

Новая компьютерная программа автоматизированного анализа движения цилиарного эпителия респираторного тракта для диагностики первичной цилиарной дискинезии

Т.А.Киян¹ ✉, С.А.Смирнихина¹, А.Г.Демченко¹, Р.В.Вейко¹, Е.И.Кондратьева^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области»: 115093, Россия, Москва, ул. Большая Серпуховская, 62

Резюме

Первичная цилиарная дискинезия (ПЦД) – редкое наследственное заболевание из группы цилиопатий, при котором нарушены структура и подвижность реснитчатого эпителия, что отрицательно влияет на цилиарную функцию и приводит к заметному снижению или отсутствию мукоцилиарного клиренса. Согласно европейским рекомендациям, в качестве одного из методов подтверждения диагноза ПЦД рекомендовано проведение световой микроскопии для анализа частоты биения ресничек (ЧБР) в нативном препарате или ALI-культуре. Для правильного расчета ЧБР необходимо программное обеспечение. **Целью** работы явилось создание компьютерной программы автоматизированного анализа движения / биения цилиарного эпителия респираторного тракта для диагностики ПЦД методом цифровой высокоскоростной видеомикроскопии (ЦВС ВМС) *in vivo* и *in vitro*. **Материалы и методы.** Здоровым донорам ($n = 5$) и пациентам с подозрением на ПЦД ($n = 10$) проводилась назальная браш-биопсия эпителия. Препараты *in vivo* исследовались с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Из назального биоптата также выделялись эпителиальные клетки и проводился цилиогенез полученных клеток методом ALI-культивирования с последующим проведением ЦВС ВМС и оценкой количества активных клеток и ЧБР. Полученные видеоизображения были использованы для создания программы для электронной вычислительной машины. **Результаты.** Для оптимизации диагностики ПЦД с помощью световой микроскопии создана Программа определения частоты биения реснитчатого эпителия (РЭ) при ПЦД (*Primary Ciliary Dyskinesia High-Speed Video Microscopy Analysis* – PCD HSVMA) (регистрационный номер 2023687245). Программа предназначена для расчета количества активных клеток РЭ и ЧБР (Гц) методом ЦВС ВМС образцов, полученных *in vivo* и *in vitro* в ALI-культуре. Программа PCD HSVMA включает в себя хранение данных пациентов, отображение тепловой карты, формирование большой серверной базы данных пациентов и видеофайлов, построение цветовых и статистических гистограмм, обработку нескольких областей в одном видео. Программа PCD HSVMA имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими аналогичными программами *CiliarMove* и *Ciliaryzer*, также показана ее высокая корреляция в оценке ЧБР (Гц) с этими программами. **Заключение.** Программа PCD HSVMA может быть использована для усовершенствования диагностики ПЦД в лабораториях лечебно-профилактических учреждений, научных учреждениях и может быть включена в образовательные программы подготовки специалистов – врачей-лаборантов, педиатров, терапевтов, пульмонологов, врачей функциональной диагностики (врачей-эндоскопистов).

Ключевые слова: программа для ЭВМ, первичная цилиарная дискинезия, реснитчатый эпителий, биение ресничек, световая микроскопия, культивирование клеток.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Разработка технологии диагностики первичной цилиарной дискинезии на основе комплексной оценки функции реснитчатого эпителия респираторного тракта» (регистрационный номер 123052200004-3).

© Киян Т.А. и соавт., 2024

Для цитирования: Киян Т.А., Смирнихина С.А., Демченко А.Г., Вейко Р.В., Кондратьева Е.И. Новая компьютерная программа автоматизированного анализа движения цилиарного эпителия респираторного тракта для диагностики первичной цилиарной дискинезии. *Пульмонология*. 2024; 34 (2): 184–193. DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-2-184-193

A new software for automated analysis of respiratory tract ciliary epithelium movement for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia

Tatiana A. Kyian¹ ✉, Svetlana A. Smirnikhina¹, Anna G. Demchenko¹, Roman V. Veiko¹, Elena I. Kondratyeva^{1,2}

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: ul. Moskvorechye 1, Moscow, 115522, Russia

² State Budgetary Healthcare Institution of the Moscow region “Research Clinical Institute of Childhood”, Healthcare Ministry of Moscow Region: ul. Bolshaya Serpukhovskaya 62, Moscow, 115093, Russia

Abstract

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare hereditary disease. In this ciliopathy, the disturbed structure and motility of the ciliary epithelium negatively affects the ciliary function and leads to prominent decrease or absence of mucociliary clearance. The European guidelines recommend analyzing the cilia beat frequency (CBF) in a native preparation or in ALI culture using light microscopy as one of the methods to confirm the diagnosis of PCD. **The aim** of this project was to create software for automated analysis of the movement/beating of the ciliary epithelium of the respiratory tract for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia using digital high-speed video microscopy *in vivo* and *in vitro*. **Methods.** Five healthy donors and 10 patients with suspected PCD underwent nasal epithelial brush biopsy. The preparations were examined with a transmission electron microscope *in vivo*. Epithelial cells were also isolated from the nasal biopsy specimen, and ciliogenesis of these cells was performed by ALI-culturing, followed by digital high-speed video microscopy and assessment of the number of active cells and cilia beating frequency. The resulting video images were used to create the software. **Results.** Software for determination of ciliary epithelium beat frequency in primary ciliary dyskinesia (*PCD High-Speed Video Microscopy Analysis* – PCD HSVMA) was created to optimize the diagnosis of PCD by light microscopy (software registration number 2023687245). The software is designed to count the number of active cells of ciliary epithelium and CBF (Hz) by digital high-speed video microscopy *in vivo* and *in vitro* in ALI-culture. PCD HSVMA software features storage of patient data, display of heat map, formation of a large server database of patients and video files, building of color and static histograms, processing of several areas in one video. Our software has a number of advantages over CiliarMove and Ciliaryzer and has high correlation of CFB (Hz) estimation with these products. **Conclusion.** Our software can be used for improvement of PCD diagnostics in laboratories of healthcare institutions, in scientific institutions and can be included in specialist educational programs for laboratory doctors, pediatricians, general practitioners, pulmonologists, diagnosticians (endoscopists).

Key words: software, primary ciliary dyskinesia (PCD), ciliated epithelium, cilia beating, light microscopy, cell culturing.

Conflict of interests. No conflict of interest was declared by the authors.

Funding. This study was part of the research project “Development of technology for diagnosing primary ciliary dyskinesia based on a comprehensive assessment of the function of respiratory tract ciliated epithelium” (registration number 123052200004-3).

© Kyian T.A. et al., 2024

For citation: Kyian T.A., Smirnikhina S.A., Demchenko A.G., Veiko R.V., Kondratyeva E.I. A new software for automated analysis of respiratory tract ciliary epithelium movement for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Pul'monologiya*. 2024; 34 (2): 184–193 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-2-184-193

Первичная цилиарная дискинезия (ПЦД) — редкое генетическое заболевание (распространенность — 1 : 10 000–20 000) с обширной локусной и аллельной гетерогенностью (ORPHA: 244, 98861; OMIM: 242650, 244000) с аутосомно-доминантным или аутосомно-рецессивным, реже — X-сцепленным типом наследования (OMIM 300424) [1, 2], которое проявляется хроническими респираторными симптомами, вызванными нарушением мукоцилиарного клиренса [3]. Симптомы включают в себя хронический влажный кашель, хронический ринит, рецидивирующий средний отит с дальнейшим нарушением слуха, рецидивирующие респираторные инфекции, которые в раннем возрасте начинаются с респираторного дистресса новорожденных [4, 5]. Несмотря на недавние диагностические рекомендации Европейского респираторного [6] и Американского торакального [7] обществ, диагностика ПЦД остается затруднительной. Трудности связаны со следующими проблемами:

- клиническая картина не является специфичной только для ПЦД;
- отсутствует «золотой стандарт» диагностики ПЦД;
- все диагностические рекомендации включают в себя комбинацию различных анамнестических, функциональных, структурных и молекулярно-генетических методов.

В настоящее время для диагностики ПЦД используются измерение назального уровня оксида азота (nNO), цифровая высокоскоростная видеомикроскопия (ЦВС ВМС) для оценки подвижности цилиарных жизнеспособных клеток (свежие биообразцы или культуры клеток (*Air-Liquid Interface* – ALI)); иммунофлуоресцентное окрашивание различных структурных белков; оценка состояния ультраструктуры аксонемы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и генетическое тестирование

для идентификации патогенных вариантов в генах, ассоциированных с ПЦД. Следовательно, ПЦД часто диагностируется на поздних сроках жизни или не диагностируется вовсе, что приводит к позднему началу лечения или его отсутствию. Даже если этиологическая терапия еще недоступна, при ранней диагностике и междисциплинарном ведении пациентов повышаются качество жизни и прогноз [3, 6, 7].

Для оптимизации подсчета частоты биения ресничатого эпителия (РЭ) (Гц) международными сообществами разработаны специальные компьютерные программы — *CiliarMove* [8] и *Ciliaryzer* [9], которые являются наиболее распространенными.

В Российской Федерации в ряде федеральных учреждений используется методика оценки частоты биения ресничек (ЧБР) *in vivo* (нативный препарат РЭ), у которого период жизни составляет всего 15–30 мин. Данная методика не стандартизирована, отсутствует возможность сравнить с препаратами, полученными от здорового человека, не всегда есть возможность повторного забора браш-биопсии, не создана и не зарегистрирована специализированная программа для подсчета ЧБР.

Целью работы явилось создание компьютерной программы автоматизированного анализа движения / биения цилиарного эпителия респираторного тракта для диагностики ПЦД методом ЦВС ВМС *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы

Проведена назальная браш-биопсия эпителия у здоровых доноров ($n = 5$) и пациентов ($n = 10$), направленных в Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Мини-

стерства науки и высшего образования Российской Федерации с подозрением на ПЦД. Использован одноразовый цитологический браш ВС-202D-5010 длиной 1 150 мм и диаметром 5,0 мм – для взрослых, 2,0–3,0 мм – для детей (*Olympus Medical Systems Corp.*, Япония). Браш-биопсия выполнялась в период ремиссии заболевания.

Для оценки ЧБР в нативном материале с помощью световой микроскопии клетки мерцательного эпителия слизистой оболочки полости носа получены с помощью браш-биопсии. Биоптаты слизистой оболочки незамедлительно после забора помещались в подогретый до 37 °С забуференный 0,9%-ный раствор натрия хлорида. Допустимо хранение в теплом 0,9%-ном растворе натрия хлорида (37 °С) ≤ 15 мин: по возможности нативные препараты исследуются незамедлительно. Пригодным для исследования является материал, содержащий цельные пласты эпителия (≥ 12 клеток) с минимальной примесью эритроцитов и слизи.

Получение первичных культур клеток назального эпителия человека

Для получения первичных культур клеток назального эпителия биоматериал помещался в стерильную пробирку, содержащую среду для транспортировки, состоящую из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM*) (ПанЭко, Россия), 10 мкг / мл фунгина (*InvivoGen*, Франция), 100 ед. / мл пенициллина и 100 мкг / мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). При необходимости транспортировка и хранение полученного биоматериала осуществлялись в среде для транспортировки при температуре +4 °С. Полученный биоматериал центрифугировался в течение 5 мин при 1 500 г и в стерильных условиях, обеспеченных ламинарным потоком, помещался на культуральный пластик, предварительно покрытый *Matrigel* (*Corning*, США), в среде для эпителиальных базальных клеток. Среда для эпителиальных базальных клеток состояла из *PneumaCult™-Ex Plus Medium* (*StemCell Technologies*, Канада), 1 мкМ А83-01 (*Tocris*, Великобритания),

1 мкМ ДМН1 (*Tocris*, Великобритания), 1 мкМ гидрокортизона (*Sigma Aldrich*, США), 50 ед. / мл пенициллина и 50 мкг / мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки культивировались в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37 °С с 5%-ным CO₂. Полученные клетки назального эпителия пассеровались каждые 4–5 дней с применением 0,25%-го раствора трипсина (ПанЭко, Россия). На 1–2-м пассажах проводилась криоконсервация клеток в количестве в концентрации 1 × 10⁶ клеток / мл по 1 мл. Подсчет клеток осуществлялся на автоматическом счетчике клеток *Countess II* (*Thermo Fisher Scientific*, США). Криоконсервация проводилась с применением 90%-ной бычьей фетальной сыворотки (*Thermo Fisher Scientific*, США) и 10%-го диметилсульфооксида (ПанЭко, Россия).

Цилиогенез клеток назального эпителия человека *in vitro*

Цилиогенез 3 культур клеток назального эпителия, полученных от здорового донора ($n = 1$) и пациентов ($n = 2$) с ПЦД (табл. 1), проводился методом ALI-культивирования [10, 11]. Для этого культуральные вставки размером пор 0,4 мкм и диаметром 6,5 мм (*StemCell Technologies*, Канада) покрывались раствором 0,3 мг / мл коллагена I типа (*Gibco*, США) в 20 мМ уксусной кислоте. Затем вставки трижды промывались от остатков раствора коллагена с помощью раствора DPBS (ПанЭко, Россия). Клетки назального эпителия на 1–2-м пассажах пассеровались на вставки в количестве 30 × 10⁶ клеток на 1 вставку. Подсчет клеток осуществлялся на автоматическом счетчике клеток *Countess II*. Среда для эпителиальных базальных клеток вносилась по 500 мкл под вставку и 200 мкл – над вставку. По достижении клеток монослоя полностью убиралась среда над вставкой и заменялась среда под вставкой на среду для ALI-культур. Среда для ALI-культур состояла из *PneumaCult™-ALI Medium* (*StemCell Technologies*, Канада), 4 мкг / мл гепарин (*StemCell Technologies*, Канада), 9,6 мкг / мл гидрокортизона (*StemCell Technologies*, Канада), 50 ед. / мл пенициллина и 50 мкг / мл стрептомицина. ALI-культивирование проводилось в течение 24 суток с заменой среды каждые 48 ч.

Таблица 1
Клиническая и инструментальная характеристика пациентов с первичной цилиарной дискинезией, оценка частоты биения ресничек (Гц), полученных *in vivo* и *in vitro* у пациентов и здорового донора

Table 1
Clinical and instrumental characteristics of patients with primary ciliary dyskinesia, assessment of cilia beating frequency (Hz) obtained *in vivo* and *in vitro* from two patients and a healthy donor

Вид биоматериала	Пациент № 1	Пациент № 2	Здоровый донор
<i>In vivo</i>	0,97 ± 0,06	1,02 ± 0,12	4,78 ± 1,45
ALI	1,17 ± 0,47	0,94 ± 0	7,03 ± 2,47
Клинические данные	Бронхоэктазы, синдром Картагенера	Бронхоэктазы	–
Генетическое исследование	Вариант в гене <i>DNAAF1</i> в гомозиготном положении	Вариант в гене <i>LRRС6</i> в гомозиготном положении	–
Результаты ТЭМ	Дефект наружных и внутренних динеиновых ручек	Дефект наружных и внутренних динеиновых ручек	–

Примечание: ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для подтверждения получения клеток назального эпителия и подтверждения дифференцировки в реснитчатые клетки проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры прогениторных эпителиальных клеток (цитокератин-5 и TP63) и на маркер реснитчатых клеток (β -тубулин) согласно европейским рекомендациям [6]. Для этого культуры клеток назального эпителия и ALI-культуры фиксировались в холодном 4%-ном растворе формалина в течение 15 мин при комнатной температуре (25 °C). Дважды проводилась отмывка DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Затем клетки пермеабилizировались в 0,1%-ном растворе Tween 20 в течение 10 мин при комнатной температуре (25 °C), трижды отмывались DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} и проводилась блокировка в 1%-ном BSA и 1%-ном Tween 20 в течение 30 мин при комнатной температуре (25 °C). После этого вносились растворы первичных антител для клеток назального эпителия — TP63 (каталожный номер 703809, *Thermo Fisher Scientific*, США) и цитокератин 5 (каталожный номер ab52635, *Abcam*, США), для ALI-культур — β -тубулин (каталожный номер ab131205, *Abcam*, США). Инкубировали 1 ч при комнатной температуре (25 °C). Трижды проводилась отмывка DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Вносился раствор вторичных антител: *Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)* (*Abcam*, США) и *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594)* (*Abcam*, США). Инкубировали 1 ч при комнатной температуре (25 °C). Трижды проводилась отмывка DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Добавлялся DAPI (*Abcam*, США) и инкубировался 10 мин при комнатной температуре (25 °C). Визуализация окрашенных клеток назального эпителия проводилась на автоматизированном имиджере *Lionheart FX* (*BioTek*, США). Для визуализации ALI-культур окрашенные вставки помещались в раствор 2,5 мМ фруктозы в 60%-ном глицероле и инкубировались в течение 20 мин при комнатной температуре (25 °C), затем в растворе переносились на предметное стекло, сверху помещалось покровное стекло и проводилась микроскопия на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе *Leica TCS SP8* (*Leica Microsystems*, Германия).

Видеомикроскопический анализ

ЦВС ВМС проводилась с помощью видеокамеры 1.5MP 1/2.9 *Sony Exmor CMOS Sensor* (E31SPM01500KPA, *Sony*, Япония). *Vert A1* (*Zeiss*, Китай). Скорость съемки составляла 20 кадров в секунду, время съемки — 5 с. Полученные видеоизображения анализировались с помощью разработанной Программы определения частоты биения реснитчатого эпителия при первичной цилиарной дискинезии (*Primary Ciliary Dyskinesia High-Speed Video Microscopy Analysis* — PCD HSVMA).

Работоспособность программы PCD HSVMA проверялась при анализе нативного препарата РЭ и культуры эпителия, полученного с помощью метода ALI-культивирования.

Статистический анализ проводился в *GraphPad Prism* версии 8 с применением метода однофакторного

дисперсионного анализа (*one-way ANOVA*). В зависимости от вида распределения мерами центральной тенденции и рассеяния для количественных данных служили среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD) (при нормальном распределении). Использован ROC-анализ с построением ROC-кривой (графического представления зависимости двух величин — чувствительности и специфичности). Использовались критерии Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова для ненормального распределения. Применялся корреляционный анализ Спирмена. Достоверность различий считалась значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Получение и цилиогенез первичных культур клеток назального эпителия человека

Получено 15 культур клеток назального эпителия. Время получения полного 6-луночного планшета с 80%-ной конфлюэнтностью в среднем составляло 15 дней и зависило от исходного количества клеток в биоматериале. Каждая культура забанкирована в криохранилище в количестве 6 виал на 1 донора для возможного использования в будущих анализах. На рис. 1А показано фазово-контрастное изображение выделенных при браш-биопсии клеток на нулевом пассаже. Для подтверждения эпителиального происхождения полученных клеток проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на 2 основных маркера базальных эпителиальных клеток — опухолевый белок p63 (TP63) и цитокератин-5. Оба маркера положительно окрасили назальные клетки (см. рис. 1В). Также проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание ALI-культуры цилиарных клеток на 24-й день и дифференцировка из клеток назального эпителия на маркер реснитчатых клеток β -тубулин (рис. 1С). β -Тубулин положительно окрасил структуры ресничек, что свидетельствует о том, что по завершении цилиогенеза *in vitro* в культуре образуются цилиарные клетки.

Описание программы

Разработана программа PCD HSVMA (регистрационный номер 2023687245) для расчета количества активных клеток РЭ, ЧБР (Гц) методом ЦВС ВМС *in vitro* и *in vivo*.

Для каждого биоматериала (нативный препарат РЭ) или вставки с ALI-культурой проводилась видеосъемка 2 полей зрения на объективе $\times 10$. Оптимальная скорость съемки — 20 кадров в секунду, время съемки — 5 с.

Технические характеристики программы PCD HSVMA:

- тип ЭВМ — IBM PC-совместимая с ПК;
- язык программирования — *Object Pascal*, IDE *Lazarus*;
- операционная система — *Microsoft Windows XP* и старше;
- объем программы для ЭВМ — 205 Мб.

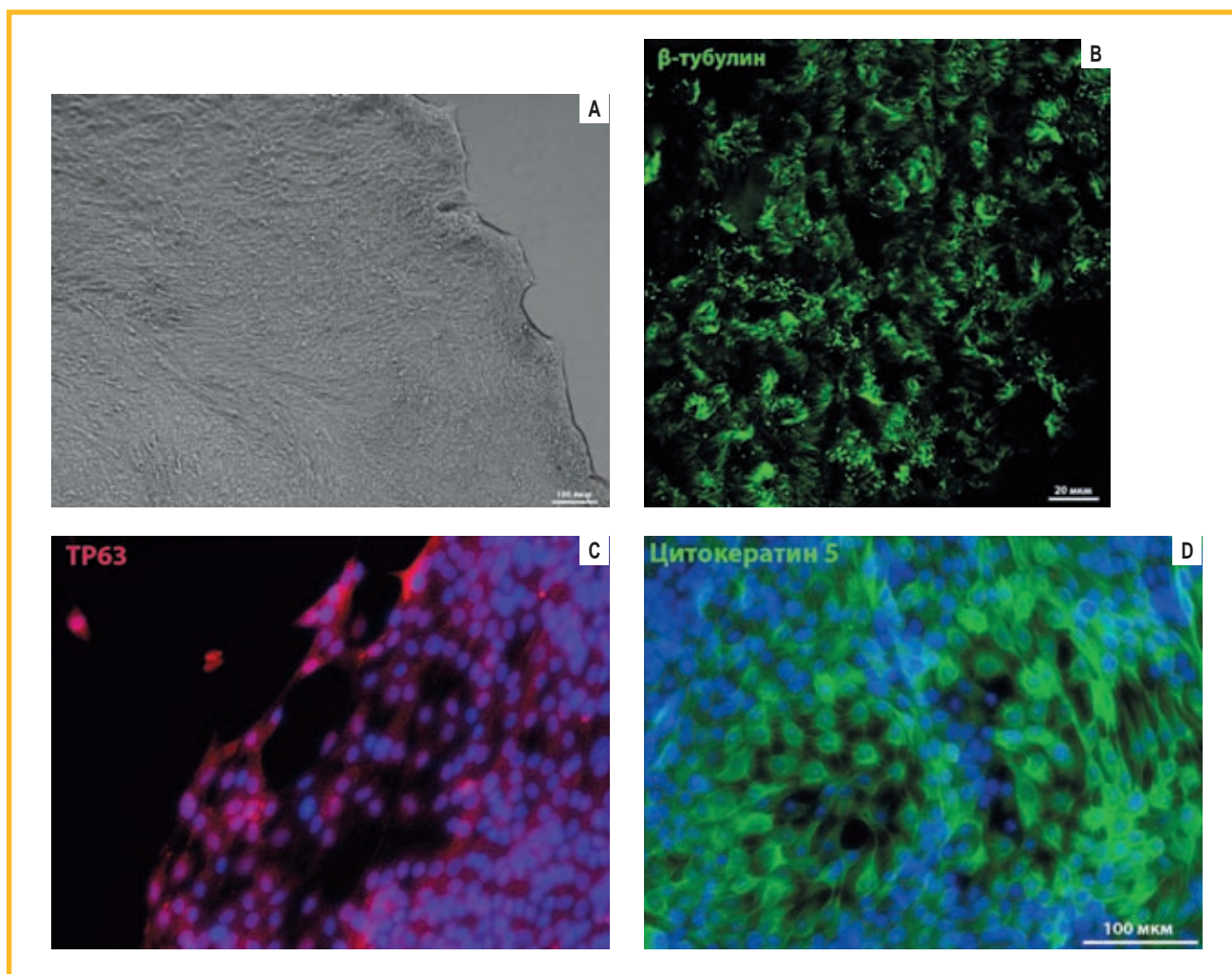


Рис. 1. Получение и характеристика клеточных культур: А – фазово-контрастное изображение клеток назального эпителия на нулевом пассаже; $\times 4$; В – флуоресцентные изображения клеток назального эпителия на нулевом пассаже, ядра контрастно окрашены DAPI (синий); $\times 20$; С – флуоресцентные изображения ресничек в ALI-культуре на 24-й день цилиогенеза *in vitro*; $\times 63$

Figure 1. Preparation and characterization of cell cultures: A, phase-contrast image of nasal epithelial cells at zero passage; $\times 4$; B, fluorescent images of nasal epithelial cells at zero passage, nuclei are counterstained with DAPI (blue); $\times 20$; C, fluorescent images of cilia in ALI culture on the 24th day of ciliogenesis *in vitro*; $\times 63$

Программа включает в себя хранение данных пациентов, отображение тепловой карты, формирование большой серверной базы данных с данными пациентов и видеофайлами, построение цветowych и статистических гистограмм, обработку нескольких областей в одном видео.

Программа содержит следующие вкладки:

- «Пациент»;
- «Видео»;
- «Изображение».

Вкладка «Пациент» содержит следующие поля: информация о пациенте / доноре, номер пациента / донора, шифр, пол, фамилия, имя, отчество, номер карты пациента, дата рождения. Также содержится информация о заболеваниях: синуситы, тугоухость, бронхоэктазы, наличие синдрома Картагенера. Заключение инструментальных исследований – ТЭМ и молекулярно-генетического.

Вкладка «Видео» содержит дерево с видеофайлами и видеопроигрыватель с возможностью выделения прямоугольных или полигональных областей, порога

в цветowych единицах в оттенках серого (от 0 до 255) и расчетом частоты ЧБР эпителия (Гц). Наличие функции проведения расчета количества активных клеток в выделенных прямоугольных или полигональных областях.

При загрузке видео разбивается на кадры, при этом возможно рассчитать длительность видео (миллисекунды).

Во вкладке «Изображения» содержатся изображения результатов ТЭМ и иммунофлуоресцентного окрашивания реснитчатых клеток.

Для расчета ЧБР выбирается видео и параметры выделенных областей. После этого для каждого пикселя выделенной области (размер кадра – $1\,440 \times 1\,080$) считается преобразование Фурье по следующей формуле:

$$F(k) = \sum_{n=0}^{N-1} (f(n) \cdot \exp(-i \frac{2 \cdot \pi}{N} \cdot n \cdot k)), \quad k = 0 \dots N-1,$$

где: $f(n)$ – значение пикселя n -го кадра (в оттенках серого – от 0 до 255); N – количество кадров; i – мнимый

мая единица; $F(k)$ – значение частоты, получаемой в результате преобразования. При преобразовании считается сумма.

Полученные в результате гистограммы распределения частот для выделенных областей видео были помещены в двухслойную нейросеть в качестве данных для обучения (случайно выбранные 200 областей из 413).

Были подобраны оптимальные параметры нейросети, на вход которой идут гистограммы распределения частот (32 входных нейрона), а на выходе – один нейрон, показывающий, здоров человек или болен (вещественное значение между 0 до 1, где 0 – абсолютно здоровый, а 1 – абсолютно больной) (тестовая выборка – 213 оставшихся гистограмм).

Нейросеть выдает правильный результат (болен / здоров) в 98 % входных данных, тогда как определение через расчет медианы (Me) и стандартного отклонения дает правильный результат только в 81 % случаев.

Выбирается частота, соответствующая максимальной амплитуде для каждой точки видео. После этого составляется карта частот (для каждого пикселя области – своя частота) и строится распределение частот (в процентах от общего количества пикселей), затем расчет ЧБР в пикселях преобразовывается в Гц. С помощью программы в выделенной области осуществляется подсчет площади движущихся клеток, которые отображаются в процентах.

Для ЧБР с помощью программы можно рассчитать Me и среднее стандартное отклонение ($M \pm SD$) наиболее значимых частот в распределении.

Описание работы программы на клинических примерах

Реализован графический интерфейс программы, содержащий список пациентов ($n = 10$) и здоровых ($n = 5$) (контроль программы). Для каждого пациента были выделены по 4 области на видео (2 из них – скопление ворсин эпителия (названных «островки» или «круги», а 2 – пространство между «кругами») и рассчитано среднее значение ($M \pm SD$) ЧБР в 4 областях.

Результаты расчета ЧБР (Гц) программой PCD HSVMA на примере здорового донора ($n = 1$) и пациентов ($n = 2$), полученные *in vivo* и *in vitro* методом ALI-культивирования, представлены в табл. 1. Там же представлены результаты клинических данных, генетического исследования, результаты ТЭМ. Следует отметить, что у 2 пациентов диагноз ПЦД был подтвержден молекулярно-генетическими методами. На рис. 2 показано, что у ALI-культуры пациента № 1 области с движением ресничек (красные области, где изменение интенсивности пикселя превышает заданный порог (порог 10), значительно меньше, чем у ALI-культуры здорового донора. На рис. 3 представлены результаты ТЭМ у 2 пациентов с ПЦД и 1 здорового донора.

По данным корреляционного анализа оценки ЧБР (Гц) с помощью программы PCD HSVMA в сравнении с программами *CiliarMove* и *Ciliaryzer* (рис. 4А) показано, что коэффициенты корреляции составили 0,985 и 1 соответственно, что свидетельствует об отсутствии разницы между программами. По результатам ROC-анализа результатов ЧБР, полученных в программе

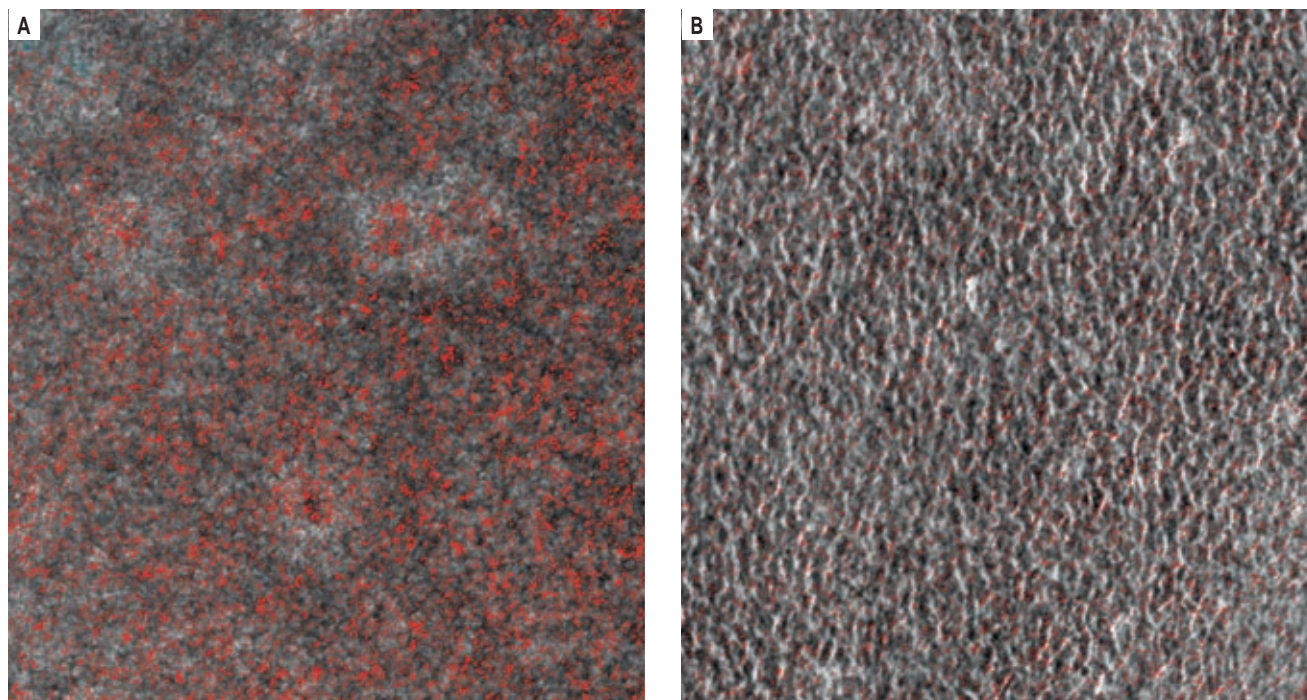


Рис. 2. Изображения ALI-культур при видеомикроскопическом анализе. Красным отмечены области, в которых изменение интенсивности пикселя превышает заданный порог (порог 10): А – здоровый донор; В – пациент № 1

Figure 2. Images of ALI cultures during video microscopic analysis. Areas in which the change in pixel intensity exceeds a given threshold (threshold 10) are highlighted in red: A, healthy donor; B, patient No.1

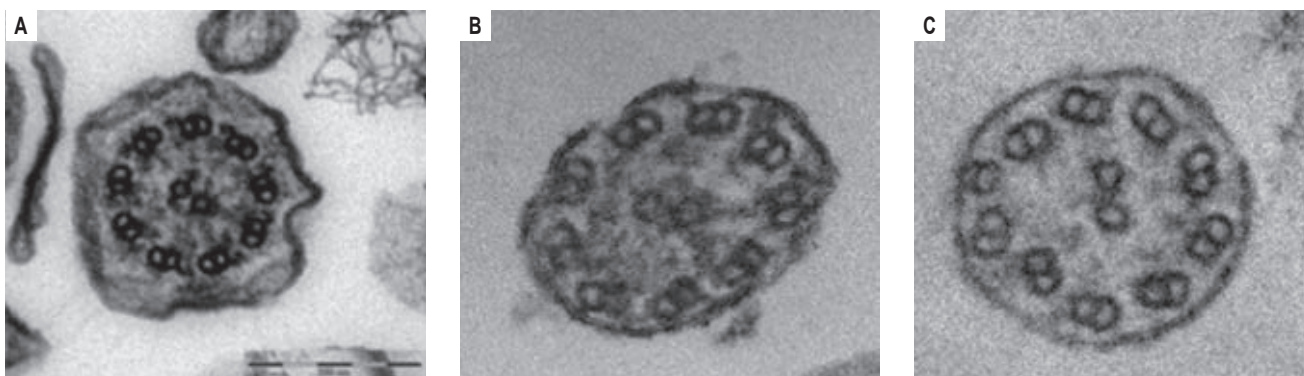


Рис. 3. Репрезентативные изображения трансмиссионной электронной микроскопии: А – здоровый донор; В – пациент № 1 (наружные и внутренние динеиновые ручки отсутствуют); С – пациент № 2 (внутренние динеиновые ручки не определяются, наружные динеиновые ручки не определяются или значительно укорочены)

Figure 3. Representative transmission electron microscopy images: A, healthy donor; B, patient No.1 (external and internal dynein handles are absent); C, patient No.2 (inner dynein arms are not detected, outer dynein arms are not detected or are significantly shortened)

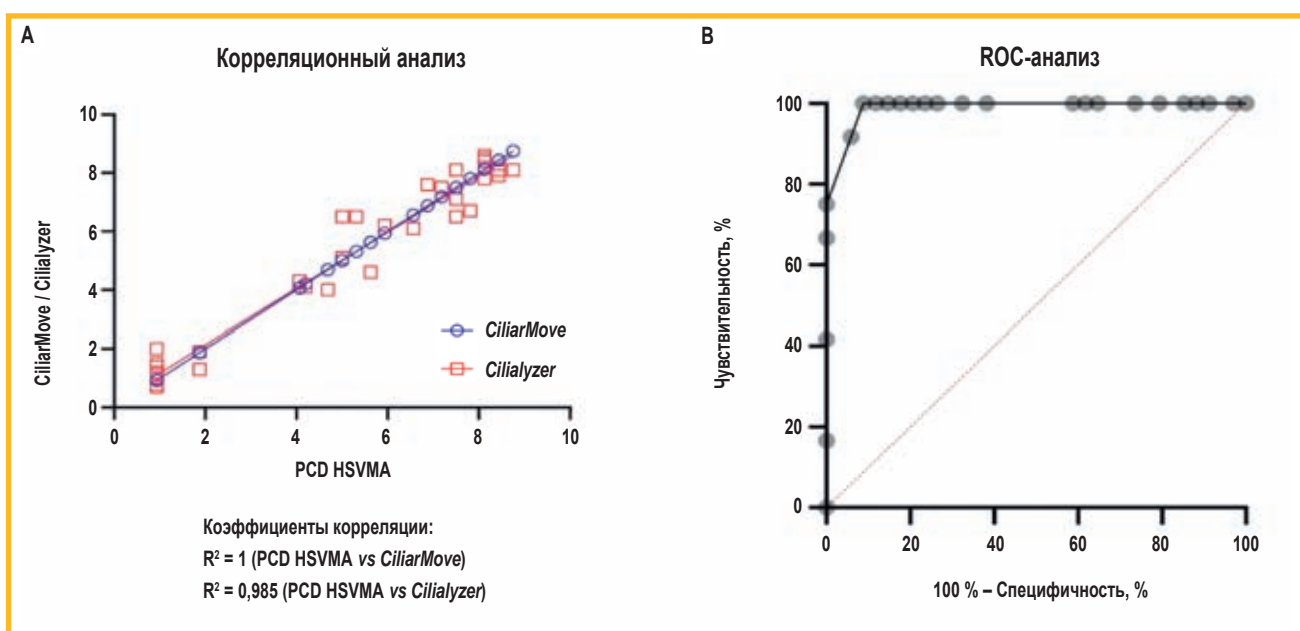


Рис. 4. А – корреляционный; В – ROC-анализ результатов частоты биения ресничек, полученных с помощью программы определения частоты биения реснитчатого эпителия при первичной цилиарной дискинезии и программ *CiliarMove* и *Ciliaryzer*

Figure 4. A, correlation; B, ROC-analysis of the results of ciliary beating frequency obtained using the PCD HSVMA software for determining the frequency of ciliated epithelium in primary ciliary dyskinesia and the *CiliarMove* and *Ciliaryzer* software

PCD HSVMA, между группами здоровых доноров и пациентов с ПЦД (см. рис. 4В) площадь под кривой (AUC) составила 0,97.

Обсуждение

Согласно литературным данным, появление автоматизированных программ позволяет эффективно, объективно и воспроизводимо анализировать изображения, что увеличивает точность работы. Существуют 2 основных метода оценки результатов ЦВС ВМС: определение частоты биения РЭ (Гц) и с помощью подсчета пикселей в одном кадре [12].

Некоторыми европейскими исследователями биение РЭ регистрировалось с помощью цифровой камеры с частотой 355 кадров в секунду с подсчетом пикселей. Каждый видеоряд состоял из 1 800 кадров

с разрешением 256 × 192 пикселей. Оценивалось биение РЭ по шкале от 0 до 3 баллов, где нормальное координированное биение цилиарных клеток оценивалось в 0 баллов, а дискинетическое биение – от 1 до 3 баллов. Оценка ≥ 2 баллов описана как возможность наличия ПЦД у пациента [13, 14]. При использовании метода подсчета пикселей в одном кадре видеоизображения в большинстве случаев анализируются вручную, иногда с использованием базовых программ анализа изображений, например *ImageJ* [15]. При анализе видеоизображений вручную может увеличиваться время обработки материала и снижаться точность работы.

Другой группой исследователей для оценки ЧБР (Гц) использовались самые распространенные зарегистрированные программы *CiliarMove* [8] или *Ciliaryzer* [9]. Данный метод является более пока-

Таблица 2
Сравнительная характеристика программы определения частоты биения реснитчатого эпителия при первичной цилиарной дискинезии с аналогичными программами CiliarMove и Ciliaryzer

Table 2
Comparative characteristics of the PCD HSVMA software for determining the beat frequency of the ciliated epithelium in primary ciliary dyskinesia with similar software CiliarMove and Ciliaryzer

Характеристика	Разработанная программа PCD HSVMA	CiliarMove	Ciliaryzer
Определение ЧБР, Гц	+	+	+
Определение пользователем диапазона частот, Гц	+	-	+
Определение числа активных клеток, %	+	-	-
Возможность стабилизации видео перед обработкой	+	-	+
Фильтр шума	+	-	-
Хранение данных пациентов	+	-	-
Отображение тепловой карты	+	-	+
Отображение результатов дискретного преобразования Фурье для каждого пикселя видеофайла	+	+	-
Возможность пакетной обработки видеофайлов	+	-	+
Возможность формирования большой серверной базы данных с данными пациентов и видеофайлами	+	-	-
Возможность работы с базой данных с синхронизацией нескольких пользователей	+	-	-
Построение цветовых и статистических гистограмм	+	+	-
Отображение точных координат выделяемых областей	+	+	-
Возможность обработки больших (> 512 × 512 точек) областей	+	-	+
Возможность обработки нескольких областей для 1 видео	+	-	-

Примечание: ЧБР – частота биения ресничек.

зательным и завершенным, поскольку с помощью дискретного преобразования Фурье для каждого пикселя видеофайла возможно трансформировать пиксели (Гц).

Проведено сравнение программы PCD HSVMA с программами *CiliarMove* и *Ciliaryzer* по 15 критериям (табл. 2). Разработанная программа не только не уступает по своим характеристикам двум зарубежным программам, но имеет больше параметров оценки функционального состояния РЭ *in vivo* и *in vitro* методом АЛІ-культивирования.

Показано, что ЦВС ВМС может быть использована для точного анализа ЧБР и полезна для диагностики, представляющей трудности, у пациентов с отсутствием ультраструктурных дефектов. Применение программы PCD HSVMA позволит улучшить отбор пациентов, которым необходима ТЭМ, что может почти на $\frac{1}{3}$ сократить показания к проведению более дорогостоящего ТЭМ у пациентов с подозрением на ПЦД, согласно европейским исследованиям [16]. Кроме того, в настоящее время ТЭМ доступна только в центральных федеральных учреждениях.

Заключение

Разработана программа определения частоты биения РЭ при ПЦД (PCD HSVMA) (для ЭВМ, регистрационный номер – 2023687245), позволяющая улучшить диагностику ПЦД согласно европейскому консенсусу. Показано, что с помощью указанной программы мож-

но достоверно исследовать движение ресничек *in vivo* и в АЛІ-культуре *in vitro*, полученных после проведения назальной браш-биопсии.

Программа PCD HSVMA может быть использована для диагностики ПЦД в лабораториях лечебно-профилактических учреждений, научных учреждениях и может быть включена в образовательные программы подготовки врачей-лаборантов, педиатров, терапевтов, пульмонологов, врачей функциональной диагностики (врачей-эндоскопистов). При использовании указанной программы следует ожидать снижения количества времени, необходимого специалистам для оценки ЧБР, и повышения точности диагностики.

Литература

- Lucas J.S., Burgess A., Mitchison H.M. et al. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch. Dis. Child.* 2014; 99 (9): 850–856. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304831.
- Кондратьева Е.И., Авдеев С.Н., Киян Т.А., Мизерницкий Ю.Л. Классификация первичной цилиарной дискинезии. *Пульмонология.* 2023; 33 (6): 731–738. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-6-731-738.
- Müller L., Savas S.T., Tschanz S.A. et al. A Comprehensive approach for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia – experiences from the first 100 patients of the PCD-UNIBE Diagnostic center. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11 (9): 1540. DOI: 10.3390/diagnostics11091540.
- Ardura-Garcia C., Goutaki M., Carr S.B. et al. Registries and collaborative studies for primary ciliary dyskinesia in Europe. *ERJ Open Res.* 2020; 6 (2): 00005-2020. DOI: 10.1183/23120541.00005-2020.
- Afzelius B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science.* 1976; 193 (4250): 317–319. DOI: 10.1126/science.1084576.

6. Lucas J.S., Barbato A., Collins S.A. et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* 2017; 49 (1): 1601090. DOI: 10.1183/13993003.01090-2016.
7. Shapiro A.J., Davis S.D., Polineni D. et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: an official American Thoracic Society clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018; 197 (12): e24–39. DOI: 10.1164/rccm.201805-0819st.
8. Sampaio P., da Silva M.F., Vale I. et al. CiliarMove: new software for evaluating ciliary beat frequency helps find novel mutations by a Portuguese multidisciplinary team on primary ciliary dyskinesia. *ERJ Open Res.* 2021; 7 (1): 00792–2020. DOI: 10.1183/23120541.00792-2020.
9. Schneider M., Tschanz S.A., Escher A. et al. The Ciliaryzer – a freely available open-source software for the analysis of mucociliary activity in respiratory cells. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2023; 241: 107744. DOI: 10.1016/j.cmpb.2023.107744
10. Coles J.L., Thompson J., Horton K.L. et al. A revised protocol for culture of airway epithelial cells as a diagnostic tool for primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Med.* 2020; 9 (11): 3753. DOI: 10.3390/jcm9113753.
11. Демченко А.Г., Смирнихина С.А. Культуры ресниччатых клеток для диагностики первичной цилиарной дискинезии. *Пульмонология.* 2023; 33 (2): 210–215. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-210-215.
12. Grubb B.R., Livraghi-Butrico A., Rogers T.D. et al. Reduced mucociliary clearance in old mice is associated with a decrease in Muc5b mucin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016; 310 (9): L860–867. DOI: 10.1152/ajplung.00015.2016.
13. Goodman A., Carpenter A.E. High-throughput, automated image processing for large-scale fluorescence microscopy experiments. *Microsc. Microanal.* 2016; 22 (Suppl. 3): 538–539. DOI: 10.1017/s1431927616003548.
14. Papon J.F., Bassinet L., Cariou-Patron G. et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2012; 7: 78. DOI: 10.1186/1750-1172-7-78.
15. Stannard W.A., Chilvers M.A., Rutman A.R. et al. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181 (4): 307–314. DOI: 10.1164/rccm.200903-0459OC.
16. Jorissen M., Willems T., Van der Schueren B. et al. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* 2000, 54 (3): 343–356. Available at: <https://typeset.io/papers/ultrastructural-expression-of-primary-ciliary-dyskinesia-60d743w8nv>
3. Müller L., Savas S.T., Tschanz S.A. et al. A Comprehensive approach for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia – experiences from the first 100 patients of the PCD-UNIBE Diagnostic center. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11 (9): 1540. DOI: 10.3390/diagnostics11091540.
4. Ardura-Garcia C., Goutaki M., Carr S.B. et al. Registries and collaborative studies for primary ciliary dyskinesia in Europe. *ERJ Open Res.* 2020; 6 (2): 00005–2020. DOI: 10.1183/23120541.00005-2020.
5. Afzelius B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science.* 1976; 193 (4250): 317–319. DOI: 10.1126/science.1084576.
6. Lucas J.S., Barbato A., Collins S.A. et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* 2017; 49 (1): 1601090. DOI: 10.1183/13993003.01090-2016.
7. Shapiro A.J., Davis S.D., Polineni D. et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: an official American Thoracic Society clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018; 197 (12): e24–39. DOI: 10.1164/rccm.201805-0819st.
8. Sampaio P., da Silva M.F., Vale I. et al. CiliarMove: new software for evaluating ciliary beat frequency helps find novel mutations by a Portuguese multidisciplinary team on primary ciliary dyskinesia. *ERJ Open Res.* 2021; 7 (1): 00792–2020. DOI: 10.1183/23120541.00792-2020.
9. Schneider M., Tschanz S.A., Escher A. et al. The Ciliaryzer – a freely available open-source software for the analysis of mucociliary activity in respiratory cells. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2023; 241: 107744. DOI: 10.1016/j.cmpb.2023.107744
10. Coles J.L., Thompson J., Horton K.L. et al. A revised protocol for culture of airway epithelial cells as a diagnostic tool for primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Med.* 2020; 9 (11): 3753. DOI: 10.3390/jcm9113753.
11. Demchenko A.G., Smirnikhina S.A. [Ciliated cell cultures for diagnosis of primary ciliary dyskinesia]. *Pul'monologiya.* 2023; 33 (2): 210–215. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-210-215 (in Russian).
12. Grubb B.R., Livraghi-Butrico A., Rogers T.D. et al. Reduced mucociliary clearance in old mice is associated with a decrease in Muc5b mucin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016; 310 (9): L860–867. DOI: 10.1152/ajplung.00015.2016.
13. Goodman A., Carpenter A.E. High-throughput, automated image processing for large-scale fluorescence microscopy experiments. *Microsc. Microanal.* 2016; 22 (Suppl. 3): 538–539. DOI: 10.1017/s1431927616003548.
14. Papon J.F., Bassinet L., Cariou-Patron G. et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2012; 7: 78. DOI: 10.1186/1750-1172-7-78.
15. Stannard W.A., Chilvers M.A., Rutman A.R. et al. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181 (4): 307–314. DOI: 10.1164/rccm.200903-0459OC.
16. Jorissen M., Willems T., Van der Schueren B. et al. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* 2000, 54 (3): 343–356. Available at: <https://typeset.io/papers/ultrastructural-expression-of-primary-ciliary-dyskinesia-60d743w8nv>

Поступила: 17.01.24
Принята к печати: 08.03.24

References

1. Lucas J.S., Burgess A., Mitchison H.M. et al. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch. Dis. Child.* 2014; 99 (9): 850–856. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304831.
2. Kondratyeva E.I., Avdeev S.N., Kyian T.A., Mizernitskiy Yu.L. [Classification of primary ciliary dyskinesia]. *Pul'monologiya.* 2023; 33 (6): 731–738. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-6-731-738 (in Russian).
3. Müller L., Savas S.T., Tschanz S.A. et al. A Comprehensive approach for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia – experiences from the first 100 patients of the PCD-UNIBE Diagnostic center. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11 (9): 1540. DOI: 10.3390/diagnostics11091540.
4. Ardura-Garcia C., Goutaki M., Carr S.B. et al. Registries and collaborative studies for primary ciliary dyskinesia in Europe. *ERJ Open Res.* 2020; 6 (2): 00005–2020. DOI: 10.1183/23120541.00005-2020.
5. Afzelius B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science.* 1976; 193 (4250): 317–319. DOI: 10.1126/science.1084576.
6. Lucas J.S., Barbato A., Collins S.A. et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* 2017; 49 (1): 1601090. DOI: 10.1183/13993003.01090-2016.
7. Shapiro A.J., Davis S.D., Polineni D. et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: an official American Thoracic Society clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018; 197 (12): e24–39. DOI: 10.1164/rccm.201805-0819st.
8. Sampaio P., da Silva M.F., Vale I. et al. CiliarMove: new software for evaluating ciliary beat frequency helps find novel mutations by a Portuguese multidisciplinary team on primary ciliary dyskinesia. *ERJ Open Res.* 2021; 7 (1): 00792–2020. DOI: 10.1183/23120541.00792-2020.
9. Schneider M., Tschanz S.A., Escher A. et al. The Ciliaryzer – a freely available open-source software for the analysis of mucociliary activity in respiratory cells. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2023; 241: 107744. DOI: 10.1016/j.cmpb.2023.107744
10. Coles J.L., Thompson J., Horton K.L. et al. A revised protocol for culture of airway epithelial cells as a diagnostic tool for primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Med.* 2020; 9 (11): 3753. DOI: 10.3390/jcm9113753.
11. Demchenko A.G., Smirnikhina S.A. [Ciliated cell cultures for diagnosis of primary ciliary dyskinesia]. *Pul'monologiya.* 2023; 33 (2): 210–215. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-2-210-215 (in Russian).
12. Grubb B.R., Livraghi-Butrico A., Rogers T.D. et al. Reduced mucociliary clearance in old mice is associated with a decrease in Muc5b mucin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2016; 310 (9): L860–867. DOI: 10.1152/ajplung.00015.2016.
13. Goodman A., Carpenter A.E. High-throughput, automated image processing for large-scale fluorescence microscopy experiments. *Microsc. Microanal.* 2016; 22 (Suppl. 3): 538–539. DOI: 10.1017/s1431927616003548.
14. Papon J.F., Bassinet L., Cariou-Patron G. et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2012; 7: 78. DOI: 10.1186/1750-1172-7-78.
15. Stannard W.A., Chilvers M.A., Rutman A.R. et al. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181 (4): 307–314. DOI: 10.1164/rccm.200903-0459OC.
16. Jorissen M., Willems T., Van der Schueren B. et al. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* 2000, 54 (3): 343–356. Available at: <https://typeset.io/papers/ultrastructural-expression-of-primary-ciliary-dyskinesia-60d743w8nv>

Received: January 17, 2024
Accepted for publication: March 08, 2024

Информация об авторах / Authors Information

Киян Татьяна Анатольевна – к. м. н., старший научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-15-01; e-mail: bogdanovata87@gmail.com (Scopus ID: 57205414678; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8281-1162>)

Tatiana A. Kyian, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation tel.: (499) 324-15-01; e-mail: bogdanovata87@gmail.com (Scopus ID: 57205414678; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8281-1162>)

Смирнихина Светлана Анатольевна – к. м. н., доцент, заведующая лабораторией редактирования генома Федерального государственного

бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-35-79; e-mail: smirnikhinas@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>)
Svetlana A. Smirnikhina, Candidate of Medicine, Associate Professor, Head of the Laboratory of Genome Editing, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (499) 324-35-79; e-mail: smirnikhinas@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>)

Анна Григорьевна Демченко – научный сотрудник лаборатории редактирования генома Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 324-35-79; e-mail: demchenkoann@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4460-7627>)

Anna G. Demchenko, Researcher, Genome Editing Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (499) 324-35-79; e-mail: demchenkoann@yandex.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4460-7627>)

Роман Владимирович Вейко — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (499) 612-81-93; e-mail: veiko.r@yandex.ru
Roman V. Veiko, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (499) 612-81-93; e-mail: veiko.r@yandex.ru

Кондратьева Елена Ивановна — д. м. н., профессор, руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного

профессионального образования Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; заместитель директора по научной работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Научно-исследовательский клинический институт детства» Министерства здравоохранения Московской области; тел.: (495) 111-03-03; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

Elena I. Kondratyeva, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Scientific and Clinical Department of cystic fibrosis, Head of the Department of Genetics of Respiratory System Diseases, Institute of Higher and Additional Professional Education, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Centre for Medical Genetics”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; Deputy Director for Research, State Budgetary Healthcare Institution of the Moscow region “Research Clinical Institute of Childhood”, Healthcare Ministry of Moscow Region; tel.: (495) 111-03-03; e-mail: elenafpk@mail.ru (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6395-0407>)

Участие авторов

Киян Т.А. — участие в наборе пациентов, проведение браш-биопсии реснитчатого эпителия носовой полости, обсуждение и оформление статьи, списка литературы

Смирнихина С.А. — консультирование по вопросам культивирования реснитчатого эпителия, подготовка текста статьи

Демченко А.Г. — проведение культивирования клеток, иммунофлюоресцентного окрашивания клеток, подготовка текста статьи, статистический анализ

Вейко Р.В. — создание Программы определения скорости биения реснитчатого эпителия при первичной цилиарной дискинезии

Кондратьева Е.И. — идея научного исследования, подбор пациентов, участие в создании программы, координация на всех этапах, подготовка статьи

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, несут ответственность за целостность всех частей статьи.

Authors Contribution

Kyian T.A. — participation in patient recruitment, performing brush-biopsy of the ciliated epithelium of the nasal cavity, discussion and design of the article and reference list

Smirnikhina S.A. — consultations about ciliated epithelium culturing, preparing text of the article

Demchenko A.G. — cell culturing, immunofluorescence staining of cells, preparing text of the article, statistical analysis

Veiko R.V. — creation of the PCD High-Speed Video Microscopy Analysis (PCD HSVMA) software for the determination of ciliary epithelium beat frequency in primary ciliary dyskinesia

Kondratyeva E.I. — idea of the scientific study, patient recruitment, participation in creation of the software, coordination at all stages, preparation of the article

All authors have made a significant contribution to the search, analysis, and preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.