10.1002/stem.1293
- Shi S., Li S., Zhang X., Wei Z., Fu W., He J., Hu Y., Li M., Zheng L., Zhang Z. *LGR4* gene polymorphisms are associated with bone and obesity phenotypes in Chinese female nuclear families. *Front Endocrinol*. 2021;12:656077. doi 10.3389/fendo.2021.656077
- Wang M., Ling K.-H., Tan J.J., Lu C.-B. Development and differentiation of midbrain dopaminergic neuron: from bench to bedside. *Cells*. 2020;9(6):1489. doi 10.3390/cells9061489
- Yarkova E.S., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Pavlova S.V., Zakian S.M., Malakhova A.A. iPSC-derived astrocytes contribute to in vitro modeling of Parkinson's disease caused by the *GBA1* N370S mutation. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1):327. doi 10.3390/ijms25010327
- Yarkova E.S., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Tarasevich D.A., Pavlova S.V., Valetdinova K.R., Minina J.M., Zakian S.M., Malakhova A.A. Detection of ER stress in iPSC-derived neurons carrying the p.N370S mutation in the *GBA1* gene. *Biomedicines*. 2024;12:744. doi 10.3390/biomedicines12040744

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.09.2024. После доработки 20.11.2024. Принята к публикации 21.11.2024.