

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР** Денис Ребриков, д. б. н., профессор

**ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА** Александр Эттингер, д. м. н., профессор

**РЕДАКТОРЫ** Валентина Гейдебрект, Лилия Егорова

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР** Нина Тюрина

**ПЕРЕВОДЧИКИ** Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

**ДИЗАЙН И ВЕРСТКА** Марина Доронина

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)  
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. К. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)  
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)  
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)  
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)  
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)  
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)  
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)  
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)  
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)  
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)  
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)  
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)  
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребетский, д. х. н., профессор (Москва, Россия)  
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)  
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)  
А. Г. Платонова, д. м. н. (Киев, Украина)  
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)  
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)  
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)  
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)  
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)  
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)  
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)  
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)  
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

**ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ** <http://vestnikrgmu.ru/login>

**ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**СОТРУДНИЧЕСТВО** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

**АДРЕС РЕДАКЦИИ** ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2018: 0,16

Журнал включен в WoS. JCR 2018: 0,13

Индекс Хирша (h<sup>2</sup>) журнала по оценке Google Scholar: 3

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google  
scholar

Журнал включен в РИНЦ. IF 2017: 0,326

Журнал включен в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Здесь находится открытый архив журнала

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ  
БИБЛИОТЕКА  
LIBRARY.RU



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2019-05

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)

© Фото мыши: <https://imaging.uci.edu/>



Подписано в печать 31.10.2019  
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

# BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

**EDITOR-IN-CHIEF** Denis Rebrikov, DSc, professor

**DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF** Alexander Oettinger, DSc, professor

**EDITORS** Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

**TECHNICAL EDITOR** Nina Tyurina

**TRANSLATORS** Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

### EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)  
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)  
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)  
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)  
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)  
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)  
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)  
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)  
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)  
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)  
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)  
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)  
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)  
Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Platonova AG, DSc (Kiev, Ukraine)  
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)  
Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)  
Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Skobolina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)  
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)  
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)  
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)  
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)  
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)  
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

**SUBMISSION** <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

**CORRESPONDENCE** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

**COLLABORATION** [manager@vestnikrgmu.ru](mailto:manager@vestnikrgmu.ru)

**ADDRESS** ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus. CiteScore 2018: 0.16

Scopus®

Indexed in WoS. JCR 2018: 0.13

WEB OF SCIENCE™

Five-year h-index is 3

Google  
scholar

Indexed in RSCI. IF 2017: 0.326

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ  
БИБЛИОТЕКА  
LIBRARY.RU

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2019-05

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)

© Photo mouse: <https://imaging.uci.edu/>



Approved for print 31.10.2019

Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ОБЗОР</b>  | <b>5</b>  |
| <b>CAR-терапия солидных опухолей: перспективные подходы к модулированию противоопухолевой активности CAR-T-лимфоцитов</b><br>Я. Ю. Киселева, А. М. Шишкин, А. В. Иванов, Т. М. Кулинич, В. К. Боженко   |           |
| <b>CAR T-cell therapy of solid tumors: promising approaches to modulating antitumor activity of CAR T cells</b><br>Kiseleva YaYu, Shishkin AM, Ivanov AV, Kulnich TM, Bozhenko VK   |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>14</b> |
| <b>Согласованная динамика сывороточного IgE и численности IgE<sup>+</sup>-клонотипов с уровнем пыльцы в воздухе при поллинозе</b><br>А. И. Микелов, Д. Б. Староверов, Е. А. Комеч, Ю. Б. Лебедев, Д. М. Чудаков, И. В. Звягин                             |           |
| <b>Correlated dynamics of serum IGE and IGE<sup>+</sup> clonotype count with allergen air level in seasonal allergic rhinitis</b><br>Mikelov AI, Staroverov DB, Komech EA, Lebedev YB, Chudakov DM, Zvyagin IV  |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>25</b> |
| <b>Точность предикции пигментации волос и глаз по генетическим маркерам для популяций России</b><br>О. П. Балановский, В. С. Петрушенко, И. О. Горин, Ж. А. Карагезева, Н. В. Маркина, Е. С. Кострюкова, Н. А. Лейбова, А. М. Маурер, Е. В. Балановская   |           |
| <b>The accuracy of predicting eye and hair pigmentation based on genetic markers in Russian populations</b><br>Balanovsky OP, Petrushenko VS, Gorin IO, Kagazezheva Zha, Markina NV, Kostryukova ES, Leybova NA, Maurer AM, Balanovska EV                 |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>42</b> |
| <b>Болезнь Фридрейха: экспрессия гена <i>FHN</i> и ее взаимосвязь с особенностями метилирования ДНК</b><br>Е. Ю. Федотова, Н. Ю. Абрамичева, Е. П. Нужный, М. В. Ершова, С. А. Ключников, С. Н. Иллариошкин   |           |
| <b>Friedreich ataxia: <i>FHN</i> gene expression and its relationship with DNA methylation pattern</b><br>Fedotova EYu, Abramychева NYu, Nuzhny EP, Ershova MV, Klyushnikov SA, Illarioshkin SN   |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>49</b> |
| <b>Действие карнозина и липоевой кислоты в модели поздней стадии болезни Паркинсона у крыс</b><br>Д. С. Бережной, Т. Н. Федорова, О. И. Куликова, А. В. Ставровская, Д. А. Абаимов, А. С. Гущина, А. С. Ольшанский, Д. Н. Воронков, С. Л. Стволинский     |           |
| <b>Effects of carnosine and lipoic acid in the late stage of parkinson's disease in rats</b><br>Berezhnoy DS, Fedorova TN, Kulikova OI, Stavrovskaya AV, Abaimov DA, Gushchina AS, Olshansky AS, Voronkov DN, Stvolinsky SL                               |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>56</b> |
| <b>Изменения коннективности головного мозга у больных с нарушениями вербальной оперативной памяти при дисциркуляторной энцефалопатии</b><br>В. Ф. Фокин, Н. В. Пономарева, Р. Н. Коновалов, М. В. Кротенкова, Р. Б. Медведев, О. В. Лагода, М. М. Танашян |           |
| <b>Brain connectivity changes in patients with working memory impairments with chronic ischemic cerebrovascular disease</b><br>Fokin VF, Ponomareva NV, Kononov RN, Krotenkova MV, Medvedev RB, Lagoda OV, Tanashyan MM                                   |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>63</b> |
| <b>Параquat-индуцированная модель паркинсонизма и выявление фосфорилированного α-синуклеина в энтеральной нервной системе у крыс</b><br>Л. А. Ставровская, Д. Н. Воронков, К. А. Кутукова, М. В. Иванов, А. С. Гущина, С. Н. Иллариошкин                  |           |
| <b>Paraquat-induced model of Parkinson's disease and detection of phosphorylated α-synuclein in the enteric nervous system of rats</b><br>Stavrovskaya AV, Voronkov DN, Kutukova KA, Ivanov MV, Gushchina AS, Illarioshkin SN                             |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>70</b> |
| <b>Состояние когнитивных функций после ангиореconstructивных операций на сонных артериях</b><br>М. М. Танашян, Р. Б. Медведев, О. В. Лагода, Е. С. Бердникович, С. И. Скрылев, Э. Г. Гемджян, М. В. Кротенкова  |           |
| <b>The state of cognitive functions after angioreconstructive operations on the carotid arteries</b><br>Tanashyan MM, Medvedev RB, Lagoda OV, Berdnikovich ES, Skrylev SI, Gemdzian EG, Krotenkova MV   |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>  | <b>78</b> |
| <b>Диссекция внутренней сонной и позвоночной артерий: морфология, патофизиология, провоцирующие факторы</b><br>Л. А. Калашникова, Т. С. Гулевская, А. В. Сахарова, Р. П. Чайковская, М. В. Губанова, М. С. Данилова, А. А. Шабалина, Л. А. Добрынина      |           |
| <b>Internal carotid and vertebral artery dissection: morphology, pathophysiology and provoking factors</b><br>Kalashnikova LA, Gulevskaya TS, Sakharova AV, Chaykovskaya RP, Gubanova MV, Danilova MS, Dobrynina LA, Shabalina AA                         |           |

Протромбогенные полиморфные варианты генов системы гемостаза и фолатного обмена

при асептическом тромбозе церебральных венозных синусов

M. Ю. Максимова, Ю. И. Дубовицкая, М. В. Кротенкова, А. А. Шабалина

Prothrombogenic polymorphic variants of hemostatic and folate metabolism genes in patients with aseptic cerebral venous thrombosis

Maksimova MYu, Dubovitskaya Yul, Krotenkova MV, Shabalina AA

Анализ связи полиморфных вариантов генов IL4, IL10, IL13 с развитием atopической бронхиальной астмы и ремиссией

Ю. В. Жорина, О. С. Абрамовских, Г. Л. Игнатова, О. Г. Площанская

Analysis of associations of polymorphisms in the genes coding for L4, IL10, IL13 with the development of atopic bronchial asthma and its remission

Zhorina YuV, Abramovskikh OS, Ignatova GL, Ploshchanskay OG

Циклодиализ *ab externo* с имплантацией коллагенового дренажа в хирургическом лечении глаукомы

А. С. Шрадда, В. Кумар, М. А. Фролов, Г. Н. Душина, А. И. Беззаботнов, К. А. Абу Заалан

Cyclodialysis *ab externo* with implantation of a collagen implant in surgical management of glaucoma

Shradqa AS, Kumar V, Frolov MA, Dushina GN, Bezzabotnov AI, Abu Zaalan KA

Микробиота кишечника здоровых новорожденных детей: новые технологии диагностики — новый взгляд на процесс становления

Т. В. Припутневич, Е. Л. Исаева, В. В. Муравьева, А. Б. Гордеев, В. В. Зубков, Л. А. Тимофеева, М. К. Месян, Е. Шубина, В. В. Макаров, С. М. Юдин

Gut microbiota of healthy newborns: new diagnostic technologies — new outlook on the development process

Priputnevich TV, Isaeva EL, Muravieva VV, Gordeev AB, Zubkov VV, Timofeeva LA, Mesyan MK, Shubina E, Makarov VV, Yudin SM

Способ прогнозирования бактериального вульвовагинита у девочек в зависимости от стадии полового развития согласно шкале Таннера

А. В. Казакова, Е. В. Уварова, Л. В. Лимарева, А. А. Трупакова, А. И. Мишина

Prediction of bacterial vulvovaginitis in girls at different tanner stages of sexual development

Kazakova AV, Uvarova EV, Limareva LV, Trupakova AA, Mishina AI


Физиологические механизмы воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на специальную физическую работоспособность высококвалифицированных спортсменов

Т. М. Брук, П. А. Терехов, Ф. Б. Литвин, С. В. Верлин

Physiological mechanisms of the low-intensity laser radiation impact on the highly qualified athletes' special physical performance

Bruck TM, Terekhov PA, Litvin FB, Verlin SV

## CAR-ТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К МОДУЛИРОВАНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ CAR-T-ЛИМФОЦИТОВ

Я. Ю. Киселева , А. М. Шишкин, А. В. Иванов, Т. М. Кулинич, В. К. Боженко

Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия

Адоптивную иммунотерапию, использующую генно-модифицированные аутологичные Т-лимфоциты с искусственным рецептором заданной специфичности (CAR-терапию) рассматривают в качестве перспективного подхода к лечению солидных опухолей, как рецидивирующих, так и на поздних стадиях развития. При использовании этого вида терапии приходится сталкиваться с рядом проблем, таких как способность опухоли к отбору клеток со сниженной экспрессией антигенов-мишеней в ходе терапии и снижение функциональной активности CAR-T-лимфоцитов иммуносупрессивным микроокружением опухоли. В обзоре обсуждены существующие генно-инженерные подходы к модификации технологии получения CAR-T-лимфоцитов для: 1) создания универсальных искусственных рецепторов, способных в ходе иммунотерапии переключаться и атаковать различные антигены-мишени; 2) повышения функциональной активности CAR-T-лимфоцитов в условиях иммуносупрессивного микроокружения путем подавления экспрессии ингибирующих рецепторов или повышения продукции цитокинов.

**Ключевые слова:** CAR-терапия, солидные опухоли, химерный антигенный рецептор, CAR-T-клетки, универсальные CAR, иммуносупрессивное микроокружение

**Информация о вкладе авторов:** Я. Ю. Киселева — анализ литературы, написание рукописи, подготовка рисунков, редактирование; А. М. Шишкин и А. В. Иванов — анализ литературы, редактирование; Т. М. Кулинич и В. К. Боженко — редактирование.

✉ **Для корреспонденции:** Яна Юрьевна Киселева  
ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997; yana.kiseleva@gmail.com

**Статья получена:** 03.10.2019 **Статья принята к печати:** 17.10.2019 **Опубликована онлайн:** 18.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.066

## CAR T-CELL THERAPY OF SOLID TUMORS: PROMISING APPROACHES TO MODULATING ANTITUMOR ACTIVITY OF CAR T CELLS

Kiseleva YaYu , Shishkin AM, Ivanov AV, Kulnich TM, Bozhenko VK

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Adoptive immunotherapy that makes use of genetically modified autologous T cells carrying a chimeric antigen receptor (CAR) with desired specificity is a promising approach to the treatment of advanced or relapsed solid tumors. However, there are a number of challenges facing the CAR T-cell therapy, including the ability of the tumor to silence the expression of target antigens in response to the selective pressure exerted by therapy and the dampening of the functional activity of CAR T cells by the immunosuppressive tumor microenvironment. This review discusses the existing gene-engineering approaches to the modification of CAR T-cell design for 1) creating universal “switchable” synthetic receptors capable of attacking a variety of target antigens; 2) enhancing the functional activity of CAR T cells in the immunosuppressive microenvironment of the tumor by silencing the expression of inhibiting receptors or by stimulating production of cytokines.

**Keywords:** CAR T-cell therapy, solid tumors, chimeric antigen receptor, CAR T cells, universal CARs, immunosuppressive microenvironment

**Author contribution:** Kiseleva YaYu analyzed the literature, prepared the draft of the manuscript, created the figures; Shishkin AM analyzed the literature and revised the manuscript; Ivanov AV analyzed the literature and revised the manuscript; Kulnich TM revised the manuscript; Bozhenko VK revised the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yana Yu. Kiseleva  
Profsoyuznaya, 86, Moscow, 117997; 89036728541 yana.kiseleva@gmail.com

**Received:** 03.10.2019 **Accepted:** 17.10.2019 **Published online:** 18.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.066

Используемые на сегодняшний день традиционные методы терапии злокачественных новообразований, такие как хирургия, радио- и химиотерапия, не отвечают требуемой эффективности лечения опухолей на поздних стадиях развития, а также рецидивирующих опухолей. Недостаточная эффективность традиционных методов лечения стимулировала появление новых направлений, значительная часть которых основана на использовании механизмов иммунного ответа [1]. Одно из таких направлений — адоптивная иммунотерапия на основе химерных Т-клеточных рецепторов. Она включает введение в организм пациента аутологичных Т-лимфоцитов, модифицированных *ex vivo* методами генной инженерии и несущих на своей поверхности искусственный рецептор заданной специфичности (chimeric antigen receptor, CAR). CAR представляет собой белок слияния и состоит из внеклеточного одноцепочечного вариабельного фрагмента иммуноглобулина scFv (single-chain Fv) и внутриклеточных сигнальных доменов Т-лимфоцитов [2]. В отличие от Т-клеточных рецепторов, которые узнают процессированные антигены в составе главного комплекса гистосовместимости, химерные Т-клеточные рецепторы нацелены на распознавание

поверхностных нативных (непроцессированных) антигенов, ассоциированных со злокачественной трансформацией клеток [3]. Несмотря на успешность CAR-терапии в лечении гемобластозов [4], ее применение для лечения солидных опухолей сталкивается с рядом проблем, одна из которых — присутствие опухолеассоциированных антигенов на поверхности клеток здоровой ткани и связанное с этим развитие нежелательных цитотоксических эффектов [5, 6]. Другая проблема состоит в том, что злокачественные опухоли гетерогенны и могут изменяться под воздействием иммунотерапии в результате селекции, которая приводит к отбору клеток со сниженной экспрессией таргетных антигенов. Кроме того, попав в опухоль, CAR-T-клетки оказываются в иммуносупрессивном опухолевом микроокружении, которое создают иммуносупрессивные клетки (регуляторные Т-клетки, опухолеассоциированные макрофаги, миелоидные супрессорные клетки), повышенная экспрессия ряда иммуносупрессивных молекул (среди которых можно выделить PD-L1, PD-L2, CD80, CD86), гипоксия, некроз, недостаток питательных веществ [7].

Для решения перечисленных проблем были предложены различные генно-инженерные подходы к модификации техники получения CAR-T-клеток [7–9]. Наиболее перспективны, на наш взгляд, два из них: 1) создание универсальных CAR, способных в ходе иммунотерапии переключаться и атаковать различные таргетные антигены; 2) повышение функциональной активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения. Данный обзор посвящен обсуждению генно-инженерных конструкций универсальных CAR и возможности модулирования противоопухолевой активности CAR-T-клеток путем подавления экспрессии ингибирующих рецепторов и повышения продукции цитокинов.

### Универсальные CAR с переключаемым адаптерным модулем

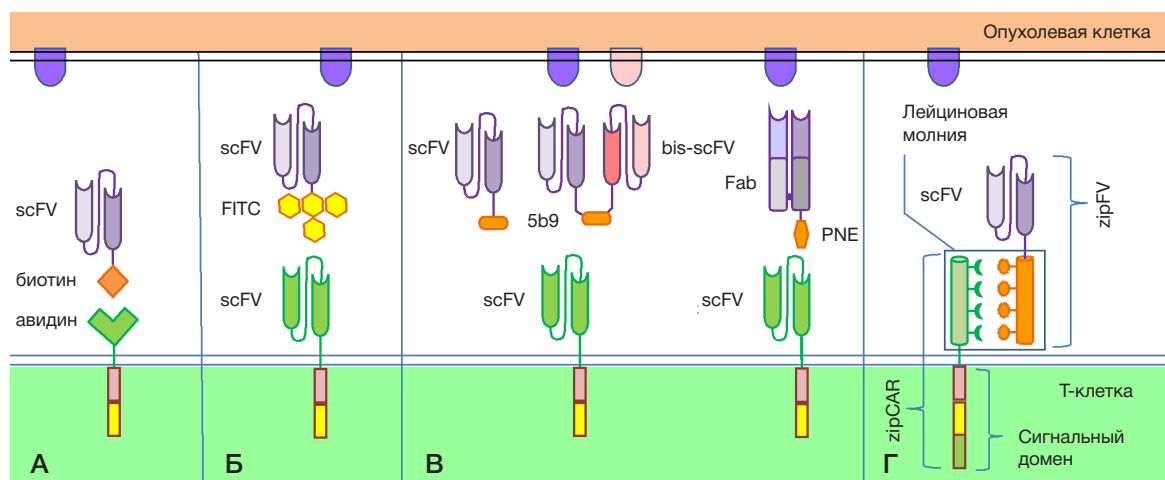
Поскольку классические (применяемые в настоящее время в клинической практике) CAR моноспецифичны, одной из важнейших проблем терапии с их применением является утрата опухоли в ходе лечения таргетных антигенов, узнаваемых CAR-T-клетками. Чтобы обойти трудоемкий и затратный процесс получения новых CAR-T-клеток другой специфичности, а также расширить число одновременно или последовательно атакуемых опухолевых антигенов-мишеней, был разработан новый модульный подход, особенностью которого является разобщение антигенраспознающего и сигнального доменов классического CAR. Антигенраспознающий адаптерный модуль представляет собой отдельную молекулу, узнаваемую эктодоменом CAR. Только при наличии трех составляющих — мишени, адаптерного модуля и эффекторной CAR-T-клетки — эта система будет работать. В результате такого разделения, во-первых, возможен контролируемый запуск CAR-T-клеток, во-вторых, их быстрое выключение в случае появления токсических побочных эффектов (например, синдром высвобождения цитокинов). И в-третьих, возможно более оперативное переключение CAR-терапии с одной мишени на другую, без необходимости привлечения генной инженерии и производства CAR-T-клеток с новой специфичностью. Такая модульная система может служить в качестве универсальной CAR-системы (UniCAR). В рамках обзора мы рассмотрим наиболее перспективные на сегодняшний день разработки универсальных CAR-систем.

### Модульная CAR-система с использованием биотинсвязывающих иммунорецепторов

Этот тип UniCAR-T-клеток в качестве универсального эктодомена использует авидин или стрептавидин (рис. 1А), который связывается с биотинилированными антигенспецифичными молекулами (MAT, ScFv и другими специфичными лигандами, распознающими таргетный антиген). Первая универсальная CAR-система была основана на использовании взаимодействия биотин-авидин [10]. Ее авторы показали, что Т-клетки, несущие биотинсвязывающий иммунный рецептор (biotin-binding immunoreceptor, BBIR), использующий в качестве эктодомена димер модифицированного авидина, способны связываться с опухолевыми клетками, предварительно обработанными биотинилированными антителами, активироваться и лизировать клетки-мишени. Поскольку биотин присутствует в плазме крови человека, авторами системы было также продемонстрировано, что даже сверхфизиологические концентрации биотина не вызывают антигеннезависимой активации модифицированных CAR-T-клеток и не ингибируют их активность. Еще один подход, использующий в качестве адаптеров биотинилированные антитела, был описан в другой работе [11]. В качестве эктодомена ее авторы применили высокоаффинный мономер стрептавида mSA2. Используя биотинилированный ритуксимаб (анти-CD20 MAT) в качестве CAR-адаптера, они показали *in vitro*, что модифицированные Т-клетки активируются и лизируют клетки-мишени дозозависимым образом. Однако вопрос о возможной иммуногенности авидина и стрептавида остается открытым и может ограничить терапевтическое применение UniCAR-T-клеток, использующих BBIR [10, 11].

### Модульная CAR-система с использованием флуоресцеина изотиоцианата

В данной системе (рис. 1Б) универсальный эктодомен CAR-T-клеток содержит вариабельный фрагмент scFv, направленный против синтетического флуорохрома флуоресцеина изотиоцианата (fluorescein isothiocyanate, FITC). FITC, широко используемый в качестве флуоресцентной метки для антител, в данном случае конъюгирован с моноклональными антителами (MAT), либо рецепторным лигандом, который взаимодействует



**Рис. 1.** Варианты универсальных CAR. **А.** Модульная CAR-система с использованием биотин-связывающих иммунорецепторов. **Б.** Модульная CAR-система с использованием флуоресцеина изотиоцианата. **В.** Модульные CAR-системы с использованием неоэпитопа (5b9, PNE). **Г.** Модульная CAR-система с использованием мотива лейциновой молнии (SUPRA CAR)



с таргетным антигеном на поверхности опухолевых клеток. В результате происходит формирование псевдоиммунологического синапса между анти-FITC-CAR-T-клеткой и опухолевой клеткой, экспрессирующей таргетный антиген. Т-клетки активируются и лизируют опухолевые клетки. В экспериментах на мышах линии NSG данная конструкция CAR-T-клеток была успешно использована против опухолей, экспрессирующих HER2 (рак молочной железы), CD20 (В-клеточная лимфома) и EGFR (рак поджелудочной железы) в сочетании с конъюгатами FITC с соответствующими МАТ (trastuzumab, rituximab и cetuximab) [12]. Как и в случае с UniCAR-T-клетками, использующими BBIR, вопрос об иммуногенности FITC остается открытым [12].

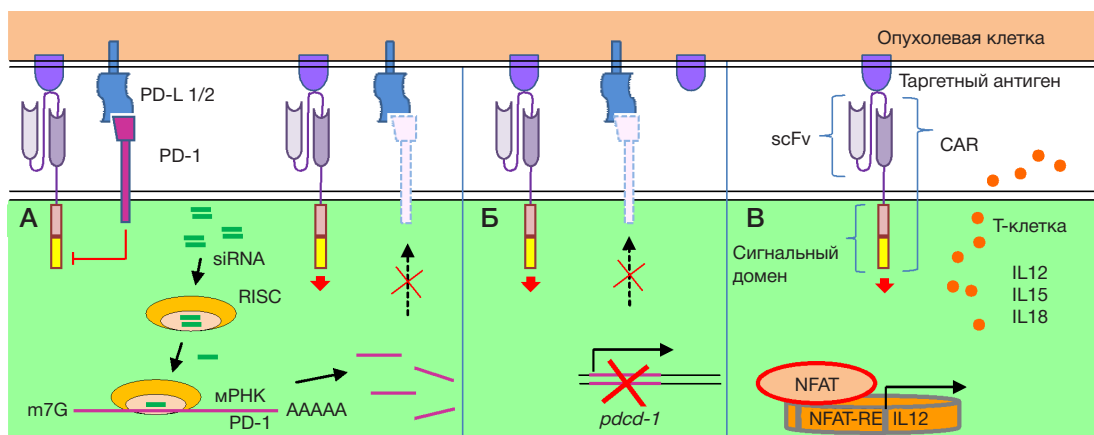
#### Модульные CAR-системы с использованием неоэпитопа

В данной системе адапторный модуль содержит неоэпитоп, который связан с антигенспецифичным scFv или Fab, а CAR состоит из эктодомена scFv, распознающего неоэпитоп, и внутриклеточного домена. Неоэпитопы являются экзогенными пептидами, которые отсутствуют у человека. В настоящее время разработаны две модульные системы, использующие неоэпитопы 5B9 и PNE (рис. 1B).

5B9 является неиммуногенным пептидом длиной 10 аминокислотных остатков. Его последовательность представляет пептидный мотив, обнаруживаемый в ядерном аутоантигене La/SS-B, характерном для синдрома Шегрена и системной красной волчанки [13]. Первоначально разработанная 5B9-специфичная UniCAR-система [14] была направлена против антигенов CD33 и CD123 клеток острого миелобластного лейкоза. При этом авторами были сконструированы как моно-, так и биспецифичные антигенраспознающие модули, соединенные с эпитопом 5B9. Тестирование показало высокую эффективность лизиса клеток-мишеней при применении как двух независимых модулей (scFv) одновременно, так и биспецифичного модуля (bis-scFv), причем последний оказался даже более эффективным. Было установлено, что антигенраспознающие модули могут эффективно индуцировать лизис даже при очень низких концентрациях, независимо от плотности антигена на клетках-мишенях

[14]. Позднее, эффективность 5B9-специфичной UniCAR-системы была исследована в отношении солидных опухолей, с использованием клеточной и животной моделей рака простаты [15]. В данном случае неоэпитоп 5B9 был связан с scFv, направленным против PSCA (prostate stem cell antigen) — антигена стволовой клетки простаты. На мышах линии NSG с высокой и низкой опухолевыми нагрузками применение 5B9-специфичной UniCAR-системы значительно отсрочило рост опухоли и повысило выживаемость. Интересно, что проведенный авторами анализ клеток после добавления адапторного модуля к сокультивируемым опухолевым клеткам и 5B9-специфичным UniCAR-T-клеткам выявил достоверное повышение экспрессии иммуносупрессирующих молекул PD-L1 и PD-L2 на опухолевых клетках и их рецептора PD-1 на эффекторных лимфоцитах по сравнению с контролем (без добавления адаптора) [15]. Позднее та же группа авторов [16] представила данные доклинических исследований об успешном совместном применении PSCA- и PSMA-специфичных (prostate specific membrane antigen) 5B9-модулей.

Второй пептид, использованный для создания UniCAR, содержащих неоэпитоп (рис. 1B), получен из транскрипционного фактора дрожжей GCN4 и назван PNE (peptide neo-epitope). PNE содержит 14 аминокислотных остатков, отсутствует в организме человека и, как можно ожидать на основе анализа *in silico*, должен обладать низкой иммуногенностью. Разработанные в одном из исследований адапторные модули содержали PNE, связанный с Fab-фрагментом терапевтических антител, специфичных к CD19 или CD20 [17]. Универсальный эктодомен CAR содержал scFv высокоспецифичных МАТ 52SR4, узнающих PNE. Используя мышиную модель ксенотрансплантата В-клеточной лейкемии, авторы показали дозозависимый контроль активности UniCAR-T-клеток и их тканевой локализации в местах скопления опухолевых клеток, а также секреции цитокинов [17]. Интересно, что применение высоких доз адапторных модулей приводило к экспансии клеток с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (TEMRA, terminal effector memory expressing CD45RA<sup>+</sup>), в то время как при применении низких доз превалировал фенотип CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (central



**Рис. 2.** Схематическая иллюстрация модуляции противоопухолевой активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения. **А.** Подавление экспрессии гена *pdcd-1* в Т-лимфоцитах с помощью трансфекции siRNA. Взаимодействие рецептора PD-1 со своими лигандами PD-L1/2 ингибирует активирующий сигнал CAR. После трансфекции клеток дуплексы siRNA взаимодействуют с RISC-связывающим комплексом (PHK-индуцируемый комплекс выключения гена, RNA-induced silencing complex, RISC), одна из нитей PHK удаляется из комплекса, а вторая в составе RISC связывается с мРНК, инициируя ее деградацию. В результате экспрессия рецептора PD-1 на поверхности клетки снижается. **Б.** Нокаут гена *pdcd-1* с использованием метода геномного редактирования CRISPR/Cas9. **В.** TRUCKS: помимо CAR, в Т-клетки вводят плазмиду, содержащую последовательности элементов отклика NFAT (NFAR-RE, NFAT responsive element) и последовательности генов IL12, IL15 или IL18. При взаимодействии CAR с таргетным антигеном Т-лимфоцит активируется. Это приводит к дефосфорилированию транскрипционного фактора NFAT, который перемещается в ядро и, связываясь с NFAR-RE, запускает синтез кодируемого цитокина. Локальная секреция цитокина инициирует иммунный ответ против опухолевых клеток, «невидимых» для CAR-T-лимфоцитов

memory cells). Последний, как известно, ассоциирован с пролонгированной персистенцией CAR-T-клеток и коррелирует со стойкой ремиссией у пациентов с острым лимфобластным лейкозом и хронической лимфоцитарной лейкемией [18]. Эта же группа разработала UniCAR-систему с использованием PNE, направленную против HER2-экспрессирующих клеток опухоли молочной железы [19]. В качестве антигенраспознающей части адапторного модуля использовали Fab-фрагмент mAb trastuzumab (clone 4D5). Был продемонстрирован дозозависимый цитотоксический эффект *in vitro* и полное исчезновение опухолевых очагов у мышей линии NSG, подкожно привитых клеточными линиями опухоли молочной железы с разной степенью экспрессии HER2 [19].

*SUPRA CAR — модульная CAR-система с использованием мотива лейциновой молнии*

Одна из наиболее перспективных разработок универсальных CAR [20] (рис. 1Г) носит название SUPRA CAR (split, universal and programmable — разделяемая, универсальная и программируемая). Эта двухкомпонентная система использует для взаимодействия своих компонентов белковый мотив лейциновой молнии (leucine zipper). Она состоит из универсального рецептора (zipCAR), экспрессируемого на поверхности Т-клеток, и противоопухолевого scFv-адаптора (zipFv). Универсальный рецептор zipCAR образован путем слияния внутриклеточных сигнальных доменов (CD28, 4-1BB и CD3z) и эктодомена, содержащего мотив лейциновой молнии. Адапторный модуль zipFv состоит из антигенспецифичного scFv и тоже содержит мотив лейциновой молнии, что обеспечивает его взаимодействие с zipCAR и последующую активацию Т-клетки. Такая конструкция, в отличие от обычных CAR со строго заданной специфичностью, позволяет выбрать в качестве мишени разные антигены без дополнительных манипуляций с иммунными клетками пациента. Уникальным свойством SUPRA CAR является также возможность настройки многих параметров, способных модулировать ответ Т-клеток и, в частности, предотвратить их чрезмерную активацию. Показано, что, варьируя такие параметры, как: 1) аффинность между мотивами лейциновой молнии, 2) аффинность между опухолевым антигеном и scFv, 3) концентрация zipFv и 4) уровень экспрессии zipCAR, можно влиять на функциональную активность Т-клеток (в частности, на продукцию интерферона гамма) [20]. В случае развития у пациента такого побочного эффекта CAR-терапии как «цитокиновый шторм», активность SUPRA-CAR-T-клеток может быть снижена или полностью подавлена добавлением конкурентного низко- или высокоаффинного адаптора zipFv. Адаптер может димеризоваться с доменом лейциновой молнии специфичного zipFv, уже введенного в организм пациента, и, таким образом, препятствовать его связыванию с zipCAR. Кроме того, с помощью данной системы можно реализовать такие логические операции, как «А или В», «А и не В». Первую используют в случае необходимости атаки CAR-T-клетками опухолевых клеток, несущих два таргетных антигена и реализуют простым добавлением двух zipFv-адаптеров, специфичных для двух мишеней и связывающихся с zipCAR. Реализация второй логической операции позволяет ослабить нежелательное цитотоксическое действие против нормальных клеток, экспрессирующих опухолевый антиген. На примере двух опухолевых антигенов авторами показана принципиальная возможность сохранить живыми клетки, несущие два

таргетных антигена, один из которых опухолевый, а второй — неопухолевый [20]. Это можно реализовать путем добавления адаптера zipFv, специфичного к неопухолевому антигену, но конкурирующего с zipCAR за связывание с доменом лейциновой молнии адаптера zipFv, специфичного к опухолевому антигену. Связываясь с клеткой-мишенью, адаптеры формируют димеры, и zipFv, специфичный к опухолевому антигену, уже не может взаимодействовать с zipCAR. В результате формируется слабый цитотоксический ответ Т-клеток в отношении нормальных клеток. Было показано, что использование SUPRA-CAR-T-клеток позволяет контролировать рост опухоли в мышцах линии NSG как при внутрибрюшинном введении клеток опухоли молочной железы SK-BR-3, так и при внутривенном введении клеток линии Jurkat [20]. С целью снижения иммуногенности данной системы авторы гуманизировали последовательности факторов транскрипции человека [20].

### **Модулирование противоопухолевой активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения**

Иммуносупрессивное микроокружение солидных опухолей является одним из основных факторов, препятствующих эффективной CAR-терапии. Вкупе с экспрессией ингибирующих рецепторов на поверхности CAR-T-клеток оно негативно сказывается на эффективности последних [21]. Среди ингибирующих рецепторов можно особо выделить PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели) и CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическим Т-лимфоцитом антиген 4). На сегодняшний день их рассматривают в качестве ведущих иммунных регуляторов, с помощью которых можно осуществлять контроль активации Т-клеток и поддерживать периферическую толерантность [7, 22]. CTLA-4, взаимодействуя с CD80/86, ингибирует потенциально аутореактивные Т-клетки на начальной стадии активации наивных Т-клеток, чаще всего в лимфоузлах [23], тогда как PD1, связываясь с PD-L1/2, участвует в регуляции уже ранее активированных клеток на более поздних этапах иммунного ответа, действуя прежде всего в периферических тканях [24]. Опухолевые клетки, экспрессирующие на своей поверхности соответствующие лиганды, могут использовать эти рецепторы для ингибирования опухолеспецифичных лимфоцитов, в том числе CAR-T-лимфоцитов, в результате чего приобретают устойчивость к воздействию иммунной системы [22, 25]. Следует особо отметить, что при адоптивной иммунотерапии используют активированные Т-лимфоциты. Активация Т-лимфоцитов приводит к повышению экспрессии рецепторов PD-1 и CTLA-4, что делает клетки еще более чувствительными к иммуносупрессивному эффекту опухоли [25].

Одним из подходов к блокировке нежелательного взаимодействия рецептор-лиганд является использование mAb, специфичных к рецептору или лиганду [26]. С 2011 г. в США в клинической практике для терапии метастазирующей меланомы используют ипилимумаб — mAb, блокирующие CTLA-4 [27]. Данные клинических испытаний показали также эффективность иммунотерапии ингибиторами PD-1 и PD-L1 у пациентов с меланомой [28]. Следует отметить, что комбинированное использование препаратов анти-PD-1 (ниволумаб) и анти-CTLA-4 (ипилимумаб) у пациентов с меланомой, не получавших ранее лечение, повышало выживаемость без прогрессирования заболевания и частоту объективного ответа, по сравнению с монотерапией



[29]. К настоящему времени зарегистрирован целый ряд анти-мАТ (ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), применяющихся при меланоме, немелкоклеточном раке легкого, раке мочевого пузыря и других нозологиях [27]. Однако использование данных препаратов привело к появлению целого класса новых побочных эффектов — иммуноопосредованных побочных эффектов (immune-related adverse events), к которым относят иммунный тиреоидит, гепатит, колит, миокардит и ряд других [30]. Очевидно, что иммуноопосредованные побочные эффекты обусловлены неспецифической активацией иммунокомпетентных клеток, что серьезно ограничивает возможности применения этих препаратов [30].

Альтернативным подходом к модификации функциональной активности CAR-T-лимфоцитов является снижение экспрессии на Т-лимфоцитах ингибирующих рецепторов с помощью генетической модификации клеток *ex vivo* в дополнение к введению антиген-специфичного CAR-рецептора. Это может быть сделано либо с помощью трансфекции siRNA (small interfering RNA) в Т-клетки (рис. 2А) одновременно с введением ДНК- или РНК-конструкции, кодирующей антиген-специфичный рецептор [22], либо используя методы геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 [31] (рис. 2Б). Так, было показано, что экспрессию мРНК CTLA-4 можно успешно подавить с помощью siRNA-технологии в лимфоцитах периферической крови больных хроническим гепатитом В [32]. Следует, однако, отметить, что специфичных CAR-рецепторов в клетки при этом не вводили. Недавно было показано, что трансфекция Т-клеток мРНК, кодирующей CAR-рецептор второго поколения, специфичный к антигену CSPG4 меланомы, и двумя siRNA, ингибирующими PD-1 и CTLA-4, приводила к снижению уровня поверхностного PD-1 и внутриклеточного CTLA-4 Т-лимфоцитов [25]. Авторы наблюдали статистически достоверное увеличение цитотоксического эффекта модифицированных Т-лимфоцитов в сравнении с контролем в отношении модельной клеточной линии меланомы (трансфецированной плазмидами, кодирующими PD-L1 и CD80) [25]. Метод геномного редактирования с использованием технологии CRISPR/Cas9 также был недавно применен для подавления экспрессии PD-1 и CTLA-4 [31, 33]. Технологию CRISPR/Cas9 можно успешно использовать для инактивации гена, кодирующего PD-1, в CAR-T-лимфоцитах, что проявлялось в значительном усилении их противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo* [33]. Было показано, что три гена (включая PD-1) [31] и четыре гена (включая PD-1 и CTLA-4) [34] могут быть одновременно инактивированы в CAR-T-лимфоцитах с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Другим подходом к преодолению иммуносупрессивности опухолевого микроокружения, а также для атаки опухолевых клеток, утративших таргетный антиген на своей поверхности, является придание CAR-T-лимфоцитам способности к повышенной продукции цитокинов непосредственно в тканях-мишенях (при их активации через взаимодействие CAR с клетками-мишенями). Такие модифицированные цитокин-продуцирующие CAR-T-клетки, получившие название «TRUCK» (T cells redirected for universal cytokine killing) [35] (рис. 2Б), показали высокую эффективность при доставке цитокинов в опухолевое микроокружение. В доклинических исследованиях на мышинных моделях при адоптивном переносе опухолеспецифичных клеток, секретирующих IL12, показано, что накопление его в ткани опухоли усиливает Т-клеточную цитолитическую активность [36] и способствует привлечению и активации клеток

врожденного иммунитета [37]. Показано также, что секреция IL12 локально влияет на миелоидные супрессорные клетки, дисфункциональные дендритные клетки, альтернативно активированные макрофаги и перепрограммирует их в функционально активные антигенпрезентирующие клетки, способные представлять опухолессоциированные антигены Т-клеткам, инфильтрирующим опухоль, или TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), что приводит к регрессии больших опухолевых очагов [38]. Клинические испытания по введению пациентам с метастатической меланомой аутологичных TIL, экспрессирующих IL12 под контролем NFAT-регуляторных элементов (nuclear factor of activated T-cells, ядерный фактор активированных Т-клеток), показали объективный клинический эффект у 10 из 16 пациентов при более низкой дозе клеток по сравнению со стандартным протоколом [39]. Однако у многих из пациентов наблюдали серьезные побочные эффекты (тяжелую гепатотоксичность, гемодинамическую нестабильность), вследствие чего испытания были остановлены [39]. Выраженная цитотоксичность TCR-T-клеток с NFAT-регулируемой экспрессией IL12 выявлена *in vivo* в экспериментах на мышинной модели [40]. Положительного результата (отсутствия токсичности *in vivo*) удалось добиться другим авторам [41], поставившим экспрессию IL12 под контроль TET-On-промотора, чувствительного к доксициклину. Временной экспрессии IL12 было достаточно, чтобы ингибировать рост меланомы B16F10, не вызывая системной цитотоксичности.

Наряду с IL12 исследовали влияние повышенной секреции интерлейкинов IL15 и IL18 на противоопухолевую активность CAR-T- и TCR-T-лимфоцитов. Показано, что продукция IL15 способствует выживанию и пролиферации модифицированных *ex vivo* CAR-T-клеток, специфичных к таким мишеням, как CD19 (при лейкемии/лимфоме) [42] и IL13Rα2 (при глиобластоме) [43]. В экспериментах на мышинной модели меланомы введение модифицированных TCR-T-клеток с NFAT-регулируемой экспрессией IL18 показало их безопасность (отсутствовали какие-либо побочные токсические эффекты), а также привело к повышению числа CD8-клеток в опухолевом очаге и усилению противоопухолевой активности [40]. Показано, что CD4-CAR-T-клетки, секретирующие IL18, активируют CD8-T-клетки, которые пролиферируют и усиливают противоопухолевый ответ у мышей с меланомой B16F10 [44]. Кроме того показано, что CAR-T-клетки, секретирующие IL18, индуцируют в опухоли острую фазу иммунного ответа по Th1-типу, что приводит к повышению выживаемости мышей с опухолями поджелудочной железы и легких [45].

## ВЫВОДЫ

На сегодняшний день CAR-терапию успешно применяют в клинической практике для лечения гематологических онкозаболеваний. Однако простая экстраполяция опыта использования CAR в терапии гемобластозов на солидные опухоли невозможна в связи с вероятностью возникновения непереносимых побочных эффектов из-за токсичности CAR-T-лимфоцитов в отношении нормальных клеток, а также ослаблением функциональной активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей. В настоящее время наметились пути решения этих проблем, такие как создание универсальных CAR, способных быстро переключаться и атаковать различные таргетные антигены, и придание CAR-T-клеткам

устойчивости к иммуносупрессивному влиянию путем их дальнейшей модификации генно-инженерными методами. Интенсивные исследования, проводимые в этих двух направлениях, показывают обнадеживающие результаты,

что позволяет надеяться на появление арсенала CAR-T-клеток, способного обеспечить эффективную и безопасную для пациентов клеточную терапию солидных злокачественных новообразований.

## Литература

- Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016; 164 (6): 1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049. PubMed PMID: 26967289; PubMed Central PMCID: PMC4788788.
- Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010; 116 (7): 1035–44. DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737. PubMed PMID: 20439624; PubMed Central PMCID: PMC2938125.
- Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature medicine*. 2016; 22 (1): 26–36. DOI: 10.1038/nm.4015. PubMed PMID: 26735408; PubMed Central PMCID: PMC6295670.
- Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016; 127 (26): 3312–20. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063. PubMed PMID: 27207800; PubMed Central PMCID: PMC4929923.
- Liu B, Yan L, Zhou M. Target selection of CAR T cell therapy in accordance with the TME for solid tumors. *American journal of cancer research*. 2019; 9 (2): 228–41. PubMed PMID: 30906625; PubMed Central PMCID: PMC6405971.
- Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics*. 2016; (3): 16011. DOI: 10.1038/mto.2016.11. PubMed PMID: 27626062; PubMed Central PMCID: PMC5008265.
- Tahmasebi S, Elahi R, Esmailzadeh A. Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering. *Stem cell reviews and reports*. 2019; 15 (5): 619–36. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7. PubMed PMID: 31161552.
- Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Frontiers in oncology*. 2019; (9): 176. DOI: 10.3389/fonc.2019.00176. PubMed PMID: 30984613; PubMed Central PMCID: PMC6448045.
- Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells*. 2019; 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050472. PubMed PMID: 31108883; PubMed Central PMCID: PMC6562702.
- Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer research*. 2012; 72 (7): 1844–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890. PubMed PMID: 22315351; PubMed Central PMCID: PMC3319867.
- Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1368604. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1368604. PubMed PMID: 29296519; PubMed Central PMCID: PMC5739565.
- Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18 (23): 6436–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449. PubMed PMID: 23032741.
- Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Bippes CC, Feldmann A, Michalk I, et al. Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B. *Journal of autoimmunity*. 2013; (42): 105–16. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.01.002. PubMed PMID: 23352111.
- Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood cancer journal*. 2016; 6 (8): e458. DOI: 10.1038/bcj.2016.61. PubMed PMID: 27518241; PubMed Central PMCID: PMC5022178 directed to CD33, La and the UniCAR platform technology. AE, SL and MC are employed by GEMoAB and CPT, respectively. The other authors declare no conflict of interest.
- Pishali Bejestani E, Cartellieri M, Bergmann R, Ehninger A, Loff S, Kramer M, et al. Characterization of a switchable chimeric antigen receptor platform in a pre-clinical solid tumor model. *Oncoimmunology*. 2017; 6 (10): e1342909. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1342909. PubMed PMID: 29123951; PubMed Central PMCID: PMC5665068.
- Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, Loff S, Cartellieri M, Bachmann D, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget*. 2017; 8 (19): 31368–85. DOI: 10.18632/oncotarget.15572. PubMed PMID: 28404896; PubMed Central PMCID: PMC5458214.
- Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (4): E459–68. DOI: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369; PubMed Central PMCID: PMC4743815.
- Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer journal*. 2014; 20 (2): 141–4. DOI: 10.1097/PPO.000000000000036. PubMed PMID: 24667960; PubMed Central PMCID: PMC4149222.
- Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, Ma JS, et al. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer. *Angewandte Chemie*. 2016; 55 (26): 7520–4. DOI: 10.1002/anie.201601902. PubMed PMID: 27145250; PubMed Central PMCID: PMC5207029.
- Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 2018; 173 (6): 1426–38. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.038. PubMed PMID: 29706540; PubMed Central PMCID: PMC5984158.
- Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017; (5): 28. DOI: 10.1186/s40425-017-0230-9. PubMed PMID: 28331617; PubMed Central PMCID: PMC5359946.
- Sioud M. Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2019; 11 (2). DOI: 10.3390/cancers11020176. PubMed PMID: 30717461.
- Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbone F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016; 13 (8): 473–86. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.58. PubMed PMID: 27141885.
- Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskova S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016; 165 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PubMed PMID: 26997480; PubMed Central PMCID: PMC4808437.
- Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, et al. The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Experimental dermatology*. 2018; 27 (7): 769–78. DOI: 10.1111/exd.13678. PubMed PMID: 29704887.
- Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019; (10): 128. DOI:

- 10.3389/fimmu.2019.00128. PubMed PMID: 30804938; PubMed Central PMCID: PMC6370640.
27. Vivot A, Jacot J, Zeitoun JD, Ravaud P, Crequit P, Porcher R. Clinical benefit, price and approval characteristics of FDA-approved new drugs for treating advanced solid cancer, 2000–2015. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017; 28 (5): 1111–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx053. PubMed PMID: 28453694.
28. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immuno-Oncology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*. 2016; 36 (3): 317–34. DOI: 10.1002/phar.1714. PubMed PMID: 26822752; PubMed Central PMCID: PMC5071694.
29. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015; 373 (1): 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431; PubMed Central PMCID: PMC5698905.
30. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*. 2018; 378 (2): 158–68. DOI: 10.1056/NEJMra1703481. PubMed PMID: 29320654.
31. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017; 23 (9): 2255–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. PubMed PMID: 27815355; PubMed Central PMCID: PMC5413401.
32. Yu Y, Wu H, Tang Z, Zang G. CTLA4 silencing with siRNA promotes deviation of Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients. *Cellular & molecular immunology*. 2009; 6 (2): 123–7. DOI: 10.1038/cmi.2009.17. PubMed PMID: 19403062; PubMed Central PMCID: PMC4002649.
33. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8. PubMed PMID: 28389661; PubMed Central PMCID: PMC5428439.
34. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017; 8 (10): 17002–11. DOI: 10.18632/oncotarget.15218. PubMed PMID: 28199983; PubMed Central PMCID: PMC5370017.
35. Knochelmann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Frontiers in immunology*. 2018; (9): 1740. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01740. PubMed PMID: 30140266; PubMed Central PMCID: PMC6094980.
36. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer research*. 2010; 70 (17): 6725–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0735. PubMed PMID: 20647327; PubMed Central PMCID: PMC2935308.
37. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012; 119 (18): 4133–41. DOI: 10.1182/blood-2011-12-400044. PubMed PMID: 22354001; PubMed Central PMCID: PMC3359735.
38. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (12): 4746–57. DOI: 10.1172/JCI58814. PubMed PMID: 22056381; PubMed Central PMCID: PMC3226001.
39. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015; 21 (10): 2278–88. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2085. PubMed PMID: 25695689; PubMed Central PMCID: PMC4433819.
40. Kunert A, Chmielewski M, Wijers R, Berrevoets C, Abken H, Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1378842. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1378842. PubMed PMID: 29296541; PubMed Central PMCID: PMC5739571.
41. Alsaieedi A, Holler A, Velica P, Bendle G, Stauss HJ. Safety and efficacy of Tet-regulated IL12 expression in cancer-specific T cells. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (3): 1542917. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1542917. PubMed PMID: 30723575; PubMed Central PMCID: PMC6350686.
42. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24 (6): 1160–70. DOI: 10.1038/leu.2010.75. PubMed PMID: 20428207; PubMed Central PMCID: PMC2888148.
43. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antitumor Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer immunology research*. 2017; 5 (7): 571–81. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0376. PubMed PMID: 28550091; PubMed Central PMCID: PMC5746871.
44. Hu B, Ren J, Luo Y, Keith B, Young RM, Scholler J, et al. Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL18. *Cell reports*. 2017; 20 (13): 3025–33. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.002. PubMed PMID: 28954221; PubMed Central PMCID: PMC6002762.
45. Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell reports*. 2017; 21 (11): 3205–19. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.063. PubMed PMID: 29241547.

## References

1. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016; 164 (6): 1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049. PubMed PMID: 26967289; PubMed Central PMCID: PMC4788788.
2. Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010; 116 (7): 1035–44. DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737. PubMed PMID: 20439624; PubMed Central PMCID: PMC2938125.
3. Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature medicine*. 2016; 22 (1): 26–36. DOI: 10.1038/nm.4015. PubMed PMID: 26735408; PubMed Central PMCID: PMC6295670.
4. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016; 127 (26): 3312–20. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063. PubMed PMID: 27207800; PubMed Central PMCID: PMC4929923.
5. Liu B, Yan L, Zhou M. Target selection of CAR T cell therapy in accordance with the TME for solid tumors. *American journal of cancer research*. 2019; 9 (2): 228–41. PubMed PMID: 30906625; PubMed Central PMCID: PMC6405971.
6. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics*. 2016; (3): 16011. DOI: 10.1038/mto.2016.11. PubMed PMID: 27626062; PubMed Central PMCID: PMC5008265.
7. Tahmasebi S, Elahi R, Esmaeilzadeh A. Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering. *Stem cell reviews and reports*. 2019; 15 (5): 619–36. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7. PubMed PMID: 31161552.



8. Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Frontiers in oncology*. 2019; (9): 176. DOI: 10.3389/fonc.2019.00176. PubMed PMID: 30984613; PubMed Central PMCID: PMC6448045.
9. Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells*. 2019; 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050472. PubMed PMID: 31108883; PubMed Central PMCID: PMC6562702.
10. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer research*. 2012; 72 (7): 1844–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890. PubMed PMID: 22315351; PubMed Central PMCID: PMC3319867.
11. Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1368604. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1368604. PubMed PMID: 29296519; PubMed Central PMCID: PMC5739565.
12. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18 (23): 6436–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449. PubMed PMID: 23032741.
13. Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Bippes CC, Feldmann A, Michalk I, et al. Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B. *Journal of autoimmunity*. 2013; (42): 105–16. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.01.002. PubMed PMID: 23352111.
14. Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood cancer journal*. 2016; 6 (8): e458. DOI: 10.1038/bcj.2016.61. PubMed PMID: 27518241; PubMed Central PMCID: PMC5022178 directed to CD33, La and the UniCAR platform technology. AE, SL and MC are employed by GEMoA and CPT, respectively. The other authors declare no conflict of interest.
15. Pishali Bejestani E, Cartellieri M, Bergmann R, Ehninger A, Loff S, Kramer M, et al. Characterization of a switchable chimeric antigen receptor platform in a pre-clinical solid tumor model. *Oncoimmunology*. 2017; 6 (10): e1342909. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1342909. PubMed PMID: 29123951; PubMed Central PMCID: PMC5665068.
16. Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, Loff S, Cartellieri M, Bachmann D, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget*. 2017; 8 (19): 31368–85. DOI: 10.18632/oncotarget.15572. PubMed PMID: 28404896; PubMed Central PMCID: PMC5458214.
17. Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (4): E459–68. DOI: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369; PubMed Central PMCID: PMC4743815.
18. Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer journal*. 2014; 20 (2): 141–4. DOI: 10.1097/PPO.000000000000036. PubMed PMID: 24667960; PubMed Central PMCID: PMC4149222.
19. Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, Ma JS, et al. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer. *Angewandte Chemie*. 2016; 55 (26): 7520–4. DOI: 10.1002/anie.201601902. PubMed PMID: 27145250; PubMed Central PMCID: PMC5207029.
20. Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 2018; 173 (6): 1426–38. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.038. PubMed PMID: 29706540; PubMed Central PMCID: PMC5984158.
21. Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017; (5): 28. DOI: 10.1186/s40425-017-0230-9. PubMed PMID: 28331617; PubMed Central PMCID: PMC5359946.
22. Sioud M. Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2019; 11 (2). DOI: 10.3390/cancers11020176. PubMed PMID: 30717461.
23. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016; 13 (8): 473–86. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.58. PubMed PMID: 27141885.
24. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskova S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016; 165 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PubMed PMID: 26997480; PubMed Central PMCID: PMC4808437.
25. Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, et al. The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Experimental dermatology*. 2018; 27 (7): 769–78. DOI: 10.1111/exd.13678. PubMed PMID: 29704887.
26. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019; (10): 128. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00128. PubMed PMID: 30804938; PubMed Central PMCID: PMC6370640.
27. Vivot A, Jacot J, Zeitoun JD, Ravaud P, Crequit P, Porcher R. Clinical benefit, price and approval characteristics of FDA-approved new drugs for treating advanced solid cancer, 2000–2015. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017; 28 (5): 1111–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx053. PubMed PMID: 28453694.
28. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immuno-Oncology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*. 2016; 36 (3): 317–34. DOI: 10.1002/phar.1714. PubMed PMID: 26822752; PubMed Central PMCID: PMC5071694.
29. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015; 373 (1): 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431; PubMed Central PMCID: PMC5698905.
30. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*. 2018; 378 (2): 158–68. DOI: 10.1056/NEJMra1703481. PubMed PMID: 29320654.
31. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017; 23 (9): 2255–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. PubMed PMID: 27815355; PubMed Central PMCID: PMC5413401.
32. Yu Y, Wu H, Tang Z, Zang G. CTLA4 silencing with siRNA promotes deviation of Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients. *Cellular & molecular immunology*. 2009; 6 (2): 123–7. DOI: 10.1038/cmi.2009.17. PubMed PMID: 19403062; PubMed Central PMCID: PMC4002649.
33. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8. PubMed PMID: 28389661; PubMed Central PMCID: PMC5428439.
34. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017; 8 (10): 17002–11. DOI: 10.18632/oncotarget.15218. PubMed PMID: 28199983; PubMed Central PMCID: PMC5370017.
35. Knochelmann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Frontiers in immunology*. 2018; (9): 1740. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01740. PubMed PMID: 30140266; PubMed Central PMCID: PMC6094980.

36. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer research*. 2010; 70 (17): 6725–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0735. PubMed PMID: 20647327; PubMed Central PMCID: PMC2935308.
37. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012; 119 (18): 4133–41. DOI: 10.1182/blood-2011-12-400044. PubMed PMID: 22354001; PubMed Central PMCID: PMC3359735.
38. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (12): 4746–57. DOI: 10.1172/JCI58814. PubMed PMID: 22056381; PubMed Central PMCID: PMC3226001.
39. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015; 21 (10): 2278–88. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2085. PubMed PMID: 25695689; PubMed Central PMCID: PMC4433819.
40. Kunert A, Chmielewski M, Wijers R, Berrevoets C, Abken H, Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1378842. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1378842. PubMed PMID: 29296541; PubMed Central PMCID: PMC5739571.
41. Alsaieedi A, Holler A, Velica P, Bendle G, Stauss HJ. Safety and efficacy of Tet-regulated IL12 expression in cancer-specific T cells. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (3): 1542917. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1542917. PubMed PMID: 30723575; PubMed Central PMCID: PMC6350686.
42. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24 (6): 1160–70. DOI: 10.1038/leu.2010.75. PubMed PMID: 20428207; PubMed Central PMCID: PMC2888148.
43. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer immunology research*. 2017; 5 (7): 571–81. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0376. PubMed PMID: 28550091; PubMed Central PMCID: PMC5746871.
44. Hu B, Ren J, Luo Y, Keith B, Young RM, Scholler J, et al. Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL18. *Cell reports*. 2017; 20 (13): 3025–33. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.002. PubMed PMID: 28954221; PubMed Central PMCID: PMC6002762.
45. Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell reports*. 2017; 21 (11): 3205–19. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.063. PubMed PMID: 29241547.



## СОГЛАСОВАННАЯ ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНОГО IGE И ЧИСЛЕННОСТИ IGE<sup>+</sup>-КЛОНОТИПОВ С УРОВНЕМ ПЫЛЬЦЫ В ВОЗДУХЕ ПРИ ПОЛЛИНОЗЕ

А. И. Микелов<sup>1,2</sup>, Д. Б. Староверов<sup>2</sup>, Е. А. Комеч<sup>2,3</sup>, Ю. Б. Лебедев<sup>2,3</sup>, Д. М. Чудаков<sup>1,2,3</sup>, И. В. Звягин<sup>2,3</sup>✉

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Механизмы поддержания иммунологической памяти, обуславливающей хроническое течение сезонного аллергического ринита у человека, слабо изучены. Рациональный дизайн новых подходов к терапии аллергических заболеваний требует детального понимания этих механизмов. Известно, что уровень аллергенспецифичных антител класса IgE (sIgE), являющихся ключевым агентом в развитии данного заболевания, повышен у пациентов с поллинозом в период цветения. Целью работы было изучить динамику сыровоточного уровня IgE и характеристик клонального репертуара IgE-секретирующих лимфоцитов в зависимости от интенсивности контакта пациента с аллергеном. Для трех пациентов (22, 22 и 28 лет) с аллергией на березовую пыльцу были измерены уровни общего IgE и sIgE к березовой пыльце в 6 временных точках с интервалом в 2 недели, включая период пыления березы. Для одного донора получены данные о клональном репертуаре генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH) субпопуляций В-клеточного ряда. Приrost уровня sIgE в период пыления составил 91%, 37% и 64% по сравнению с исходным у трех доноров. Момент начала роста уровня sIgE и общего IgE и его динамика согласуются с ростом концентрации аллергена (sIgE:  $R^2 = 0,98$  при  $p < 0,05$ ; IgE общий:  $R^2 = 0,95$  при  $p < 0,05$ ). IgE-клонотипы обнаружены только в образцах, взятых в период цветения березы, что свидетельствует о росте их концентрации в этот период. Доля IgE-клонотипов оказалась крайне низкой по сравнению с клонотипами других изотипов (IgE — 0,01%, IgM — 48,4%, IgD — 14%, IgG — 17,4%, IgA — 19,8%). Оценка числа гипермутаций и филогенетический анализ последовательностей внутри 13 обнаруженных IgE-содержащих клональных групп показали возможность происхождения IgE-клонотипов из IgG в результате смены изотипа.

**Ключевые слова:** аллергический риноконъюнктивит, аллергенспецифичный IgE, пыльца березы, сезонная динамика, клональный репертуар иммуноглобулинов

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант МК6000.2018.4).

**Благодарности:** выражаем большую признательность всем донорам, принявшим участие в исследовании.

**Информация о вкладе авторов:** А. И. Микелов — определение уровня антител, подготовка библиотек кДНК IGH, анализ данных секвенирования и полученных результатов, дизайн исследования, подготовка рукописи; Д. Б. Староверов — выделение клеточных субпопуляций с помощью проточной цитофлюорометрии; Е. А. Комеч — сбор образцов крови, выделение клеточных субпопуляций с помощью проточной цитофлюорометрии; Ю. Б. Лебедев — анализ и обсуждение полученных результатов, консультативная поддержка; Д. М. Чудаков — анализ и обсуждение полученных результатов, консультативная поддержка подготовки библиотек кДНК; И. В. Звягин — подготовка библиотек кДНК IGH, анализ данных секвенирования и полученных результатов, дизайн исследования, подготовка рукописи, организация исследования.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено в полном соответствии с требованиями Хельсинской декларации 2013 г.; все доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Забор образцов крови выполнен квалифицированным медицинским персоналом в сертифицированных кабинетах компании «ИНВИТРО».

✉ **Для корреспонденции:** Иван Владимирович Звягин  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; izvyagin@gmail.com

**Статья получена:** 09.10.2019 **Статья принята к печати:** 23.10.2019 **Опубликована онлайн:** 31.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.072

## CORRELATED DYNAMICS OF SERUM IGE AND IGE<sup>+</sup> CLONOTYPE COUNT WITH ALLERGEN AIR LEVEL IN SEASONAL ALLERGIC RHINITIS

Mikelov AI<sup>1,2</sup>, Staroverov DB<sup>2</sup>, Komech EA<sup>2,3</sup>, Lebedev YB<sup>2,3</sup>, Chudakov DM<sup>1,2,3</sup>, Zvyagin IV<sup>2,3</sup>✉

<sup>1</sup> Skoltech, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Mechanisms of maintenance of immunological memory in the chronic course of seasonal allergic rhinitis remain poorly understood. The detailed understanding of these mechanisms is required for design of new approaches for allergy treatment. It is known that the level of allergen-specific IgE antibodies (sIgE), which play a key role in the development of the disease, is increased in patients with seasonal allergic rhinitis during pollination season. This study aimed to investigate the dynamics of serum IgE levels and characteristics of the clonal repertoire of IgE-secreting lymphocytes depending on the intensity of the patient's contact with the allergen. For three patients, allergic to birch pollen (22, 22, and 28 y.o.), we measured total IgE and birch pollen specific IgE levels at 6 time points with 2 week interval during the birch pollination season. Immunoglobulin heavy chain gene (IGH) clonal repertoire data for several B-cell subpopulations at different time points were obtained for one patient. We observe growth of the sIgE level (91%, 37%, and 64% compared to the baseline) at the peak of pollination season in all three donors. Initial increase in sIgE and total IgE levels coincides with the birch pollination initiation; sIgE and total IgE levels correlate with the birch pollen air level (sIgE:  $R^2 = 0.98$  at  $p < 0.05$ ; total IgE:  $R^2 = 0.95$  at  $p < 0.05$ ). We detected IgE clonotypes only in samples obtained during the birch pollination, which indicates an increase of IGE-expressing cells concentration during this period. The frequency of IgE clonotypes was extremely low compared to that of the clonotypes of other isotypes (IgE — 0.01%, IgM — 48.4%, IgD — 14%, IgG — 17.4%, IgA — 19.8%). Hypermutation and phylogenetic analysis of the sequences from the 13 detected IgE-containing clonal groups showed that these IgE clonotypes could originate from IgG as a result of sequential isotype-switching.

**Keywords:** allergic rhinitis, allergen-specific IgE, birch pollen, seasonal dynamics, immunoglobulin clonal repertoire

**Funding:** the study was supported by the Grant Council of the President of the Russian Federation (grant MK6000.2018.4).

**Acknowledgments:** we are very grateful to all the donors who participated in the study.

**Author contribution:** Mikelov AI — ELISA, preparation of IGH cDNA libraries, sequencing data and results analysis, research design, drafting the manuscript; Staroverov DB — cell subpopulations isolation (flow cytometry); Komech EA — blood samples collection, cell subpopulations isolation (flow cytometry); Lebedev YB — results analysis and discussion, advisory support; Chudakov DM — results analysis and discussion, advisory support (cDNA libraries preparation); Zvyagin IV — preparation of IGH cDNA libraries, sequencing data and results analysis, research design, drafting the manuscript, research organization.

**Compliance with ethical standards:** the study was conducted in full compliance with the requirements of the 2013 Helsinki Declaration; all donors signed a voluntary informed consent to participate in the study. Blood samples were taken by qualified medical personnel in the certified clinic ("Invitro").

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan V. Zvyagin  
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997; izvyagin@gmail.com

**Received:** 09.10.2019 **Accepted:** 23.10.2019 **Published online:** 31.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.072

Сезонный аллергический риноконъюнктивит (САР), или поллиноз, — одно из наиболее распространенных аллергических заболеваний. В странах Европы его распространенность достигает, по разным оценкам, 17–28% от популяции [1]. Значительная часть пациентов с поллинозом (8–16% от всего населения) сенсibilизирована к пыльце деревьев, и наиболее распространенным аллергеном является пыльца березы [2]. САР, как и другие аллергические заболевания, у большинства больных имеет хроническое течение, с высокой вероятностью развития сопутствующих патологий, таких как астма и пищевая аллергия. При этом наиболее широко применяемые терапевтические средства направлены лишь на облегчение тяжести симптомов заболевания (антигистаминные и глюкокортикостероидные препараты, стабилизаторы мембран тучных клеток). Аллергенспецифичная иммунотерапия — единственный современный подход к лечению САР, направленный на долгосрочное изменение хронического течения заболевания. Она требует длительного курса лечения, тщательного соблюдения пациентами режима, и лишь у части пациентов приводит к полному исчезновению симптомов [3]. В силу этого, разработка новых терапевтических подходов, направленных на предотвращение хронического течения САР, является крайне актуальной задачей.

Рациональный дизайн таких подходов требует глубокого понимания механизмов поддержания иммунологической памяти, обуславливающей хроническое течение аллергии. Ряд недавних неудачных клинических испытаний методов терапии аллергического ринита демонстрируют недостаточность имеющихся сведений об этих механизмах [4, 5]. Фундаментальные исследования, направленные на более глубокое изучение механизмов сохранения иммунологической памяти, обуславливающей хроническое течение аллергии, являются необходимым базисом как для разработки новых терапевтических подходов для лечения САР, так и для совершенствования существующих.

Известно, что одним из ключевых агентов в развитии аллергического ответа является аллергенспецифичный иммуноглобулин класса Е (IgE). Однако клеточные субпопуляции, продуцирующие IgE при аллергическом рините, остаются слабо охарактеризованными — не ясны их локализация, длительность существования, необходимые факторы для их поддержания. С использованием мышиной модели пищевой аллергии недавно было показано, что вскоре после сенсibilизации IgE-секретирующие плазматические клетки могут быть обнаружены в костном мозге и имеют ограниченный период жизни (до года) [6]. Антитела класса IgE при этом могут сохраняться до 100 дней связанными на мембранах тучных клеток. Показано также, что, по крайней мере, часть долгосрочной иммунологической памяти, обуславливающей хроническое течение аллергии, обеспечена субпопуляцией IgG1<sup>+</sup> аллергенспецифических В-лимфоцитов памяти, служащей «резервуаром», из которого пополняется популяция IgE-продуцентов в случае контакта организма с аллергеном [6, 7].

Целью данной работы было более детальное, по сравнению с ранее проведенными исследованиями [8–10], изучение динамики сывороточного уровня IgE у пациентов с аллергией на березовую пыльцу в зависимости от интенсивности контакта пациента с аллергеном, обусловленной уровнем аллергена в воздухе. В рамках исследования мы стремились ответить на вопрос, в какой момент времени относительно контакта с аллергеном, может происходить пополнение IgE-секретирующей фракции клеток, и охарактеризовать представленность

и связь с другими изотипами и субпопуляцией В-клеток памяти клонов IgE-секретирующих плазмобластов и плазматических клеток периферической крови пациентов на фоне сезонного обострения заболевания.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Выборка пациентов и сбор образцов сыворотки

Исследуемая группа включала трех пациентов (22, 22 и 28 лет). Критерии включения пациентов в исследование: 1) пациенты обоих полов; 2) наличие ранее клинически установленного диагноза «сезонный аллергический ринит на березовую пыльцу»; 3) отсутствие диагноза «бронхиальная астма»; 4) отсутствие других хронических воспалительных, аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний. Критерии исключения: 1) прохождение пациентом курса аллергенспецифической иммунотерапии до или в период проведения исследования; 2) прохождение вакцинации в период проведения исследования. Забор образцов венозной крови производили в медицинских лабораториях и медицинским персоналом сети КДЛ «ИНВИТРО» с использованием пробирок Vacuette Serum Gel Z и Vacuette K3EDTA (BD Biosciences; США). Дальнейшую экспериментальную работу проводили в условиях научно-исследовательской лаборатории ИБХ РАН.

Сбор образцов сыворотки крови для измерения уровня общего IgE и уровня специфических к пыльце березы и ольхи IgE проводили, начиная с марта по май 2019 г. с интервалом в две недели (суммарно 6 образцов для каждого донора). Для одного из доноров (28 лет) были дополнительно собраны образцы сыворотки в марте и мае 2017, а также в марте и мае 2018 г.

### Иммуноферментный анализ

Выделение сыворотки осуществляли в соответствии с протоколом производителя пробирок (BD Biosciences; США). Иммуноферментный анализ для определения уровня общего IgE и уровня специфических к пыльце березы и ольхи IgE проводили при помощи коммерчески доступных наборов для ИФА (Алкор Био; Россия) согласно протоколу производителя. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного ридера Hidex Sense (Hidex Oy; Финляндия). Для каждого образца сыворотки выполняли ИФА в двух независимых повторях.

### Выделение субпопуляций В-лимфоцитов памяти, плазмобластов и плазматических клеток

Для одного из доноров (28 лет) в трех временных точках (март и май 2017, март 2018) были получены образцы трех клеточных субпопуляций В-клеточного происхождения — В-лимфоцитов памяти, плазмобластов и плазматических клеток периферической крови.

Из образца цельной крови донора выделяли фракцию мононуклеарных клеток периферической крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла на центрифуге Eppendorf 5804 при 310 g в течение 20 мин (Eppendorf; Германия). Далее клетки окрашивали при помощи набора флуоресцентно-меченых антител к мембранным маркерам человека: anti-CD19-APC, anti-CD20-VioBlue, anti-CD27-VioBright FITC, anti-CD138-PE-Vio770 (Myltenyi Biotec; США), после чего при помощи

флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (BD FACS Aria III, BD Biosciences; США) были выделены целевые субпопуляции В-клеточного происхождения: В-лимфоциты памяти (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), плазмобласты (CD20<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup>) и плазматические клетки (CD20<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup>). Для каждой временной точки собирали по два образца В-лимфоцитов памяти (по 50 000 клеток), плазмобластов и плазматических клеток (по 1000 и по 500 клеток соответственно).

### Секвенирование и анализ репертуаров В-клеточных рецепторов

Подготовку библиотек кДНК тяжелых цепей иммуноглобулинов (IgH) проводили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [11], используя ряд модификаций. На этапе обратной транскрипции вводили адаптер с уникальным молекулярным идентификатором (UMI) и баркодом образца (табл. 1). Дальнейшую амплификацию проводили в два этапа с использованием праймеров, описанных в табл. 1. Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2000/2500 (Illumina; США), парное чтение длиной 310 + 310 нуклеотидов.

Разделение общего массива секвенирования по соответствующим образцам и сборку консенсусных последовательностей на основе уникальных молекулярных идентификаторов проводили при помощи программы MIGEC [12]. Аннотацию V-, D-, J- и C-сегментов, определение уникальных клональных последовательностей IgH (клонотипов)

и оценку уровня гипермутаций проводили с использованием программы MIXCR [13]. Для сборки клональных последовательностей IgH использовали чтения, соответствующие последовательностям кДНК IgH, прочитанных как минимум дважды на основе результатов анализа последовательностей молекулярных баркодов. При этом в качестве клонотипа рассматривали нуклеотидную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулинов, начиная от каркасного участка 1 (FR1) V-сегмента до конца J-сегмента, с учетом изотипа антитела, определяемого по 5'-фрагменту C-сегмента длиной 15–16 нуклеотидов. Анализ репертуаров, статистическую обработку результатов и регрессионный анализ проводили с использованием языка программирования R [14], иллюстрации подготовлены с использованием пакета ggplot2 [15]. Клональные группы определяли при помощи программы Change-O [16] по следующим критериям: в одну клональную группу входили все последовательности с одинаковой длиной CDR3 и V-сегментом IgH, и отличавшиеся не более чем на 15% по нуклеотидной последовательности CDR3 IgH. Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA 7 [17] (филогенетические деревья максимального правдоподобия, эволюционная модель GTR).

### Регрессионный анализ

Для проверки гипотезы о наличии согласованной динамики сывороточного уровня IgE к березовой пыльце и уровня пыльцы березы в воздухе была разработана регрессионная

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных при подготовке библиотек кДНК для секвенирования репертуаров IgH

| Название праймера       | Назначение  | Последовательность   |
|-------------------------|---|--|
| Синтез кДНК             |   |  |
| SmartMK                 | Адаптер для «смены матрицы» при синтезе кДНК. U = dU, rG-riboG, N — нуклеотид из списка A/G/C/T | CAGUGGUAUCAACGCAGAGUACNNNNNNUTGAAUNNNNNNUCTT(rG) <sub>4</sub>                        |
| hIGG_r1                 | Изотип-специфичный праймер, IgG   | GAAGTAGTCCTTGACCAGGCA  |
| hIGM_r1                 | Изотип-специфичный праймер, IgM   | GTGATGGAGTCGGGAAGGAAG  |
| hIGA_r1                 | Изотип-специфичный праймер, IgA   | GCGACGACCACGTTCCCATCT  |
| hIGD_r1                 | Изотип-специфичный праймер, IgD   | GGACCACAGGGCTGTTATC  |
| hIGE_r1                 | Изотип-специфичный праймер, IgE   | AGTCACGGAGGTGGCATTG  |
| ПЦР-амплификация, шаг 1 |   |  |
| M1ss                    | Прямой праймер  | AAGCAGTGGTATCAACGCA  |
| hIGG_r2                 | Изотип-специфичный обратный праймер, IgG/IgE  | CCAGGGGGAAGACCGATG   |
| hIGA_r2                 | Изотип-специфичный обратный праймер, IgA  | CTCAGCGGGAAGACCTTG   |
| hIGM_r2                 | Изотип-специфичный обратный праймер, IgM  | ACGAGGGGGAAGAGGGTTG  |
| hIGD_r2                 | Изотип-специфичный обратный праймер, IgD  | CCTGATATGATGGGGAACAC   |
| hIGE_r2                 | Изотип-специфичный обратный праймер, IgE  | GTCAAGGGGAAGACCGATG  |
| ПЦР-амплификация, шаг 2 |   |  |
| M1s_long_i7             | Прямой праймер*   | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT(i7)GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTAT AAGAGACAGTGGTATCAACGCAGAG     |
| hIGD_r2_long_i5         | Изотип-специфичный обратный праймер, IgD*   | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)TCGTCCGCGAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAGATATGATGGGGAACAC |
| hIGM_r2_long_i5         | Изотип-специфичный обратный праймер, IgM*   | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)TCGTCCGCGAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAGAGGGGGAAGGGTTG   |
| hIGA_r2_long_i5         | Изотип-специфичный обратный праймер, IgA*   | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)TCGTCCGCGAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAGCAGCGGGAAGACCTTG |
| hIGGE_r2_long_i5        | Изотип-специфичный обратный праймер, IgG/IgE*   | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)TCGTCCGCGAGCGTCAGATGT GTATAAGAGACAGAGGGGGAAGACSGATG |

**Примечание:** \* (i5) и (i7) — последовательности длиной 8 нуклеотидов, являющиеся образцом-специфичными баркодами.

модель. Исходные данные для построения модели представлены в табл. 2. Уравнение регрессии:

$$\text{slgE\_level} = b + k_1 \times \text{pollen\_level} + k_2 \times \text{donorMRK} + k_3 \times \text{donorLK},$$

где  $\text{slgE\_level}$  — зависимая переменная, сывороточный уровень аллергенспецифичного IgE к аллергенам березовой пыльцы;  $\text{pollen\_level}$  — переменная-предиктор, средний уровень пыльцы березы в воздухе (класс) в течение двух недель перед забором соответствующего образца крови для измерения сывороточного уровня IgE;  $\text{donorMRK}$  — искусственная переменная-предиктор, принимающая значения 1 (донор MRK) и 0 (донор не MRK);  $\text{donorLK}$  — искусственная переменная-предиктор, принимающая значения 1 (донор LK) и 0 (донор не LK);  $b$  — свободный член уравнения регрессии, отражающий базальный уровень зависимой переменной, характерный для донора MS;  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  — коэффициенты уравнения регрессии ( $k_1$  отражает изменение зависимой переменной при изменении уровня пыльцы в воздухе на 1 класс пыления;  $k_2$  отражает разницу базального уровня специфического IgE к березовой пыльце между донорами MRK и MS;  $k_3$  отражает разницу базального уровня специфического IgE к березовой пыльце между донорами LK и MS).

Рассчитанные коэффициенты:  $b = 207,813$  ( $p < 0,01$ );  $k_2 = -194,4$  ( $p < 0,01$ );  $k_1 = 6,474$  ( $p < 0,05$ );  $k_3 = -208,15$  ( $p < 0,01$ ). Скорректированный  $R^2 = 0,98$ ;  $p < 0,01$ ;  $F$ -тест.

Аналогично разработана регрессионная модель для анализа согласованности динамики сывороточного уровня общего IgE с уровнем пыльцы березы в воздухе. В качестве зависимой переменной выбран сывороточный уровень общего IgE, в качестве переменных-предикторов — те же переменные, что и для ранее описанной модели для  $\text{slgE}$ . Для данной модели (зависимая переменная —

сывороточный уровень общего IgE) получены следующие значения коэффициентов:  $b = 1299,05$  ( $p < 0,01$ );  $k_2 = -1056,4$  ( $p < 0,01$ );  $k_1 = 51,45$  ( $p < 0,05$ );  $k_3 = -1313,65$  ( $p < 0,01$ ). Скорректированный  $R^2 = 0,95$ ;  $p < 0,01$ ;  $F$ -тест.

### Данные пыльцевого мониторинга

Данные пыльцевого мониторинга в г. Москве получены из открытых источников («Аллергофон»). Соответствие класса пыления количеству зерен пыльцы на кубический метр воздуха представлено в табл. 3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Повышение сывороточного уровня общего и специфического к пыльце березы IgE происходит согласованно с повышением уровня пыльцы березы в воздухе

Сывороточный уровень общего и аллергенспецифичного к пыльце березы IgE был измерен в шести временных точках до и после начала сезона пыления березы. Абсолютные значения сывороточных уровней как специфического (рис. 1А), так и общего IgE (рис. 1Б) значительно различаются между пациентами, при этом индивидуальные различия существенно превосходят различия между временными точками того же донора. У всех доноров наблюдается рост абсолютных значений  $\text{slgE}$  к пыльце березы и общего IgE от точки 1 к точке 6. Уровень специфического к аллергенам березы IgE коррелирует с уровнем общего IgE для каждого донора и превышает референсный уровень во всех временных точках (рис. 1).

Степень изменения уровня  $\text{slgE}$  к березовой пыльце и общего IgE на протяжении исследуемого периода

**Таблица 2.** Исходные данные, использованные для построения регрессионных моделей. Сывороточные уровни  $\text{slgE}$  к березовой пыльце и общего IgE, средний уровень пыльцы березы в воздухе

| Временная точка | Донор | Сывороточный уровень $\text{slgE}$ к березовой пыльце, МЕ/мл | Сывороточный уровень общего IgE, МЕ/мл | Средний уровень пыльцы березы в воздухе, класс |
|-----------------|-------|--|--|--|
| 1               | MS    | 178,4  | 1066,3                                 | 0,00   |
| 2               | MS    | 192,4  | 1148,9                                 | 0,00   |
| 3               | MS    | 202,7  | 1275,9                                 | 0,07   |
| 4               | MS    | 232  | 1419,7                                 | 1,07   |
| 5               | MS    | 243,1  | 1469,4                                 | 3,83   |
| 6               | MS    | 244,3  | 1779,9                                 | 2,13   |
| 1               | MRK   | 15,7   | 273,7                                  | 0,00   |
| 2               | MRK   | 17,4   | 245,9                                  | 0,00   |
| 3               | MRK   | 17,6   | 288,5                                  | 0,07   |
| 4               | MRK   | 23   | 293,1                                  | 1,07   |
| 5               | MRK   | 27,1   | 358,3                                  | 3,83   |
| 6               | MRK   | 25,7   | 362,2                                  | 2,13   |
| 1               | LK    | 5,4  | 26,2                                   | 0,00   |
| 2               | LK    | 6,4  | 31,2                                   | 0,00   |
| 3               | LK    | 6,1  | 28,2                                   | 0,07   |
| 4               | LK    | 6,2  | 44,8                                   | 1,07   |
| 5               | LK    | 9,6  | 69,1                                   | 3,83   |
| 6               | LK    | 10,3   | 78,7                                   | 2,13   |

**Таблица 3.** Уровень пыления — соответствие количества пыльцы в воздухе классам (уровням) пыления

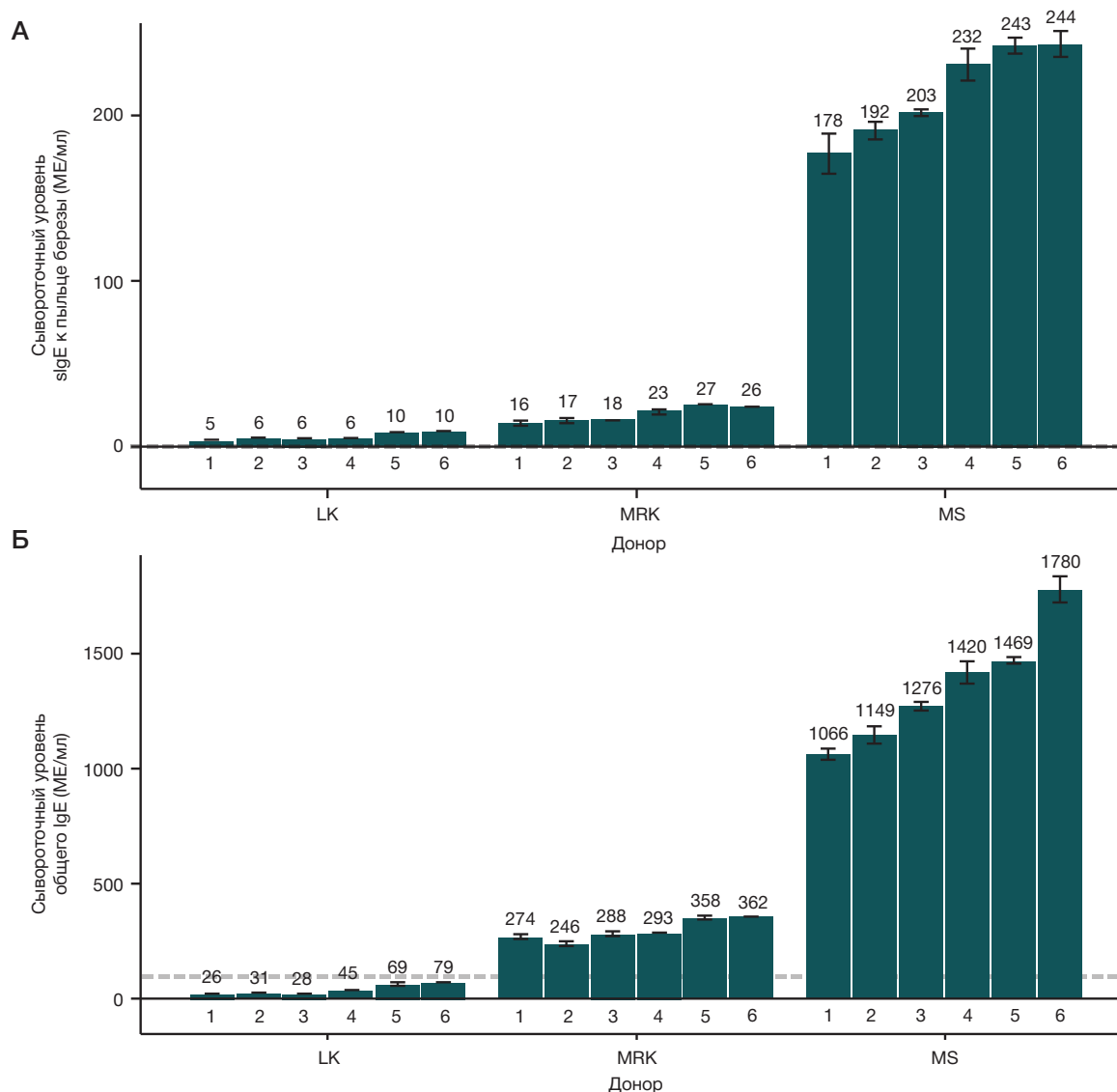
| Количество зерен пыльцы на 1 м³ воздуха | 0 | 1–10 | 11–100 | 101–1000 | 1001–5000 | > 5000 |
|---|---|------|--------|----------|-----------|--------|
| Класс                                   | 0 | 1    | 2      | 3        | 4         | 5      |

существенно меньше различий в сывороточном уровне общего и специфического IgE между донорами (коэффициент вариации между всеми точками соответствующего донора для sIgE к березе: MS — 0,130, MRK — 0,228, LK — 0,282; для IgE общего: MS — 0,189, MRK — 0,154, LK — 0,485); наименьший коэффициент вариации между донорами для sIgE — 1,39; для общего IgE — 1,17). В связи с этим, для исследования значений в динамике уровни sIgE к березовой пыльце и общего IgE в каждой последующей временной точке были рассмотрены относительно базовых уровней sIgE и общего IgE для этого донора, т. е. до начала пыления березы (точка 1). Каждое измерение общего IgE и sIgE к пыльце березы было нормировано на соответствующие значения общего IgE и sIgE к пыльце березы в первой временной точке для каждого донора.

В соответствии с ранее опубликованными данными по сезонной динамике сывороточного уровня IgE, специфического к другим пыльцевым аллергенам [8–10], в нашем исследовании также можно наблюдать значительное увеличение уровня sIgE к пыльце березы между временной точкой вне сезона (точка 1) и в пик сезона пыления (точка 6) березы. При этом обнаружена согласованная динамика

сывороточного уровня sIgE к березе и уровня березовой пыльцы в воздухе (рис. 2). Наибольший прирост в уровне sIgE происходит в период пика пыления березы, между точками 3 и 5: для донора LK он составил 90,7%, для MRK — 63,7%, для MS — 36,9%.

Для статистической проверки гипотезы о связанности уровня пыльцы березы в воздухе и сывороточного уровня аллергенспецифического IgE к пыльце березы была построена линейная регрессионная модель. В соответствии с моделью высокая доля дисперсии зависимой переменной (уровень sIgE) обусловлена выбранными предикторами (скорректированный  $R^2 = 0,98$ ), т. е. уровнем пыльцы в воздухе и идентификатором донора, что позволяет учесть значительные различия в абсолютном уровне sIgE между донорами. При этом все коэффициенты статистически достоверно не равны 0 ( $p < 0,05$  для всех коэффициентов), и коэффициент при переменной-предикторе, отражающей уровень пыльцы березы, больше 0 ( $k_1 = 6,47$ ), что служит статистическим подтверждением согласованности изменения уровня sIgE в сыворотке с изменением уровня пыльцы березы в воздухе. Аналогично, регрессионная модель для уровня общего



**Рис. 1.** Уровень специфического IgE к пыльце березы (**А**) и общего IgE (**Б**) для трех доноров с сезонным аллергическим риноконъюнктивитом (LK, MRK, MS) в шести временных точках (1–6). Горизонтальная пунктирная линия отражает референсный уровень соответствующих антител в сыворотке здорового взрослого донора ( $< 0,35$  МЕ/мл — для sIgE,  $< 100$  МЕ/мл — для общего IgE). Планки погрешностей отражают размах (разницу между минимальным и максимальным значениями измерения)



IgE также демонстрирует согласованность повышения уровня общего IgE с концентрацией аллергена в воздухе (скорректированный  $R^2 = 0,95$ ;  $p < 0,05$  для каждого из коэффициентов).

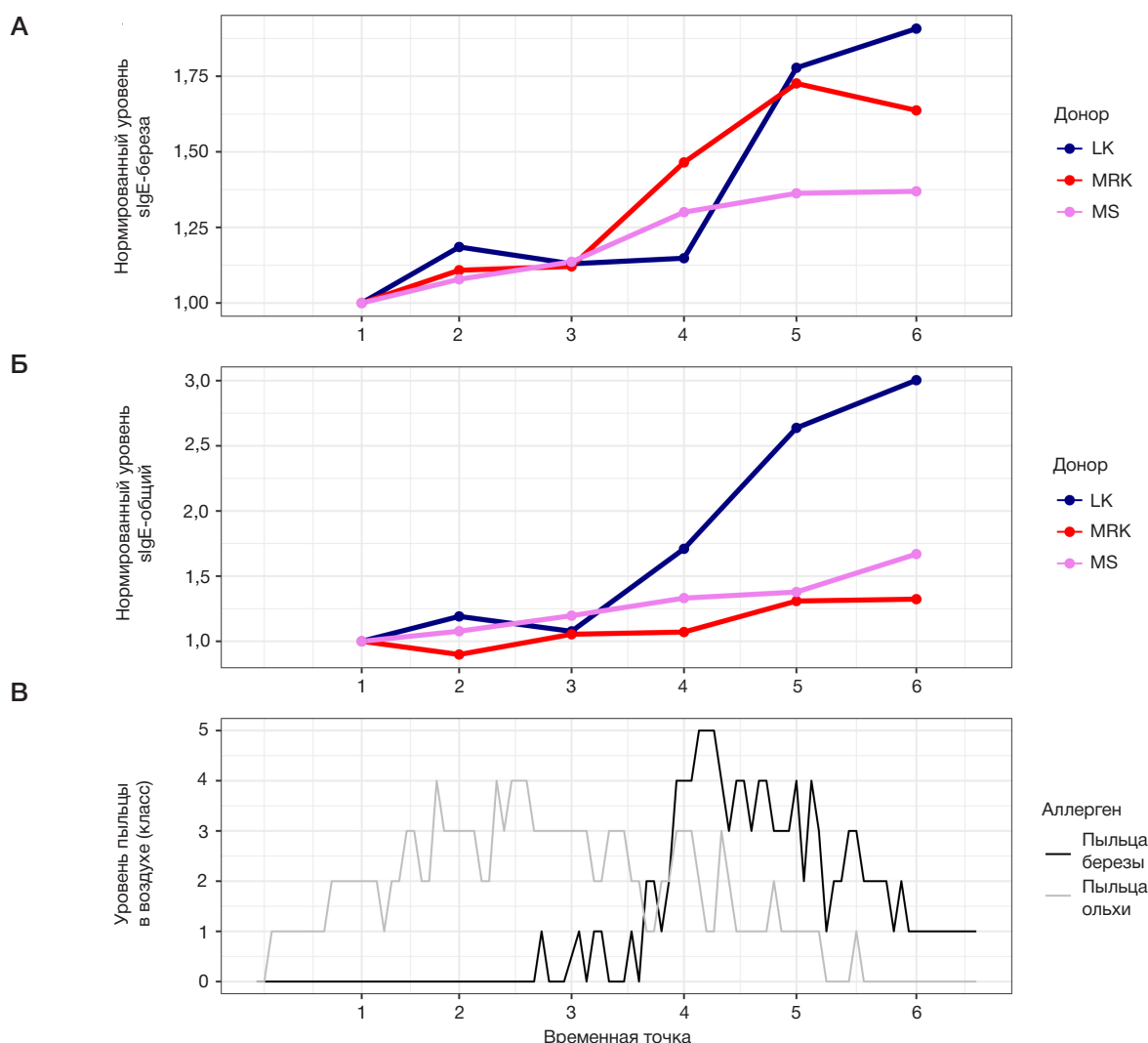
Стоит отметить, что относительно небольшое, по сравнению с максимально достигнутым за весь период наблюдения, повышение уровня sIgE к пыльце березы происходит в промежутке до начала или при невысокой концентрации пыльцы березы (точки 1–3). Это можно объяснить случайными колебаниями уровня sIgE к пыльце березы (для двух из трех доноров повышение абсолютного уровня между точками 1–2 и 2–3 не превышает 1 МЕ/мл) или более ранним контактом пациента с пылью березы, до того как повышение уровня пыльцы в воздухе было зарегистрировано станциями пыльцевого мониторинга. Такое повышение sIgE к березовой пыльце может быть обусловлено также кросс-реактивностью sIgE к пыльце березы в отношении антигенов из пыльцы ольхи из-за высокой степени гомологии антигенов [2] и предшествования пыления ольхи сезону цветения березы. Для оценки вклада кросс-реактивных IgE мы провели измерение уровня sIgE к пыльце ольхи для всех собранных образцов сыворотки (рис. 3). У всех исследованных доноров уровень sIgE к пыльце ольхи оказался в большей степени согласован с изменением уровня пыльцы березы

в воздухе, чем пыльцы ольхи. Наибольший прирост уровня sIgE к пыльце ольхи наблюдали между точками 4 и 5 в момент наибольшего прироста уровня пыльцы березы в воздухе, но не в момент наибольшего прироста уровня пыльцы ольхи в воздухе между точками 1 и 2. На основе этого можно предположить высокую степень кросс-реактивности sIgE к березовой пыльце в отношении антигенов пыльцы ольхи у всех исследованных доноров.

Между точками 1 и 2 для двух доноров (MRK, LK) небольшой рост уровня sIgE к березовой пыльце ( $< 1$  МЕ/мл) сопровождало снижение уровня sIgE к пыльце ольхи. Таким образом, показанное для доноров MRK и LK незначительное повышение уровня sIgE к березовой пыльце не может быть объяснено кросс-реактивностью sIgE к пыльце ольхи. У донора MS наблюдали рост sIgE к ольхе между точками 1 и 2, что может объяснять повышение уровня sIgE к березовой пыльце до начала сезона пыления березы.

### Представленность IgE-экспрессирующих клеток в субпопуляциях В-клеточного происхождения в периферической крови сравнительно низка и возрастает на фоне сезонного обострения аллергии

Основываясь на данных, полученных с использованием мышиной модели пищевой аллергии, можно предположить,



**Рис. 2.** Динамика уровня сывороточного IgE и уровня пыльцы березы в воздухе. **А.** Сывороточный уровень sIgE к березовой пыльце в каждой временной точке, нормированный на уровень sIgE к березовой пыльце в точке 1 для этого донора. **Б.** Сывороточный уровень IgE-общий в каждой временной точке, нормированный на уровень IgE-общий в точке 1 для соответствующего донора. **В.** Уровень пыльцы березы в воздухе

что увеличение сывороточного уровня sIgE к пыльце березы и общего IgE связано с увеличением числа IgE-продуцирующих клеток в организме. Чтобы оценить сезонную динамику представленности IgE<sup>+</sup>-клеток в субпопуляциях В-клеточного ряда (В-лимфоцитов памяти, плазмобластов, плазматических клеток), для одного из доноров было проведено исследование клональных репертуаров тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH) клеток периферической крови в трех временных точках («1\_2017», «3\_2018» — точки вне сезона пыления березы, «2\_2017» — на пике сезона).

В результате секвенирования суммарно для всех трех временных точек было получено 50 550 291 прочтений, представляющих 1 616 747 уникальных молекулярных событий (молекул кДНК IGH, вошедших в анализ). Для дальнейшего анализа с целью исключения большинства ошибок в определении клональной последовательности использовали молекулярные события, для которых получено два или более прочтений. Всего было определено 116 437 клонотипов IGH (клонотип определяют как уникальную нуклеотидную последовательность IGH от каркасного региона (FR1) V-сегмента до конца J-сегмента с учетом изотипа антитела). Среди обнаруженных IgE клонотипы представляли исключительно малую долю (~0,01%). Для сравнения: доля IgM клонотипов составила 48,4%, IgD — 14%, IgG — 17,4%, IgA — 19,8%.

Все IGE<sup>+</sup>-клонотипы были обнаружены в репертуарах тяжелых цепей иммуноглобулинов В-лимфоцитов памяти, плазмобластов и долгоживущих плазматических клеток исключительно в образцах, полученных в период сезона пыления березы (рис. 4). При этом число клеток в образце каждой субпопуляции не различается между временными точками. Полученный результат свидетельствует о повышении представленности IGE<sup>+</sup>-клеток в периферической крови пациента в сезон цветения березы.

Преимущество использованной технологии подготовки библиотек кДНК тяжелых цепей иммуноглобулинов в возможности оценки числа гипермутаций по всей длине последовательности IGH, начиная с региона FR1 и заканчивая началом константного участка. Для каждого клонотипа было определено число гипермутаций в зависимости от изотипа данной IGH. Ожидается, что наименьший уровень гипермутаций был детектирован среди IgD- и IgM-последовательностей (медиана — 2,3 и 3,7 п.о. на 100 п.о. последовательности V-сегмента соответственно), и более высокий — среди IgG- и IgA-клонотипов (медиана — 6,8 и 7,1 п.о. на 100 п.о. последовательности V-сегмента соответственно) (рис. 5), экспрессирующихся в В-лимфоцитах, прошедших через процесс созревания в герминативных центрах. При этом среднее число гипермутаций IgE-клонотипов было не ниже (медиана — 7,4 п.о. на 100 п.о. последовательности V-сегмента), чем для IgG- и IgA-клонотипов. Факт сходного числа гипермутаций у IgE- и IgG-клонотипов может свидетельствовать о возможном происхождении IgE-клонотипов антителосекретирующих субпопуляций клеток из IgG<sup>+</sup> В-лимфоцитов памяти, однако не исключает возможности независимого переключения изотипов и дальнейшего гипермутагенеза IgE<sup>+</sup> и IgG<sup>+</sup> В-лимфоцитов.

Для более детального анализа взаимосвязи IgE-клонотипов в репертуарах тяжелых цепей иммуноглобулинов с клонотипами других изотипов мы применили ранее опубликованный подход для определения клональных групп, т. е. наборов клонотипов, наиболее вероятно произошедших от единого предшественника и имеющих схожую, но не обязательно идентичную нуклеотидную последовательность, кодирующую вариативный фрагмент тяжелой цепи В-клеточного рецептора [16]. Всего было выявлено 13 IgE-содержащих клональных групп, включавших в общей сложности

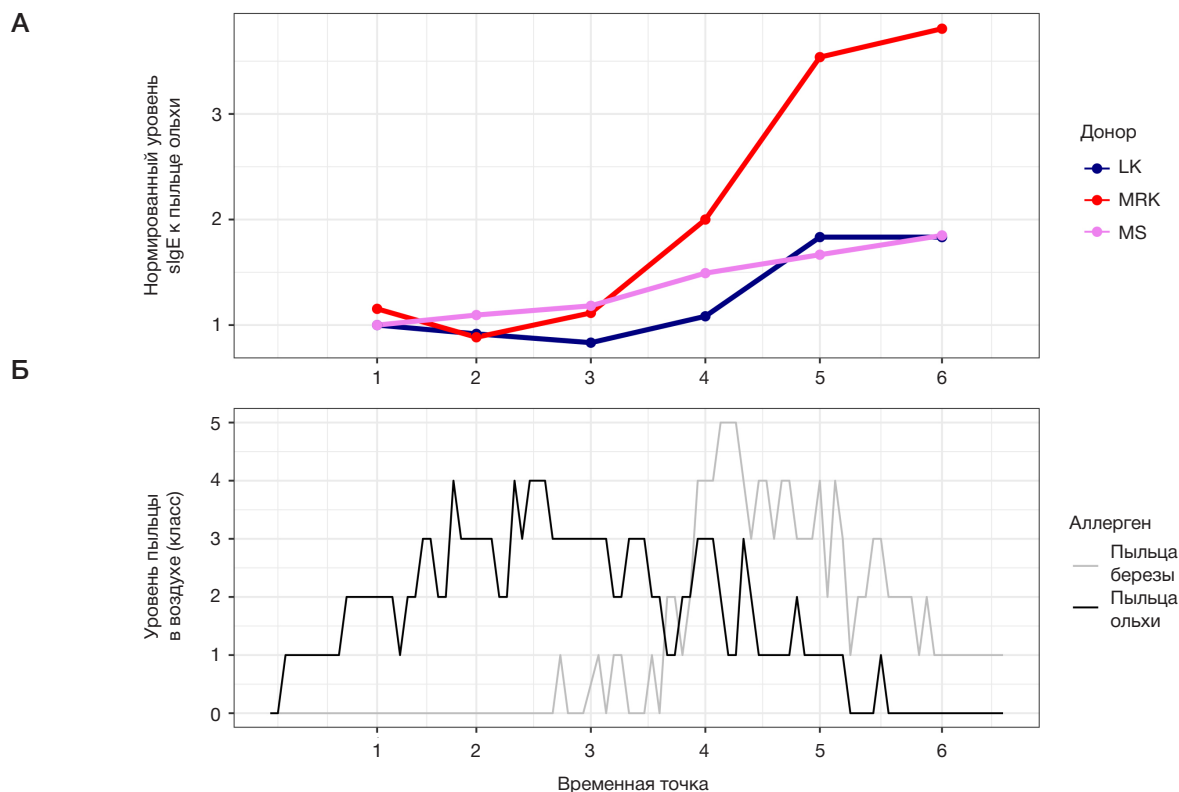


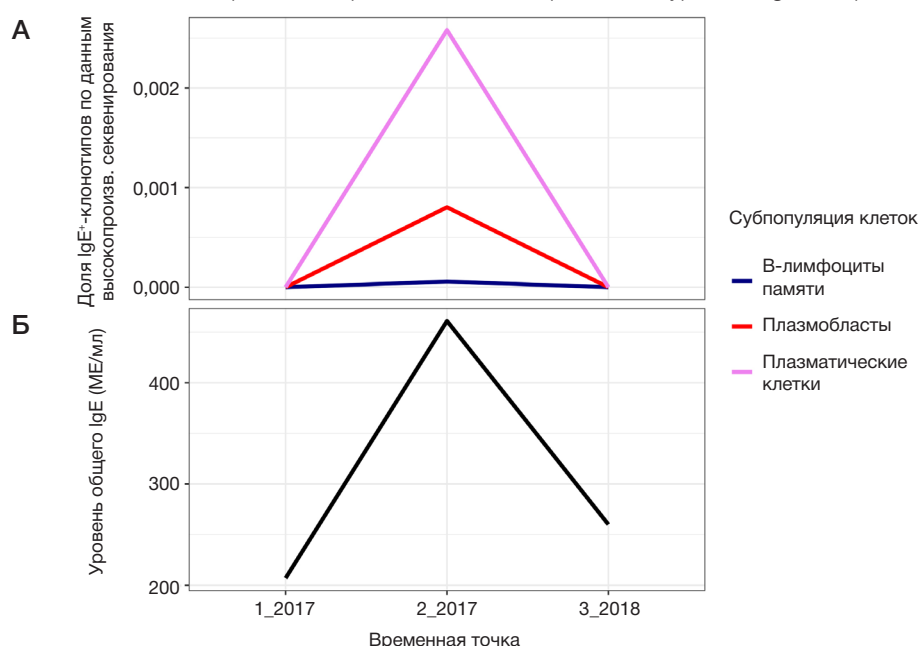
Рис. 3. Динамика уровня специфического IgE к аллергенам пыльцы ольхи и уровня пыльцы в воздухе. А. Сывороточный уровень sIgE к ольхе в каждой временной точке, нормирован на уровень sIgE к березе в точке 1 для каждого донора. Б. Уровень пыльцы в воздухе

154 клонотипа. В 4 из них были идентифицированы клонотипы других изотипов: IgG — 82, IgA — 19, IgM — 4 и IgD — 1. Филогенетический анализ, проведенный для клонотипов каждой из этих клональных групп, указывает на близкое родство IgE- и IgG-клонотипов (рис. 6) — для большинства IgE-клонотипов наиболее близким соседом по филогенетическому дереву являлся IgG-клонотип. Стоит отметить, что в каждой из рассмотренных IgE-содержащих клональных групп присутствовали IgG-клонотипы, представлявшие фракцию IgG<sup>+</sup> В-лимфоцитов памяти.

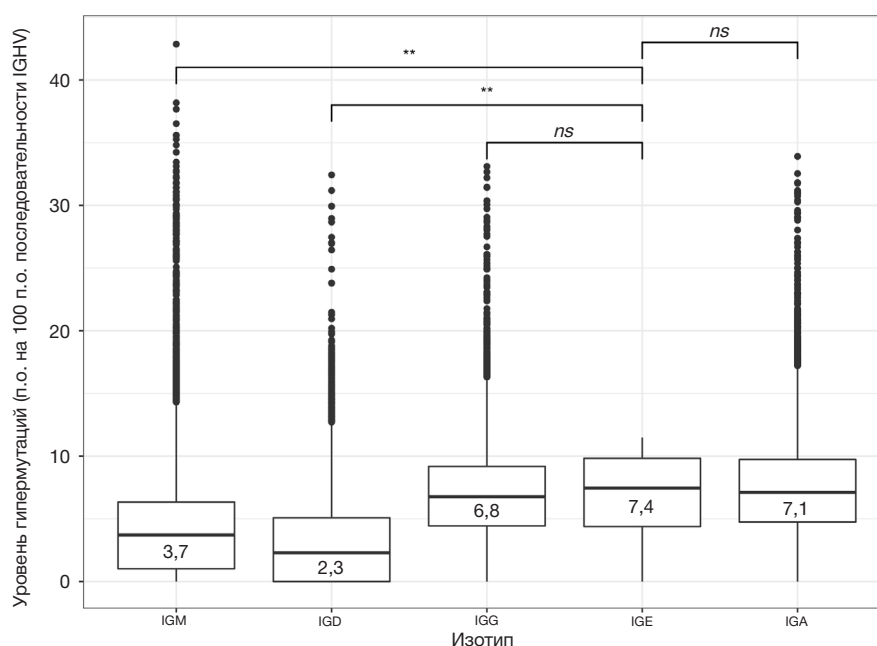
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ранее опубликованных исследованиях показан рост уровня сывороточного общего и аллергенспецифического

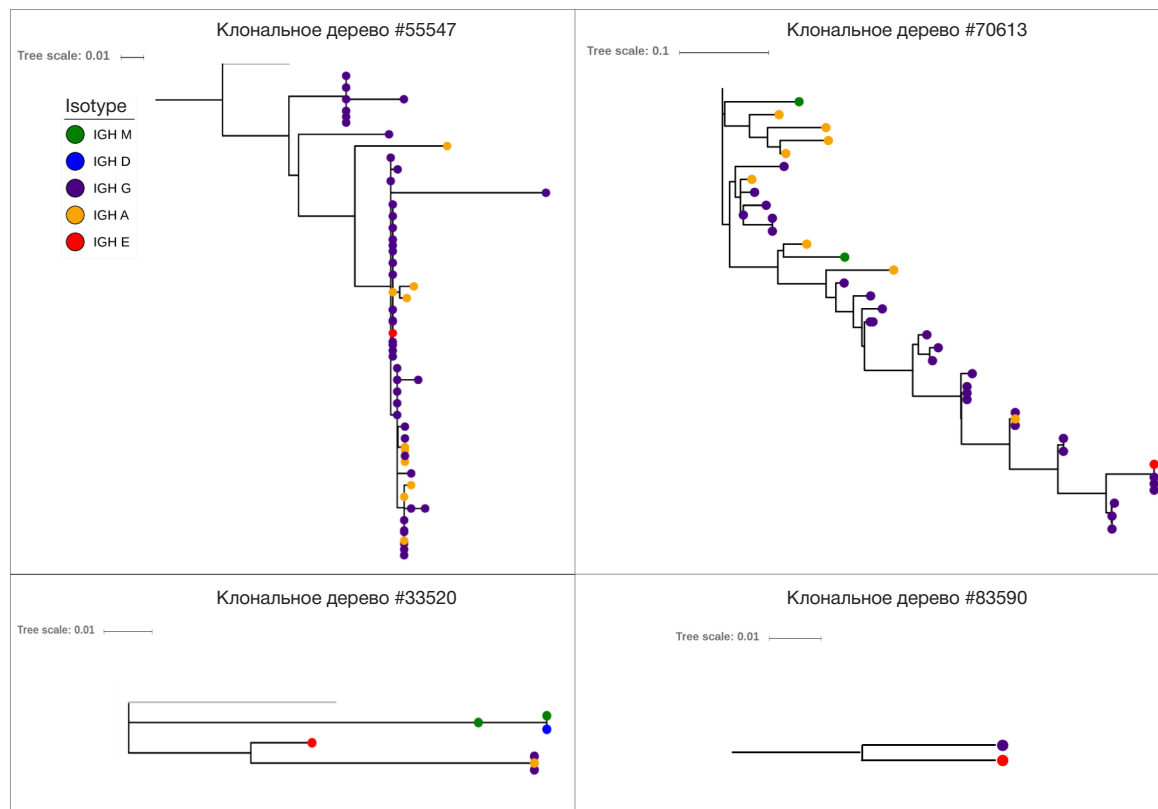
IgE в период сезонного обострения аллергического ринита [8–10]. Вместе с тем в этих работах представлены данные о сезонной динамике сывороточного уровня антител собраны с периодичностью раз в несколько месяцев и вне связи с уровнем пыльцы, вызывающей аллергическую реакцию, в воздухе. В данной работе мы провели измерения сывороточного уровня общего IgE и специфических IgE к пыльце березы и ольхи с большим разрешением по времени (периодичность анализа уровня антител — раз в две недели) в течение периода, захватывающего начало периода пыления. Сопоставление концентрации антител с количеством пыльцы в воздухе в каждой временной точке позволило продемонстрировать согласованную динамику уровня пыльцы березы в воздухе и сывороточного уровня sIgE к березе и общего IgE. При



**Рис. 4.** Динамика клонального репертуара клеток В-ряда. **А.** Доля клонов с IgE-изотипом по результатам высокопроизводительного секвенирования репертуаров тяжелых цепей иммуноглобулинов для трех субпопуляций клеток периферической крови: В-лимфоцитов памяти, плазмобластов и плазматических клеток. **Б.** Уровень общего IgE в сыворотке донора в соответствующих временных точках



**Рис. 5.** Уровень гипермутаций (п.о. на 100 п.о. последовательности IGHV) по данным высокопроизводительного секвенирования репертуаров IGH. IGM ( $n = 55\,865$ ), IGD ( $n = 15\,834$ ), IGG ( $n = 20\,321$ ), IGE ( $n = 13$ ), IGA ( $n = 23\,955$ ). (\*\* —  $p < 0,01$ ; ns — незначимое различие; Т — критерий Уилкоксона)



**Рис. 6.** Филогенетические деревья для IgE-содержащих клональных групп, содержащих клонотипы и других изоформ. Каждая точка представляет собой уникальный клонотип IGH. Цветом отмечены клонотипы разных изоформ (темно-синим — IgG, красным — IgE, оранжевым — IgA, зеленым — IgM, синим — IgD). Длина ветвей отражает расстояние между узлами по количеству мутаций между последовательностями. «Tree scale» — шкала, отражающая масштаб, в котором построено клонотипное дерево

этом рост уровня сывороточного sIgE к ольхе оказался в большей степени ассоциирован с ростом уровня пыльцы березы, но не ольхи, у всех доноров. Такой результат, по всей видимости, обусловлен кросс-реактивностью аллергенспецифичных IgE к пыльце березы в отношении антигенов пыльцы ольхи и может свидетельствовать об отсутствии специфичных антител к уникальным антигенам ольхи у доноров в нашем исследовании. Вместе с тем, так как уровень sIgE к пыльце ольхи не был исследован до начала цветения ольхи — до начала измерений sIgE прошло чуть более одной недели, в течение которой наблюдали низкий уровень (1–10 зерен на 1 м<sup>3</sup>) пыльцы ольхи в воздухе, нельзя исключить, что повышение уровня sIgE к ольхе до максимального значения могло случиться в этот период (точки 1–3).

Момент начала роста концентрации sIgE к пыльце березы и общего IgE совпадал с началом роста концентрации пыльцы березы у всех доноров, что может быть связано с увеличением количества IgE-секретирующих плазмобластов и плазматических клеток, дифференцирующихся из В-лимфоцитов памяти в ответ на стимуляцию аллергеном. Исследование динамики репертуара IGH и свойств последовательностей идентифицированных IGH-клонотипов в целом подтверждает это предположение. Полученные данные свидетельствуют о росте количества IgE-экспрессирующих плазмобластов и плазматических клеток в периферической крови после начала пыления березы, что отражает активный процесс дифференциации В-лимфоцитов. Высокий уровень гипермутаций, наблюдаемый в IgE-клонотипах, указывает на длительную историю отбора рецепторов в ходе реакций в герминативных центрах,

позволяя предполагать происхождение данных IgE-секретирующих клеток из В-лимфоцитов памяти.

В целом, полученные результаты указывают на то, что модель долгосрочного поддержания иммунологической памяти в контексте пищевой аллергии [6] может быть справедлива и в контексте сезонного аллергического ринита. В рамках данной модели долгоживущие IgE-секретирующие плазматические клетки имеют ограниченный период жизни (~100 дней для мышиной модели), при этом IgG1-В-лимфоциты памяти служат долгосрочным «резервуаром», из которого пополняется пул IgE-секретирующих плазматических клеток. Процесс пополнения происходит в период контакта с аллергеном за счет быстрой пролиферации, изотип-свитчинга и дифференциации IgG1-В-лимфоцитов памяти под действием Th2-ассоциированных цитокинов (IL4, IL13 и др.). Результаты ранее опубликованного исследования репертуара В-клеточных рецепторов в респираторной аллергии [18] не содержали сведений относительно принадлежности клонотипов к определенным субпопуляциям, но тем не менее свидетельствовали о наличии клональных связей между IgG- и IgE-клонотипами в репертуарах тяжелых цепей иммуноглобулинов в периферической крови, что также служит косвенным подтверждением корректности модели, предложенной R. Jiménez-Saiz. Проведенный в рамках данного исследования филогенетический анализ IgE-содержащих клональных групп демонстрирует вероятное происхождение IgE-секретирующих плазматических клеток из IgG<sup>+</sup> В-лимфоцитов памяти у пациентов с аллергическим риноконъюнктивитом, однако в то же время строго не исключает возможности иного происхождения IgE-продуцентов.

Полученные нами данные также не исключают возможности того, что увеличение уровня сывороточного IgE происходит за счет более интенсивного производства и секреции антител уже существующими IgE-секретирующими плазматическими клетками. Средний срок жизни IgE<sup>+</sup> плазматических клеток в красном костном мозге для человека остается неизученным. При этом повышенная концентрация IgE в сыворотке больных аллергическим ринитом наблюдается и вне сезона цветения, позволяя предположить, что срок жизни соответствующих плазматических клеток может превышать время между двумя сезонами пыления. Однако, принимая во внимание ранее опубликованные данные о корреляции сывороточного уровня IgE и числа IgE<sup>+</sup> плазматических клеток в периферической крови [19], более вероятным объяснением роста сывороточного уровня общего и специфического IgE представляется увеличение числа IgE-секретирующих клеток, что также согласуется с результатами настоящей работы.

## ВЫВОДЫ

За счет существенно более высокого, по сравнению с опубликованными ранее исследованиями, временного разрешения при мониторинге уровня антител в сыворотке, удалось продемонстрировать, что момент начала роста концентрации общего и специфического к пыльце березы IgE в контексте сезонной аллергии на березовую пыльцу совпадает с моментом начала роста концентрации пыльцы березы. При этом динамика роста уровней общего и специфического IgE согласуется с количеством пыльцы березы в воздухе.

Результаты высокопроизводительного секвенирования и анализа репертуаров тяжелых цепей клеток В-лимфоцитарного ряда в сочетании с данными, полученными на мышиной модели пищевой аллергии другими авторами, позволяют предположить, что подобный

прирост вероятнее всего вызван увеличением количества IgE-секретирующих плазматических клеток. Анализ нуклеотидных последовательностей IgE-содержащих клональных групп разных субпопуляций В-клеточного ряда показал высокое сходство последовательностей IgE- и IgG-клонотипов и присутствие в данных группах IgG-клонотипов, представляющих фракцию IgG<sup>+</sup>-В-лимфоцитов памяти, что позволяет предположить происхождение IgE-секретирующих клеток из пула IgG<sup>+</sup>-В-лимфоцитов.

Малый размер выборки пациентов не позволяет заключить, что полученные характеристики отражают общие закономерности для всех пациентов в силу предполагаемого многообразия эндотипов аллергического риноконъюнктивита. Полученные в работе результаты свидетельствуют о сходстве механизма долгосрочного поддержания иммунной памяти при САР с таковым при пищевой аллергии. Для подтверждения данного предположения необходимо продолжить исследование на существенно более многочисленной группе пациентов с более детальной клинической характеристикой пациентов. Недостаточная изученность механизмов поддержания аллергенспецифичной реактивности иммунной системы определяет необходимость подобных исследований для разработки новых способов терапии, направленных на нарушение таких механизмов. Например, блокирование процесса переключения изотипа на IgE при дифференцировке IgG<sup>+</sup>-аллергенспецифичных В-клеток памяти (например, за счет подавления эффекта цитокинов, производимых Th2-Т-клетками, при помощи моноклонального антитела к IL4R) может стать перспективной терапевтической стратегией. Сведения о динамике сывороточного уровня антител на фоне изменения концентрации аллергена в воздухе, полученные в настоящей работе, необходимы в дальнейшем при изучении сезонной динамики представленности IgE-секретирующих аллергенспецифичных клеток.

## Литература

1. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal*. 2004; 24 (5): 758–64. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00013904>.
2. Biedermann T, Winther L, Till SJ, Panzner P, Knulst A, Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2019; 74 (7): all.13758. <https://doi.org/10.1111/all.13758>.
3. Penagos M, Eifan AO, Durham SR, Scadding GW. Duration of Allergen Immunotherapy for Long-Term Efficacy in Allergic Rhinoconjunctivitis. *Current Treatment Options in Allergy*. 2018; 5 (3): 275–90. <https://doi.org/10.1007/s40521-018-0176-2>.
4. Balbino B, Conde E, Marichal T, Starkl P, Reber LL. Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018; (191): 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.015>.
5. Rudulier CD, Tonti E, James E, Kwok WW, Larché M. Modulation of CRTh2 expression on allergen specific T cells following peptide immunotherapy. *Allergy*. 2019; all.13867. <https://doi.org/10.1111/all.13867>.
6. Jiménez-Saiz R, Chu DK, Mandur TS, Walker TD, Gordon ME, Chaudhary R, et al. Lifelong memory responses perpetuate humoral TH2 immunity and anaphylaxis in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140 (6): 1604–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.018>.
7. Jiménez-Saiz R, Bruton K, Koenig JF, Waserman S, Jordana M. The IgE memory reservoir in food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 142 (5): 1441–3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.029>.
8. Beeh K, Beier J, Buhl R. Seasonal variations of serum-IgE and potential impact on dose-calculation of omalizumab (rhuMab-E25, anti-IgE). *Pneumologie*. 2004; 58 (08): 546–51. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818483>.
9. Sato K, Nakazawa T, Sahashi N, Kochibe N. Yearly and Seasonal Changes of Specific IgE to Japanese Cedar Pollen in a Young Population. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 1997; 79 (1): 57–61. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63085-2](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63085-2).
10. Gleich GJ, Jacob GL, Yunginger JW, Henderson LL. Measurement of the absolute levels of IgE antibodies in patients with ragweed hay fever. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1977; 60 (3): 188–98. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(77\)90123-3](https://doi.org/10.1016/0091-6749(77)90123-3).
11. Turchaninova MA, Davydov A, Britanova OV, Shugay M, Bikos V, Egorov ES, et al. High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding. *Nature Protocols*. 2016; 11 (9): 1599–616. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.093>.
12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nature Methods*. 2014; (11): 653. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2960>.
13. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nature Methods*. 2015; (12): 380. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2960>.



- org/10.1038/nmeth.3364.
14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
  15. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2016. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>.
  16. Gupta NT, Vander Heiden JA, Uduman M, Gadala-Maria D, Yaar G, Kleinstein SH. Change-O: a toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31 (20): 3356–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv359.
  17. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33 (7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
  18. Looney TJ, Lee JY, Roskin KM, Hoh RA, King J, Glanville J, et al. Human B-cell isotype switching origins of IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137 (2): 579–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.014>.
  19. Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, et al. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: Correlation of IgE<sup>+</sup> plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002; 130 (3): 370–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.02025.x>.
- ## References
1. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal*. 2004; 24 (5): 758–64. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00013904>.
  2. Biedermann T, Winther L, Till SJ, Panzner P, Knulst A, Valovirta E. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2019; 74 (7): all.13758. <https://doi.org/10.1111/all.13758>.
  3. Penagos M, Eifan AO, Durham SR, Scadding GW. Duration of Allergen Immunotherapy for Long-Term Efficacy in Allergic Rhinoconjunctivitis. *Current Treatment Options in Allergy*. 2018; 5 (3): 275–90. <https://doi.org/10.1007/s40521-018-0176-2>.
  4. Balbino B, Conde E, Marichal T, Starkl P, Reber LL. Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018; (191): 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.015>.
  5. Rudulier CD, Tonti E, James E, Kwok WW, Larché M. Modulation of CRTh2 expression on allergen specific T cells following peptide immunotherapy. *Allergy*. 2019; all.13867. <https://doi.org/10.1111/all.13867>.
  6. Jiménez-Saiz R, Chu DK, Mandur TS, Walker TD, Gordon ME, Chaudhary R, et al. Lifelong memory responses perpetuate humoral TH2 immunity and anaphylaxis in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 140 (6): 1604–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.018>.
  7. Jiménez-Saiz R, Bruton K, Koenig JF, Wasserman S, Jordana M. The IgE memory reservoir in food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 142 (5): 1441–3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.029>.
  8. Beeh K, Beier J, Buhl R. Seasonal variations of serum-IgE and potential impact on dose-calculation of omalizumab (rhuMab-E25, anti-IgE). *Pneumologie*. 2004; 58 (08): 546–51. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818483>.
  9. Sato K, Nakazawa T, Sahashi N, Kochibe N. Yearly and Seasonal Changes of Specific IgE to Japanese Cedar Pollen in a Young Population. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 1997; 79 (1): 57–61. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63085-2](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63085-2).
  10. Gleich GJ, Jacob GL, Yunginger JW, Henderson LL. Measurement of the absolute levels of IgE antibodies in patients with ragweed hay fever. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1977; 60 (3): 188–98. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(77\)90123-3](https://doi.org/10.1016/0091-6749(77)90123-3).
  11. Turchaninova MA, Davydov A, Britanova OV, Shugay M, Bikos V, Egorov ES, et al. High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding. *Nature Protocols*. 2016; 11 (9): 1599–616. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.093>.
  12. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nature Methods*. 2014; (11): 653. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2960>.
  13. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nature Methods*. 2015; (12): 380. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>.
  14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
  15. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2016. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>.
  16. Gupta NT, Vander Heiden JA, Uduman M, Gadala-Maria D, Yaar G, Kleinstein SH. Change-O: a toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31 (20): 3356–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv359.
  17. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33 (7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
  18. Looney TJ, Lee JY, Roskin KM, Hoh RA, King J, Glanville J, et al. Human B-cell isotype switching origins of IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 137 (2): 579–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.014>.
  19. Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, et al. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: Correlation of IgE<sup>+</sup> plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002; 130 (3): 370–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.02025.x>.

## ТОЧНОСТЬ ПРЕДИКЦИИ ПИГМЕНТАЦИИ ВОЛОС И ГЛАЗ ПО ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАРКЕРАМ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИЙ РОССИИ

О. П. Балановский<sup>1,2,3</sup>, В. С. Петрушенко<sup>1,2,4</sup>, И. О. Горин<sup>1,2,4</sup>, Ж. А. Кагазежева<sup>1,2</sup>, Н. В. Маркина<sup>2</sup>, Е. С. Кострюкова<sup>5</sup>, Н. А. Лейбова<sup>6</sup>, А. М. Маурер<sup>7</sup>, Е. В. Балановская<sup>1,3</sup>✉

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт (Научно-исследовательский университет), Москва, Россия

<sup>5</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва, Россия

<sup>6</sup> Институт этнологии и антропологии Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>7</sup> Научно-исследовательский институт и музей антропологии имени Д. Н. Анучина, Москва, Россия

Предикция цвета глаз и волос по генотипу становится распространенным инструментом в судебно-медицинской экспертизе и в исследованиях древних популяций. Для этого широко используется панель HlrPlex-S, разработанная на выборке голландцев и верифицированная для некоторых других популяций Западной Европы. Однако точность ее предсказаний для представителей других регионов мира не изучена. Особый интерес представляют популяции России, в которых (в отличие от большинства других популяций мира) присутствуют не только темные, но и светлые оттенки цвета волос и глаз. Целью работы было определить точность предикции цвета глаз и волос для популяций России. Мы изучили 144 представителя коренного населения России (аварцев, алеутов, бурят, ительменов, карел, коряков, марийцев, нанайцев, русских, рутульцев, чувашей, чукчей, эвенков, эвенов). Для всех индивидов были сделаны антропологические фотографии. На основании фотографий эксперты-антропологи проводили определение цвета глаз и волос. Для тех же индивидов проводили генотипирование SNP-маркеров панели HlrPlex. На основании генотипов предсказывали фенотипы и предсказанные фенотипы сопоставляли с реальными. Получена серия показателей точности HlrPlex для популяций Европейской части России и Сибири. В целом точность оказалась удовлетворительной, хотя и несколько сниженной по сравнению с точностью для популяций Западной Европы. В будущих исследованиях возможно провести поиск дополнительных маркеров, повышающих точность предикции для популяций России.

**Ключевые слова:** цвет глаз, цвет волос, генетические маркеры, предикция, генофонд, коренное население, HlrPlex-S

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (Госконтракт № 011–17 от 26.09.2017) в рамках научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация» (работы по генотипированию, по фенотипированию европейских образцов, подготовке текста статьи) и Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (работы по фенотипированию сибирских образцов, созданию базы данных, анализу данных).

**Благодарности:** благодарим всех доноров образцов. Коллекция ДНК и антропологических фотографий предоставлена АНО «Биобанк Северной Евразии».

**Информация о вкладе авторов:** Е. В. Балановская — дизайн и руководство исследованием; В. С. Петрушенко и И. О. Горин — биоинформатический анализ и анализ литературы, написание текста статьи; А. М. Маурер, Н. А. Лейбова — фенотипирование образцов; Ж. А. Кагазежева — фенотипирование образцов, фотографирование и обработка фотографий, работа с табличными данными; О. П. Балановский и Н. В. Маркина — написание текста статьи; Е. С. Кострюкова — генотипирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра (протокол № 3/1 от 5 сентября 2018 г.), выполнено на образцах, полученных в ходе популяционно-генетического обследования генофонда; все обследуемые подписали добровольное информированное согласие.

✉ Для корреспонденции: Елена Владимировна Балановская  
ул. Москворечье, д. 1, Медико-генетический научный центр, г. Москва, 115522; balanovska@mail.ru

Статья получена: 22.10.2019 Статья принята к печати: 26.10.2019 Опубликована онлайн: 28.10.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.069

## THE ACCURACY OF PREDICTING EYE AND HAIR PIGMENTATION BASED ON GENETIC MARKERS IN RUSSIAN POPULATIONS

Balanovsky OP<sup>1,2,3</sup>, Petruschenko VS<sup>1,2,4</sup>, Gorin IO<sup>1,2,4</sup>, Kagazheva ZhA<sup>1,2</sup>, Markina NV<sup>2</sup>, Kostyukova ES<sup>5</sup>, Leybova NA<sup>6</sup>, Maurer AM<sup>7</sup>, Balanovska EV<sup>1,3</sup>✉

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Institute of Anthropology and Ethnography, Moscow, Russia

<sup>7</sup> Anuchin Research Institute and Museum of Anthropology, Moscow, Russia

Prediction of eye and hair color from DNA is being increasingly employed in forensic medicine and the studies of ancient populations. HlrPlex-S is a prediction tool that was developed using the data collected from Dutch donors and verified for some other European populations. The accuracy of its predictions for other world populations has not been studied yet. Unlike the majority of other world populations, Russian populations are characterized not only by dark but also by light color eyes and hair and therefore pose a special interest in this respect. The aim of this work was to determine the accuracy of eye and hair color predictions for Russian populations. We studied 144 representatives of indigenous populations of Russia (Avars, Aleuts, Buryats, Itelmens, Karelians, Koryaks, Maris, Nanais, Russians, Rutulians, Chuvashes, Chukchi, Evenks, and Evens). Anthropological photos were taken of all individuals. Based on the photos, the anthropologists identified eye and hair color phenotypes. SNP-markers were genotyped using the HlrPlex panel. Based on the genotypes, the phenotypes were predicted and subsequently compared to the actual phenotypes. We obtained a series of HlrPlex accuracy indicators for the populations inhabiting the European part of Russia and Siberia. On the whole, prediction accuracy was satisfactory, although a bit lower than for West European populations. Further research could look for additional markers increasing the accuracy of predictions for Russian populations.

**Keywords:** eye color, hair color, genetic markers, prediction, gene pool, indigenous people, HlrPlex-S

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Science and Education of the Russian Federation (State contract 011–17 dated 26.09.2017) as part of the Union State Research and Technical Project *DNA-based identification*, which included genotyping and phenotyping of European samples and preparation of this manuscript, and the State assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics (phenotyping of Siberian samples, creating a database, data analysis).

**Acknowledgements:** we thank all donors participating in our study. DNA samples and anthropological images were provided by the Biobank of North Eurasia.

**Author contribution:** Balanovska EV — supervision and study design; Petruschenko VS, Gorin IO — bioinformatic analysis, literature analysis, manuscript preparation; Maurer AM, Leybova NA — phenotyping of the samples; Kagazheva ZhA — phenotyping of the samples, photography, photo processing, tabular data processing; Balanovsky OP, Markina NV — manuscript preparation; Kostyukova ES — genotyping.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (Protocol No 3/1 dated September 5, 2018). The samples used in this work were obtained from a population genetic study. Informed consent was obtained from all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Elena V. Balanovska  
Moskvorechie, 1, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522; balanovska@mail.ru

Received: 22.10.2019 Accepted: 26.10.2019 Published online: 28.10.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.069

В течение последней декады определение вероятного цвета глаз и волос по ДНК стало важной частью судебно-медицинских и популяционно-генетических исследований, поскольку позволяет определить вероятную внешность человека, информация о котором ограничена его биологическим образцом. Такое определение используют при поиске правонарушителей, идентификации жертв катастроф, при изучении образцов ДНК из древних популяций, в генетической генеалогии и других областях исследований. Во множестве исследований [1–10] выявлены некоторые ключевые гены и сайты внутри этих генов, вовлеченные в фенотипы по пигментации. Наиболее важные сайты были включены в HlrPlex-систему и ее расширенный вариант HlrPlex-S, позволяющий определять и вероятный цвет кожи [8–11]. Генотипирование 25 маркеров (SNP и инделов) [10] помогает быстро и надежно предсказывать цвет глаз и волос (HlrPlex); дополнительные 16 маркеров предсказывают также цвет кожи (HlrPlex-S).

При публикации этой системы предикции пигментации по генотипу [8–11] показано, что такое предсказание надежно для популяций европейского происхождения, однако эту систему и разрабатывали на образцах из европейских популяций, в основном для голландцев (верификация проведена на населении Польши, Греции и Ирландии). Точность HlrPlex для популяций из других регионов мира не проверяли. Конечно, для населения большинства других континентов проверка этой системы не информативна, поскольку большинство неевропейских популяций имеют только темные глаза и темные волосы. Но в некоторых популяциях из пограничных регионов между Европой и Азией (например, Алтай, Кавказа, Зауралья) распространен как темный, так и светлый фенотип глаз/волос. При этом они генетически значительно отличаются от западных европейцев [12], а значит, могут отличаться и по спектру генетических маркеров, определяющих степень пигментации. Даже популяции из уральского региона, генетически более близкие к западноевропейцам, чем популяции Кавказа и Западной Сибири, все же генетически значительно более удалены от голландцев, чем ирландцы, поляки и греки, образцы которых использовали для верификации HlrPlex.

Целью работы было в ходе экспедиционных обследований коренного населения и фотографирования индивидов оценить предсказательную силу системы HlrPlex-S для цвета глаз и волос на различных популяциях Северной Евразии.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Сбор образцов и фенотипирование

В ходе экспедиционных обследований генофондов, проводимых нашим научным коллективом [13], были сделаны антропологические фотографии представителей коренного населения различных народов России и сопредельных стран. Обследование популяций, включенных в настоящее исследование, проводили в ходе нескольких полевых выездов в 2015–2019 гг. Критериями включения в исследование были: 1) возраст старше 18 лет; 2) самоидентификация четырех предков обследуемого (двух дедушек и двух бабушек) как принадлежащих к данному народу; 3) наличие антропологической фотографии обследуемого; 4) наличие письменного информированного

согласия на участие в обследовании. Критерии исключения: 1) недостаточное качество фотографий, не позволяющее надежно определить цвет глаз и волос; 2) отсутствие полного профиля генотипированных маркеров.

В результате применения данных критериев в исследование включили 144 индивидуума из следующих популяций:

1) Европейская часть России — русские, марийцы, чуваш, карелы, рутульцы, аварцы ( $n = 66$ , из них 65 мужчин и 1 женщина);

2) Сибирь и Дальний Восток — буряты, эвенки, эвены, нанайцы, коряки, ительмены, чукчи, алеуты ( $n = 78$ , из них 45 мужчин и 33 женщины).

Фенотипы цвета глаз и волос определяли по фотографиям три эксперта: двое — физические антропологи с большим опытом фенотипирования, третий — генетик, специально обученный фенотипированию. Все эксперты выполняли фенотипирование независимо, и в тех случаях, когда определенные ими фенотипы различались, проводили тщательное совместное определение до достижения консенсусной оценки. Цвет глаз — темный, светлый или смешанный — был успешно определен для всех 144 индивидов. Цвет волос был определен для меньшего числа образцов в связи с невозможностью определения натурального цвета волос женщин по фотографиям, а также наличия некоторого числа мужчин с сединой или облысением. Результаты фенотипирования представлены в табл. 1.

### Генотипирование и предикция цвета глаз и волос по генотипу

ДНК из образцов крови или слюны выделяли классическим методом фенол-хлороформной экстракции [14]. Генотипирование проводили на основе использования биочипа Infinium Omni5Exome-4 v1.3 BeadChip (Illumina; США) на платформе iScan. Качество оценивали с помощью рекомендованного производителем программного обеспечения GenomeStudio v2.0. (Illumina; США). Для всех образцов интегральная оценка качества (CR — CallRate) составила выше 0,99, что говорит о пригодности полученных результатов для дальнейшей обработки. Используемая панель включает более 4 млн SNP-маркеров, поэтому полученные результаты применяют в целом ряде исследований. В рамках данного исследования из этого массива данных были извлечены генотипы по 29 маркерам, входящим в панель HlrPlex и используемым для предсказания цвета глаз, волос и кожи. Всего в HlrPlex-S 25 маркеров цвета глаз и волос и 16 маркеров цвета кожи. Из этих маркеров нами успешно генотипированы 19 маркеров предсказания цвета глаз и волос и 10 маркеров, по которым предсказывают цвет кожи. Панель HlrPlex допускает использование неполного профиля генотипирования (ключевое значение имеют несколько обязательных маркеров, остальные лишь немного увеличивают точность предикции), поэтому использование 19 маркеров из 25 достаточно для качественной предикции с помощью HlrPlex (маркеры для предсказания цвета кожи не были учтены в нашем исследовании). Пояснения требует обработка пропущенных генотипов только по одному маркеру — rs312262906. При использовании системы HlrPlex-S без этого маркера были получены предсказания только цвета глаз, но не цвета волос. Данный полиморфизм приводит к сдвигу рамки считывания в гене *MC1R* и ассоциирован

Таблица 1. Фенотипы (цвет глаз и волос), определенные по антропологическим фотографиям

| Образец  | Метапопуляция            | Этнос    | Пол | Возраст на момент сбора | Цвет волос       | Цвет глаз |
|----------|--------------------------|----------|-----|-------------------------|------------------|-----------|
| FES-0001 | Сибирь                   | эвенки   | м   | 63                      | не анализируется | темный    |
| FES-0002 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 33                      | темные           | темный    |
| FES-0003 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 42                      | темные           | темный    |
| FES-0004 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 29                      | темные           | темный    |
| FES-0005 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 58                      | темные           | темный    |
| FES-0006 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 62                      | темные           | светлый   |
| FES-0007 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 68                      | темные           | темный    |
| FES-0008 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 64                      | не анализируется | темный    |
| FES-0009 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 52                      | темные           | темный    |
| FES-0010 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 55                      | темные           | темный    |
| FES-0011 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 46                      | не анализируется | темный    |
| FES-0012 | Сибирь                   | нанайцы  | м   | 51                      | темные           | темный    |
| FES-0013 | Сибирь                   | эвены    | м   | 52                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0014 | Сибирь                   | эвены    | м   | 21                      | темные           | светлый   |
| FES-0015 | Сибирь                   | эвены    | м   | 39                      | темные           | темный    |
| FES-0016 | Сибирь                   | эвены    | м   | 21                      | темные           | темный    |
| FES-0017 | Сибирь                   | эвены    | м   | 20                      | темные           | темный    |
| FES-0018 | Европейская часть России | башкиры  | м   | 64                      | не анализируется | темный    |
| FES-0019 | Сибирь                   | буряты   | м   | 76                      | не анализируется | темный    |
| FES-0020 | Сибирь                   | буряты   | м   | 68                      | не анализируется | темный    |
| FES-0021 | Сибирь                   | буряты   | м   | 50                      | темные           | темный    |
| FES-0022 | Сибирь                   | буряты   | м   | 68                      | темные           | темный    |
| FES-0023 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 33                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0024 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 51                      | светлые          | светлый   |
| FES-0025 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 53                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0026 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 42                      | темные           | светлый   |
| FES-0027 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 41                      | темные           | темный    |
| FES-0028 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 36                      | рыжие            | светлый   |
| FES-0029 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 55                      | не анализируется | темный    |
| FES-0030 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 45                      | темные           | темный    |
| FES-0031 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 33                      | рыжие            | темный    |
| FES-0032 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 46                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0033 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 32                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0034 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 41                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0035 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 49                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0036 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 53                      | не анализируется | темный    |
| FES-0037 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 46                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0038 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 57                      | темные           | темный    |
| FES-0039 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 42                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0040 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 47                      | рыжие            | светлый   |
| FES-0041 | Европейская часть России | чуваша   | м   | 23                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0042 | Европейская часть России | аварцы   | м   | 52                      | не анализируется | темный    |
| FES-0043 | Европейская часть России | аварцы   | м   | 55                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0044 | Европейская часть России | аварцы   | м   | 20                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0045 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 36                      | не анализируется | темный    |
| FES-0046 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 38                      | темные           | темный    |
| FES-0047 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 83                      | не анализируется | темный    |
| FES-0048 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 57                      | не анализируется | темный    |
| FES-0049 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 55                      | темные           | темный    |
| FES-0050 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 56                      | темные           | темный    |
| FES-0051 | Европейская часть России | рутульцы | м   | 65                      | не анализируется | темный    |
| FES-0052 | Сибирь                   | эвены    | ж   | 46                      | не анализируется | темный    |

Продолжение таблицы 1

| Образец  | Метапопуляция | Этнос     | Пол | Возраст на момент сбора | Цвет волос       | Цвет глаз |
|----------|---------------|-----------|-----|-------------------------|------------------|-----------|
| FES-0053 | Сибирь        | коряки    | ж   | 74                      | не анализируется | темный    |
| FES-0054 | Сибирь        | эвены     | м   | 50                      | темные           | темный    |
| FES-0055 | Сибирь        | эвены     | ж   | 18                      | не анализируется | темный    |
| FES-0056 | Сибирь        | эвены     | ж   | 56                      | не анализируется | темный    |
| FES-0057 | Сибирь        | эвены     | ж   | 51                      | не анализируется | темный    |
| FES-0058 | Сибирь        | чукчи     | ж   | 47                      | не анализируется | темный    |
| FES-0059 | Сибирь        | коряки    | ж   | 68                      | не анализируется | темный    |
| FES-0060 | Сибирь        | ительмены | ж   | 56                      | не анализируется | темный    |
| FES-0061 | Сибирь        | коряки    | ж   | 56                      | не анализируется | темный    |
| FES-0062 | Сибирь        | коряки    | ж   | 34                      | не анализируется | темный    |
| FES-0063 | Сибирь        | эвены     | м   | 63                      | не анализируется | темный    |
| FES-0064 | Сибирь        | эвены     | ж   | 66                      | не анализируется | темный    |
| FES-0065 | Сибирь        | камчадалы | ж   | 82                      | не анализируется | темный    |
| FES-0066 | Сибирь        | ительмены | м   | 62                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0067 | Сибирь        | ительмены | ж   | 53                      | не анализируется | темный    |
| FES-0068 | Сибирь        | алеуты    | ж   | 66                      | не анализируется | темный    |
| FES-0069 | Сибирь        | алеуты    | ж   | 35                      | не анализируется | темный    |
| FES-0070 | Сибирь        | алеуты    | м   | 42                      | темные           | темный    |
| FES-0071 | Сибирь        | алеуты    | ж   | 72                      | не анализируется | темный    |
| FES-0072 | Сибирь        | алеуты    | ж   | 69                      | не анализируется | темный    |
| FES-0073 | Сибирь        | алеуты    | м   | 63                      | темные           | темный    |
| FES-0074 | Сибирь        | алеуты    | ж   | 53                      | не анализируется | темный    |
| FES-0075 | Сибирь        | коряки    | м   | 59                      | не анализируется | темный    |
| FES-0076 | Сибирь        | коряки    | м   | 62                      | темные           | темный    |
| FES-0077 | Сибирь        | чукчи     | ж   | 69                      | не анализируется | темный    |
| FES-0078 | Сибирь        | коряки    | м   | 69                      | темные           | темный    |
| FES-0079 | Сибирь        | коряки    | м   | 43                      | темные           | светлый   |
| FES-0080 | Сибирь        | коряки    | м   | 55                      | темные           | темный    |
| FES-0081 | Сибирь        | коряки    | ж   | 52                      | не анализируется | темный    |
| FES-0082 | Сибирь        | коряки    | ж   | 55                      | не анализируется | темный    |
| FES-0083 | Сибирь        | эвены     | ж   | 55                      | не анализируется | темный    |
| FES-0084 | Сибирь        | коряки    | ж   | 57                      | не анализируется | темный    |
| FES-0085 | Сибирь        | чукчи     | м   | 27                      | темные           | темный    |
| FES-0086 | Сибирь        | эвены     | м   | 48                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0087 | Сибирь        | чукчи     | м   | 58                      | темные           | темный    |
| FES-0088 | Сибирь        | чукчи     | м   | 58                      | темные           | темный    |
| FES-0089 | Сибирь        | чукчи     | м   | 56                      | не анализируется | темный    |
| FES-0090 | Сибирь        | коряки    | ж   | 31                      | не анализируется | темный    |
| FES-0091 | Сибирь        | эвены     | м   | 35                      | темные           | темный    |
| FES-0092 | Сибирь        | чукчи     | м   | 34                      | темные           | темный    |
| FES-0093 | Сибирь        | ительмены | ж   | 59                      | не анализируется | темный    |
| FES-0094 | Сибирь        | ительмены | ж   | 58                      | не анализируется | темный    |
| FES-0095 | Сибирь        | ительмены | м   | 49                      | темные           | темный    |
| FES-0096 | Сибирь        | ительмены | ж   | 70                      | не анализируется | темный    |
| FES-0097 | Сибирь        | ительмены | м   | 38                      | темные           | темный    |
| FES-0098 | Сибирь        | ительмены | ж   | 60                      | не анализируется | темный    |
| FES-0099 | Сибирь        | ительмены | ж   | 60                      | не анализируется | темный    |
| FES-0100 | Сибирь        | ительмены | м   | 20                      | темные           | темный    |
| FES-0101 | Сибирь        | ительмены | ж   | 55                      | не анализируется | темный    |
| FES-0102 | Сибирь        | ительмены | ж   | 40                      | не анализируется | темный    |
| FES-0103 | Сибирь        | ительмены | м   | 39                      | темные           | темный    |
| FES-0104 | Сибирь        | ительмены | ж   | 56                      | не анализируется | темный    |



Окончание таблицы 1

| Образец  | Метапопуляция            | Этнос     | Пол | Возраст на момент сбора | Цвет волос       | Цвет глаз |
|----------|--------------------------|-----------|-----|-------------------------|------------------|-----------|
| FES-0105 | Сибирь                   | ительмены | ж   | 71                      | не анализируется | темный    |
| FES-0106 | Сибирь                   | ительмены | м   | 59                      | не анализируется | темный    |
| FES-0107 | Сибирь                   | ительмены | ж   | 47                      | не анализируется | темный    |
| FES-0108 | Сибирь                   | ительмены | м   | 58                      | темные           | темный    |
| FES-0109 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 64                      | не анализируется | темный    |
| FES-0110 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 56                      | темные           | светлый   |
| FES-0111 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 59                      | не анализируется | темный    |
| FES-0112 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 38                      | темные           | светлый   |
| FES-0113 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 49                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0114 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 58                      | темные           | темный    |
| FES-0115 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 50                      | темные           | светлый   |
| FES-0116 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 54                      | темные           | темный    |
| FES-0117 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 46                      | темные           | смешанный |
| FES-0118 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 45                      | темные           | светлый   |
| FES-0119 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 70                      | не анализируется | темный    |
| FES-0120 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 66                      | темные           | смешанный |
| FES-0121 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 66                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0122 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 23                      | рыжие            | смешанный |
| FES-0123 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 51                      | светлые          | смешанный |
| FES-0124 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 37                      | рыжие            | светлый   |
| FES-0125 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 58                      | не анализируется | темный    |
| FES-0126 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 64                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0127 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 61                      | не анализируется | темный    |
| FES-0128 | Европейская часть России | марийцы   | м   | 57                      | промежуточные    | темный    |
| FES-0129 | Европейская часть России | русские   | м   | 59                      | темные           | светлый   |
| FES-0130 | Европейская часть России | русские   | м   | 34                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0131 | Европейская часть России | русские   | м   | 34                      | темные           | светлый   |
| FES-0132 | Европейская часть России | русские   | м   | 40                      | темные           | темный    |
| FES-0133 | Европейская часть России | русские   | м   | 32                      | темные           | светлый   |
| FES-0134 | Европейская часть России | русские   | м   | 52                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0135 | Европейская часть России | русские   | м   | 30                      | темные           | темный    |
| FES-0136 | Европейская часть России | русские   | м   | 41                      | темные           | светлый   |
| FES-0137 | Европейская часть России | карелы    | м   | 75                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0138 | Европейская часть России | карелы    | м   | 79                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0139 | Европейская часть России | карелы    | м   | 70                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0140 | Европейская часть России | карелы    | м   | 66                      | промежуточные    | светлый   |
| FES-0141 | Европейская часть России | карелы    | ж   | 79                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0142 | Европейская часть России | карелы    | м   | 68                      | темные           | светлый   |
| FES-0143 | Европейская часть России | карелы    | м   | 59                      | не анализируется | светлый   |
| FES-0144 | Европейская часть России | карелы    | м   | 62                      | темные           | светлый   |

с рыжим цветом волос. Частота встречаемости этого полиморфизма, по данным ExAC, составляет 0,0038 для Европы и 0,0000 (менее 0.0001) для Азии, поэтому вероятность присутствия хотя бы двух альтернативных аллелей в нашей выборке ничтожна. Это позволило нам для целей получения предсказания цвета волос присвоить данному маркеру генотип 0/0 для всех образцов.

Отбор генотипов проводили с помощью программного обеспечения PLINK 1.9 [15]. Полученные генотипы представлены в табл. 2.

С использованием системы HirisPlex-S с помощью онлайн-инструмента Департамента генетической

идентификации Erasmus MC [16] были получены предсказания цвета глаз (светлые, промежуточные или темные) и волос (рыжие, светлые, промежуточные или темные) для всех образцов.

#### Оценка точности предсказания цвета глаз и волос

Фенотипы, предсказанные системой HirisPlex на основе генотипов, сопоставляли с истинными фенотипами, определенными антропологами по фотографиям, и рассчитывали статистические показатели качества предсказания для всех 144 образцов. Полученные нами

Таблица 2. Генотипы маркеров, входящих в панель HirisPlex для предсказания цвета глаз и волос

| RS                         | rs11547464      | rs1805005       | rs1805006       | rs1805007       | rs2228479       | rs1110400       | rs28777         | rs12821256      | rs4959270       | rs12203592      | rs1042602       | rs1800407       | rs2402130       | rs12913832      |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Пред-<br>сказание<br>цвета | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос |
| CHROM                      | 16              | 16              | 16              | 16              | 16              | 16              | 5               | 12              | 6               | 6               | 11              | 15              | 14              | 15              |
| POS                        | 89986091        | 89985844        | 89985918        | 89986117        | 89985940        | 89986130        | 33958959        | 89328335        | 457748          | 396321          | 88911696        | 28230318        | 92801203        | 28365618        |
| REF                        | G               | C               | C               | G               | G               | A               | C               | A               | C               | G               | C               | G               | A               | A               |
| ALT                        | A               | A               | A               | A               | A               | G               | A               | G               | A               | A               | A               | A               | G               | G               |
| FES-0001                   | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0002                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0003                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0004                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0005                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0006                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0007                   | ./.             | 0/1             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0008                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0009                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0010                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0011                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0012                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0013                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0014                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0015                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0016                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0017                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0018                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0019                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0020                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0021                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0022                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0023                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0024                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 1/1             |
| FES-0025                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0026                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             |
| FES-0027                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0028                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 1/1             |
| FES-0029                   | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0030                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0031                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0032                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0033                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0034                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0035                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0036                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0037                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0038                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0039                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             |
| FES-0040                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             |
| FES-0041                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 1/1             |
| FES-0042                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0043                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0044                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             |
| FES-0045                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0046                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0047                   | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0048                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0049                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0050                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0051                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0052                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |

Продолжение таблицы 2

| rs2378249       | rs12896399      | rs1393350       | rs683           | rs3114908       | rs1800414 | rs10756819 | rs17128291 | rs1129038 | rs1667394 | rs1126809 | rs1470608 | rs1426654 | rs6059655 | rs8051733 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | кожи      | кожи       | кожи       | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      |
| 20              | 14              | 11              | 9               | 16              | 15        | 9          | 14         | 15        | 15        | 11        | 15        | 15        | 20        | 16        |
| 33218090        | 92773663        | 89011046        | 12709305        | 89383725        | 28197037  | 16858084   | 92882826   | 28356859  | 28530182  | 89017961  | 28288121  | 48426484  | 32665748  | 90024206  |
| A               | C               | G               | C               | G               | A         | A          | A          | G         | A         | G         | A         | A         | G         | A         |
| G               | A               | A               | A               | A               | G         | G          | G          | A         | G         | A         | C         | G         | A         | G         |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0       | 1/1        | 1/1        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/1        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | ./.       | 0/1        | 0/0        | ./.       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | ./.       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/1             | 1/1       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | ./.       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/1             | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | ./.       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 1/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 1/1        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 1/1       | 0/0       | ./.       | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       |
| 0/0             | 0/1             | 0/1             | 1/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | ./.       | ./.       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | ./.       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1             | 0/0             | 0/1             | 1/1             | 0/0             | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | ./.       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/1             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | ./.       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |

Продолжение таблицы 2

| RS                         | rs11547464      | rs1805005       | rs1805006       | rs1805007       | rs2228479       | rs1110400       | rs28777         | rs12821256      | rs4959270       | rs12203592      | rs1042602       | rs1800407       | rs2402130       | rs12913832      |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Пред-<br>сказание<br>цвета | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос | глаз и<br>волос |
| CHROM                      | 16              | 16              | 16              | 16              | 16              | 16              | 5               | 12              | 6               | 6               | 11              | 15              | 14              | 15              |
| POS                        | 89986091        | 89985844        | 89985918        | 89986117        | 89985940        | 89986130        | 33958959        | 89328335        | 457748          | 396321          | 88911696        | 28230318        | 92801203        | 28365618        |
| REF                        | G               | C               | C               | G               | G               | A               | C               | A               | C               | G               | C               | G               | A               | A               |
| ALT                        | A               | A               | A               | A               | A               | G               | A               | G               | A               | A               | A               | A               | G               | G               |
| FES-0053                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0054                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0055                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0056                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0057                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0058                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0059                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0060                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0061                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0062                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0063                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0064                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0065                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0066                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | ./.             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0067                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0068                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0069                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 1/1             |
| FES-0070                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0071                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0072                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0073                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0074                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | ./.             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0075                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0076                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0077                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0078                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0079                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0080                   | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0081                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0082                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0083                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0084                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0085                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0086                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0087                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0088                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0089                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0090                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | ./.             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0091                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             |
| FES-0092                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0093                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0094                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0095                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0096                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0097                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0098                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 1/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0099                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0100                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/1             |
| FES-0101                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0102                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |
| FES-0103                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             |
| FES-0104                   | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/1             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             | 0/0             |

Продолжение таблицы 2

| rs2378249    | rs12896399   | rs1393350    | rs683        | rs3114908    | rs1800414 | rs10756819 | rs17128291 | rs1129038 | rs1667394 | rs1126809 | rs1470608 | rs1426654 | rs6059655 | rs8051733 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | кожи      | кожи       | кожи       | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      |
| 20           | 14           | 11           | 9            | 16           | 15        | 9          | 14         | 15        | 15        | 11        | 15        | 15        | 20        | 16        |
| 33218090     | 92773663     | 89011046     | 12709305     | 89383725     | 28197037  | 16858084   | 92882826   | 28356859  | 28530182  | 89017961  | 28288121  | 48426484  | 32665748  | 90024206  |
| A            | C            | G            | C            | G            | A         | A          | A          | G         | A         | G         | A         | A         | G         | A         |
| G            | A            | A            | A            | A            | G         | G          | G          | A         | G         | A         | C         | G         | A         | G         |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/1        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 1/1        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/1       | 0/1       | 1/1       | 0/1       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | ./.       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1       | 0/0        | 0/1        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/0       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 1/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/1       | 0/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/0       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |



Продолжение таблицы 2

| RS                 | rs11547464   | rs1805005    | rs1805006    | rs1805007    | rs2228479    | rs1110400    | rs28777      | rs12821256   | rs4959270    | rs12203592   | rs1042602    | rs1800407    | rs2402130    | rs12913832   |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Предсказание цвета | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос |
| CHROM              | 16           | 16           | 16           | 16           | 16           | 16           | 5            | 12           | 6            | 6            | 11           | 15           | 14           | 15           |
| POS                | 89986091     | 89985844     | 89985918     | 89986117     | 89985940     | 89986130     | 33958959     | 89328335     | 457748       | 396321       | 88911696     | 28230318     | 92801203     | 28365618     |
| REF                | G            | C            | C            | G            | G            | A            | C            | A            | C            | G            | C            | G            | A            | A            |
| ALT                | A            | A            | A            | A            | A            | G            | A            | G            | A            | A            | A            | A            | G            | G            |
| FES-0105           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0106           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0107           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0108           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          |
| FES-0109           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0110           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0111           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0112           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0113           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0114           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0115           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0116           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0117           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0118           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 1/1          |
| FES-0119           | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0120           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0121           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0122           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0123           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0124           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0125           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0126           | 0/1          | 0/1          | ./.          | ./.          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0127           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          |
| FES-0128           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0129           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | ./.          | 1/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | ./.          | 1/1          |
| FES-0130           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0131           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0132           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          |
| FES-0133           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0134           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          |
| FES-0135           | 1/1          | 1/1          | 1/1          | 0/1          | ./.          | 0/0          | ./.          | 0/0          | ./.          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          |
| FES-0136           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 1/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 1/1          |
| FES-0137           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          |
| FES-0138           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          |
| FES-0139           | 0/0          | ./.          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0140           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0141           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0142           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0143           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |
| FES-0144           | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          |

шкалы, состоящие из пяти градаций пигментации глаз и волос, конвертировали в трехградационные шкалы, чтобы фенотипирование было сопоставимо с результатами по HirisPlex-S.

Для того чтобы проанализировать точность результатов предсказаний, полученных с помощью системы HirisPlex-S, оценивали следующие параметры качества алгоритма:

– precision (отношение истинно положительных значений к общему количеству образцов, которые классификатор отнес к данному классу);

– recall (отношение количества истинно положительных значений к общему количеству образцов этого класса);

– accuracy (доля данных, для которых класс был определен правильно);

–  $F_1$ -мера (среднее гармоническое между precision и recall классификатора);

– показатели AUC (area under curve — площадь под кривой) для ROC-кривых (график зависимости доли истинно положительных результатов относительно общего количества образцов от доли ложноположительных значений относительно общего количества образцов при варьировании порога решающего правила).

Значения этих оценок качества представлены в табл. 3 и 4.

Окончание таблицы 2

| rs2378249    | rs12896399   | rs1393350    | rs683        | rs3114908    | rs1800414 | rs10756819 | rs17128291 | rs1129038 | rs1667394 | rs1126809 | rs1470608 | rs1426654 | rs6059655 | rs8051733 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | глаз и волос | кожи      | кожи       | кожи       | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      | кожи      |
| 20           | 14           | 11           | 9            | 16           | 15        | 9          | 14         | 15        | 15        | 11        | 15        | 15        | 20        | 16        |
| 33218090     | 92773663     | 89011046     | 12709305     | 89383725     | 28197037  | 16858084   | 92882826   | 28356859  | 28530182  | 89017961  | 28288121  | 48426484  | 32665748  | 90024206  |
| A            | C            | G            | C            | G            | A         | A          | A          | G         | A         | G         | A         | A         | G         | A         |
| G            | A            | A            | A            | A            | G         | G          | G          | A         | G         | A         | C         | G         | A         | G         |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/1        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       |
| 1/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/0       | 1/1       | ./.       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/1          | 1/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 1/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/1        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/1       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 1/1          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 1/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/1        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/1          | ./.          | 0/1          | 0/0       | 1/1        | 0/1        | 0/1       | ./.       | 0/1       | ./.       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/1        | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/1       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | ./.       | 1/1       | 0/0       | ./.       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/1          | 1/1          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 0/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | ./.        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/1          | 0/1          | 0/1          | 0/1          | ./.          | ./.       | ./.        | 0/0        | 1/1       | 0/1       | 1/1       | 0/1       | 0/0       | 1/1       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 0/1          | 0/0       | 0/0        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 1/1        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/1       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/1          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/0          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 1/1          | 0/0          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       | 0/0       | 0/0       | 0/0       |
| 0/0          | 0/1          | 0/0          | 0/1          | 1/1          | 0/0       | 0/1        | 0/0        | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 1/1       | 0/0       | 0/0       | 0/1       |

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы провели фотографирование 144 представителей коренного населения Европейской части России и Сибири. Образцы ДНК тех же 144 индивидов были генотипированы по маркерам, входящим в панель HirisPlex. Составили комбинированную базу, включающую фенотипические и генотипические данные по каждому индивиду.

Для оценки качества стандартной системы предсказания цвета глаз и волос (HirisPlex-S) на новых фенотипированных популяциях мы предсказали цвет глаз и волос по генотипу, используя онлайн-ресурс [16]. В табл. 5 представлены

результаты предсказания цвета глаз для каждого индивида. В целом, табл. 1 и 5 позволяют сравнить реальные и предсказанные фенотипы для каждого отдельного образца. Показатели качества предсказания для всего массива данных представлены в табл. 3.

Значения наиболее часто используемого показателя качества (AUC) по разным классам колеблются от 0,89 до 0,59 и в среднем составляют 0,79. Эти показатели, рассчитанные для популяций России, несколько снижены по сравнению с аналогичными показателями для Западной Европы (0,89). Например, для светлых глаз в Западной Европе AUC составляет 0,94, а в России — 0,89. Снижение

Таблица 3. Показатели точности панели HirisPlex для популяций Западной Европы и России

|                      | Для популяций Западной Европы | Для популяций России |           |          |        |
|----------------------|-------------------------------|----------------------|-----------|----------|--------|
|                      | AUC                           | AUC                  | Precision | Accuracy | Recall |
| Светлые глаза        | 0,94                          | 0,89                 | 0,89      | 0,88     | 0,63   |
| Смешанный цвет глаз  | 0,74                          | –                    | –         | –        | –      |
| Темные глаза         | 0,95                          | 0,89                 | 0,85      | 0,87     | 0,98   |
| Рыжие волосы         | 0,93                          | 0,59                 | 0,33      | 0,92     | 0,2    |
| Светлые волосы       | 0,81                          | –                    | –         | –        | –      |
| Смешанный цвет волос | 0,74                          | 0,72                 | 0,32      | 0,66     | 0,56   |
| Темные волосы        | 0,86                          | 0,84                 | 0,94      | 0,68     | 0,57   |

Таблица 4. Показатели точности панели HirisPlex для регионов России

|               | Европейская часть России | Сибирь |
|---------------|--------------------------|--------|
| Светлые глаза | 0,89                     | 0,57   |
| Темные глаза  | 0,86                     | 0,56   |

можно наблюдать по всем классам цвета и глаз, и волос. Отметим, что в связи с малочисленностью в нашей выборке двух фенотипических классов — смешанных оттенков глаз и светлых волос — мы не приводим в таблице показатели точности для этих классов. При необходимости они могут быть рассчитаны из первичных данных табл. 1 и 5. Они еще более снижены по сравнению с аналогичными показателями для Западной Европы, но объем выборки для этих классов — менее пяти индивидов — не позволяет доверять показателям для этих двух классов.

Популяции России генетически чрезвычайно гетерогенны, и мы намеренно включили в выборку генетически контрастные группы коренного населения — Европейской части России и Сибири. Табл. 4 демонстрирует качество предикции цвета глаз HirisPlex для этих двух метапопуляций

(качество предикции цвета волос не оценивали в связи с меньшим объемом выборки, см. Пациенты и методы). Оказалось, что точность предсказания цвета глаз для популяций Европейской части России близка к точности предсказания для объединенной выборки, — можно наблюдать некоторое снижение по сравнению с Западной Европой, но в целом приемлемую точность (AUC около 0,8). Ситуация для популяций Сибири оказалась значительно хуже: показатели AUC около 0,6.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основой нашего исследования послужила коллекция антропологических фотографий представителей различных групп коренного народонаселения России. Фотографии,

Таблица 5. Фенотипы (цвет глаз и волос), предсказанные по генотипам панели HirisPlex

| Образец  | Предсказанный цвет глаз | Предсказанный цвет волос |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| FES-0001 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0002 | темный                  | темные                   |
| FES-0003 | темный                  | темные                   |
| FES-0004 | темный                  | темные                   |
| FES-0005 | темный                  | темные                   |
| FES-0006 | темный                  | темные                   |
| FES-0007 | темный                  | нет предсказания         |
| FES-0008 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0009 | темный                  | темные                   |
| FES-0010 | темный                  | темные                   |
| FES-0011 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0012 | темный                  | темные                   |
| FES-0013 | темный                  | темные                   |
| FES-0014 | темный                  | темные                   |
| FES-0015 | темный                  | темные                   |
| FES-0016 | темный                  | темные                   |
| FES-0017 | темный                  | темные                   |
| FES-0018 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0019 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0020 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0021 | темный                  | темные                   |
| FES-0022 | темный                  | темные                   |
| FES-0023 | темный                  | промежуточные            |

Продолжение таблицы 5

| Образец  | Предсказанный цвет глаз | Предсказанный цвет волос |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| FES-0024 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0025 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0026 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0027 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0028 | светлый                 | рыжие                    |
| FES-0029 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0030 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0031 | темный                  | светлые                  |
| FES-0032 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0033 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0034 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0035 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0036 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0037 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0038 | темный                  | светлые                  |
| FES-0039 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0040 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0041 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0042 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0043 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0044 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0045 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0046 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0047 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0048 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0049 | темный                  | темные                   |
| FES-0050 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0051 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0052 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0053 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0054 | темный                  | темные                   |
| FES-0055 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0056 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0057 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0058 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0059 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0060 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0061 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0062 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0063 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0064 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0065 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0066 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0067 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0068 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0069 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0070 | темный                  | темные                   |
| FES-0071 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0072 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0073 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0074 | темный                  | не анализируется         |

Продолжение таблицы 5

| Образец  | Предсказанный цвет глаз | Предсказанный цвет волос |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| FES-0075 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0076 | темный                  | темные                   |
| FES-0077 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0078 | темный                  | темные                   |
| FES-0079 | темный                  | темные                   |
| FES-0080 | темный                  | темные                   |
| FES-0081 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0082 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0083 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0084 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0085 | темный                  | темные                   |
| FES-0086 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0087 | темный                  | темные                   |
| FES-0088 | темный                  | темные                   |
| FES-0089 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0090 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0091 | темный                  | темные                   |
| FES-0092 | темный                  | темные                   |
| FES-0093 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0094 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0095 | темный                  | темные                   |
| FES-0096 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0097 | темный                  | темные                   |
| FES-0098 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0099 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0100 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0101 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0102 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0103 | темный                  | темные                   |
| FES-0104 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0105 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0106 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0107 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0108 | темный                  | темные                   |
| FES-0109 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0110 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0111 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0112 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0113 | темный                  | темные                   |
| FES-0114 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0115 | темный                  | темные                   |
| FES-0116 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0117 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0118 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0119 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0120 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0121 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0122 | темный                  | светлые                  |
| FES-0123 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0124 | светлый                 | светлые                  |



Окончание таблицы 5

| Образец  | Предсказанный цвет глаз | Предсказанный цвет волос |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| FES-0125 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0126 | темный                  | нет предсказания         |
| FES-0127 | темный                  | не анализируется         |
| FES-0128 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0129 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0130 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0131 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0132 | темный                  | промежуточные            |
| FES-0133 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0134 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0135 | светлый                 | рыжие                    |
| FES-0136 | светлый                 | промежуточные            |
| FES-0137 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0138 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0139 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0140 | светлый                 | светлые                  |
| FES-0141 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0142 | светлый                 | рыжие                    |
| FES-0143 | светлый                 | не анализируется         |
| FES-0144 | светлый                 | светлые                  |

выполненные в трех проекциях с соблюдением антропологических стандартов, представляют собой ценный ресурс для этого и последующих исследований, направленных на выявление ассоциаций отдельных фенотипических признаков с генетическими маркерами. В данном исследовании фотографии использовали для определения цвета глаз и цвета волос. Проведение фенотипирования тремя независимыми экспертами и наличие фотографий для перепроверки (при необходимости) делают результаты этого исследования надежными и воспроизводимыми.

Для генотипирования из ряда предложенных наборов генетических маркеров мы воспользовались наиболее полной, современной и популярной системой HlrisPlex-S, хорошо себя зарекомендовавшей в исследованиях современных и древних популяций Западной Европы [8, 11, 17]. Сравнение реальных фенотипов (определенных по фотографиям) и фенотипов, предсказанных по генотипам, позволило оценить точность этой панели для популяций за пределами Западной Европы. Из ряда показателей качества предсказания (табл. 3) наибольший интерес представляет AUC, поскольку значения этого показателя опубликованы для результатов применения HlrisPlex на популяциях Западной Европы [16]. Поэтому мы смогли напрямую сравнить эффективность этой системы для популяций Западной Европы и России.

В целом значения показателей качества предикции, полученные для большинства классов (см. табл. 3), оказались достаточно велики (0,6–0,9), чтобы использование предикции по HlrisPlex было обоснованным и для российских популяций. Ни одна система предикции фенотипа по генотипу не может претендовать на стопроцентную точность, и показатели HlrisPlex даже в Западной Европе не по всем классам превышают 0,9. Поэтому в целом мы считаем, что проверка HlrisPlex на популяциях России продемонстрировала работоспособность этой системы и

удовлетворительные значения точности предсказания. В то же время точность предсказания для популяций России все же ниже, чем для популяций Западной Европы (в среднем 0,8 для России и 0,9 для Западной Европы). Поэтому мы считаем, что HlrisPlex может быть использована для российских популяций, но рекомендуем при интерпретации результатов учитывать обнаруженное нами снижение показателей точности.

В нашем исследовании российские популяции были сгруппированы в две региональные базы данных: Европейская часть России и Сибирь. Предыдущие популяционно-генетические исследования [18, 19] продемонстрировали, что эти метапопуляции контрастны по генетическому происхождению. Они оказались контрастными и по качеству предикции фенотипов, значительно сниженной для Сибири (см. табл. 4). Исходные данные (см. табл. 1 и 5) показывают, что HlrisPlex предсказывает темные глаза практически для всех сибирских образцов, тогда как у некоторых представителей сибирских народов цвет глаз определен как светлый (даже с учетом условности границы между светлыми и промежуточными оттенками цвет глаз этих индивидов в любом случае не темный, как предсказывает HlrisPlex). Можно предполагать, что светлый цвет глаз, изредка встречающийся у представителей коренных народов Сибири, связан с иными аллелями (возможно, и с иными генами), чем у европейцев, и именно поэтому разработанная на данных о западных европейцах панель не может корректно предсказать светлый (не темный) цвет глаз в этих популяциях. Некоторое снижение показателей точности на популяциях Европейской части России может иметь ту же природу, но, поскольку генетически эти популяции намного ближе к популяциям Западной Европы, то особенности спектра аллелей и, соответственно, снижения точности предикции выражены не так заметно. Это открывает перспективу проведения дополнительных исследований на популяциях России, направленных на

поиск дополнительных генетических маркеров, улучшающих предикцию фенотипов пигментации по генотипу.

## ВЫВОДЫ

Проведенный анализ корреляции генотипа и фенотипов пигментации волос и глаз в популяциях России на основе широко используемой панели HlrPlex-S в целом подтвердил эффективность применения классической HlrPlex-S-панели

для этих ранее не изученных популяций, хотя ее точность оказалась ниже, чем для групп западноевропейцев, для которых данный классификатор был разработан. Снижение точности для популяций Европейской части России не так велико (например, с 0,94 до 0,89), как для популяций Сибири. Это снижение может быть обусловлено влиянием популяционно-специфических SNP, которые представлены в популяциях Северной Евразии, но редки в Западной Европе и поэтому не вошли в панель HlrPlex-S.

## Литература

- Bouakaze C, Keyser C, Crubezy E, Montagnon D, Ludes B. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. *Int J Legal Med.* 2009; 123 (4): 315–25.
- Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolanska-Nowak P, Szczerbinska A, Wojas-Pelc A. Association of polymorphic sites in the OCA2 gene with eye colour using the tree scanning method. *Ann Hum Genet.* 2008; 72 (Pt 2): 184–92.
- Candille SI, Absher DM, Beleza S, Bauchet M, McEvoy B, Garrison NA, et al. Genome-wide association studies of quantitatively measured skin, hair, and eye pigmentation in four European populations. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e48294.
- Han J, Kraft P, Nan H, Guo Q, Chen C, Qureshi A, et al. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet.* 2008; 4 (5): e1000074.
- Lippert C, Sabatini R, Maher MC, Kang EY, Lee S, Arkan O, et al. Identification of individuals by trait prediction using whole-genome sequencing data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114 (38): 10166–71.
- Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol.* 2009; 19 (5): R192–3.
- Maronas O, Sochtig J, Ruiz Y, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. The genetics of skin, hair, and eye color variation and its relevance to forensic pigmentation predictive tests. *Forensic Sci Rev.* 2015; 27 (1): 13–40.
- Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HlrPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 9: 150–61.
- Walsh S, Kayser M. A Practical Guide to the HlrPlex System: Simultaneous Prediction of Eye and Hair Color from DNA. *Methods Mol Biol.* 2016; (1420): 213–31.
- Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HlrPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7 (1): 98–115.
- Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, Wirken L, Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, et al. The HlrPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci Int Genet.* 2018; (35): 123–35.
- Pagani L, Lawson DJ, Jagoda E, Mörseburg A, Eriksson A, Mitt M, et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016 Oct 13; 538 (7624): 238–42. DOI: 10.1038/nature19792.
- Балановская Е. В., Жабагин М. К., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика.* 2016; (12): 1371–87.
- Powell R, Gannon F. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. *Practical Approach Series.* Oxford: Oxford University Press, 2002.
- Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience.* 2015 December; 4 (1): s13742-015-0047-8. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
- Department of Genetic Identification of Erasmus MC. HlrPlex-S Eye, Hair and Skin Colour DNA Phenotyping Webtool. [software]. Available from: <https://hlripdex.erasmusmc.nl/>.
- Draus-Barini J, Walsh S, Pośpiech E, Kupiec T, Glab H, Branicki W, et al. Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics.* 2013 January; (4): 3. DOI: 10.1186/2041-2223-4-3.
- Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyy N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nat Ecol Evol.* 2019 Jun; 3 (6): 966–76. DOI: 10.1038/s41559-019-0878-2.
- Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genet.* 2017 Dec 28; 18 (Suppl 1): 110. DOI: 10.1186/s12863-017-0578-3.
- Identification of individuals by trait prediction using whole-genome sequencing data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114 (38): 10166–71.
- Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol.* 2009; 19 (5): R192–3.
- Maronas O, Sochtig J, Ruiz Y, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. The genetics of skin, hair, and eye color variation and its relevance to forensic pigmentation predictive tests. *Forensic Sci Rev.* 2015; 27 (1): 13–40.
- Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HlrPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 9: 150–61.
- Walsh S, Kayser M. A Practical Guide to the HlrPlex System: Simultaneous Prediction of Eye and Hair Color from DNA.

## References

- Methods Mol Biol. 2016; (1420): 213–31.
10. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7 (1): 98–115.
  11. Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, Wirken L, Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, et al. The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci Int Genet.* 2018; (35): 123–35.
  12. Pagani L, Lawson DJ, Jagoda E, Mörseburg A, Eriksson A, Mitt M, et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016 Oct 13; 538 (7624): 238–42. DOI: 10.1038/nature19792.
  13. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdzhoyan AT, Chukhryayeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, et al. Populyatsionnyye biobanki: printsipy organizatsii i perspektivy primeneniya v genogeografii i personalizirovannoy meditsine. *Genetika.* 2016; (12): 1371–87. Russian.
  14. Powell R, Gannon F. Purification of DNA by phenolextraction and ethanol precipitation. *Practical Approach Series.* Oxford: Oxford University Press, 2002.
  15. Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience.* 2015 December; 4 (1): s13742-015-0047-8. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
  16. Department of Genetic Identification of Erasmus MC. HirisPlex-S Eye, Hair and Skin Colour DNA Phenotyping Webtool. [software]. Available from: <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>.
  17. Draus-Barini J, Walsh S, Pospiech E, Kupiec T, Glab H, Branicki W, et al. Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics.* 2013 January; (4): 3. DOI: 10.1186/2041-2223-4-3.
  18. Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyzy N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nat Ecol Evol.* 2019 Jun; 3 (6): 966–76. DOI: 10.1038/s41559-019-0878-2.
  19. Triska P, Chekanov N, Stepanov V, Khusnutdinova EK, Kumar GPA, Akhmetova V, et al. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. *BMC Genet.* 2017 Dec 28; 18 (Suppl 1): 110. DOI: 10.1186/s12863-017-0578-3.

## БОЛЕЗНЬ ФРИДРЕЙХА: ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *FXN* И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Е. Ю. Федотова , Н. Ю. Абрамичева, Е. П. Нужный, М. В. Ершова, С. А. Ключников, С. Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Болезнь Фридрейха (БФ) — наиболее частая аутосомно-рецессивная атаксия, связанная с экспансией tandemных некодирующих GAA-повторов в гене *FXN*. Нарушение транскрипции и недостаточность белка фратаксина являются ключевыми звеньями патогенеза заболевания. Целью работы было исследовать экспрессию мРНК гена *FXN* и провести анализ клинических, генетических и эпигенетических корреляций в группе пациентов с гомозиготной экспансией повторов, в группе их родственников с гетерозиготной экспансией и в контрольной группе. Уровень мРНК гена *FXN* определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Паттерн метилирования CpG-сайтов оценивали методом прямого секвенирования после бисульфитной обработки. В результате работы получены разграничительные значения между группой пациентов БФ, группой гетерозиготных носителей и контрольной группой (15 и 79% соответственно). При проведении клинико-генетических сопоставлений с уровнем экспрессии *FXN* значимых корреляций выявлено не было. При сопоставлении экспрессии гена с эпигенетическим профилем было установлено, что экспрессия подавляется при гиперметилировании ряда CpG-сайтов выше области тринуклеотидных повторов и некоторых не-CpG-сайтов ниже области повторов. Таким образом, выявленные сайты могут быть рассмотрены в качестве точки приложения таргетного эпигенетического редактирования для увеличения транскрипции *FXN* и, следовательно, для таргетной терапии заболевания.

**Ключевые слова:** болезнь Фридрейха, экспрессия гена, эпигенетика, метилирование ДНК, не-CpG-метилирование, ДНК-диагностика, таргетная терапия

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта РНФ (номер проекта 17-75-20211).

**Информация о вкладе авторов:** все авторы внесли равнозначный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили ее финальную версию перед публикацией.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 11–3/17 от 18 октября 2017 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Юрьевна Федотова  
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва; ekfedotova@gmail.com

**Статья получена:** 22.08.2019 **Статья принята к печати:** 13.09.2019 **Опубликована онлайн:** 25.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.062

## FRIEDREICH ATAXIA: *FXN* GENE EXPRESSION AND ITS RELATIONSHIP WITH DNA METHYLATION PATTERN

Fedotova EYu , Abramychева NYu, Nuzhny EP, Ershova MV, Klyushnikov SA, Illarioshkin SN

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Friedreich ataxia (FRDA) is the most common autosomal recessive ataxia associated with the non-coding GAA tandem repeats expansion in the *FXN* gene. Transcription impairment and frataxin protein deficiency are the key features of the disease pathogenesis. Our research was aimed to study the *FXN* gene mRNA expression as well as to carry out the clinical, genetic and epigenetic correlation analysis in a group of patients with homozygous expansion, in a group of their relatives with heterozygous expansion and in a control group. The *FXN* mRNA level was determined using the real-time polymerase chain reaction. Methylation pattern of CpG sites was evaluated by direct bisulfite sequencing. As a result of the study, the threshold values were obtained between the FRDA patients group, the group of heterozygous carriers and the control group (15 and 79%, respectively). The clinical and genetic features comparison with the *FXN* expression level revealed no significant correlation. When comparing gene expression with an epigenetic profile, it was found that hypermethylation of a number of CpG sites upstream of the trinucleotide repeats and some non-CpG sites downstream of the region of repeats inhibited expression. Thus, the identified methylated sites may be considered as a target for epigenome editing to increase the *FXN* transcription and, consequently, for target therapy of the disease.

**Keywords:** Friedreich ataxia, gene expression, epigenetics, DNA methylation, non-CpG methylation, DNA diagnostics, target therapy

**Funding:** the study is supported by grant of the Russian Science Foundation (project № 17-75-20211).

**Author contribution:** all authors contributed to the study and preparation of the article equally, read and approved the final version before publishing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (protocol № 11–3/17 dated October 18, 2017). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Yu. Fedotova  
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; ekfedotova@gmail.com

**Received:** 22.08.2019 **Accepted:** 13.09.2019 **Published online:** 25.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.062

Болезнь Фридрейха (БФ) — наиболее частая аутосомно-рецессивная атаксия, связанная с экспансией tandemных тринуклеотидных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN* [1, 2]. Молекулярной основой заболевания является недостаточность продукта гена — митохондриального белка фратаксина [3]. Считается, что значительная экспансия в сотни нуклеотидов, имеющая место при БФ, препятствует транскрипции соответствующей мРНК *FXN* [2].

В ряде исследований показано, что в критическом локусе ДНК, содержащем ген *FXN*, в случае экспансии образуется гетерохроматин (неактивный хроматин) с подавлением процессов транскрипции [4]. Ему соответствуют определенные модификации гистонов — уменьшение ацетилирования и повышение триметилирования, что показано у пациентов с БФ [5–7]. Наряду с модификацией гистонов наблюдают и другие эпигенетические феномены — усиление ДНК-метилирования в промоторе и в области 1-го

интрона, расположенной выше участка GAA-экспансии (UP-GAA), и снижение ДНК-метилирования в области 1-го интрона ниже GAA-экспансии (DOWN-GAA). Известно, что метилирование цитозина в динуклеотидной паре цитозин-гуанин (CpG) в промоторе приводит к уменьшению экспрессии гена, т. е. метилирование ДНК в UP-GAA-области предположительно ингибирует транскрипцию FXN и приводит к снижению уровня фратаксина [8].

ДНК-метилирование и модификации гистонов — это взаимосвязанные эпигенетические процессы. В частности, уровень ДНК-метилирования может быть прогностически важным маркером для ингибиторов гистоновых деацетилаз, клинические испытания которых проводят с целью эпигенетической терапии БФ. При этом есть мнение, что при БФ ДНК-метилирование первично по отношению к модификации гистонов [9].

В последние годы стали появляться работы, исследующие значение так называемого не-CpG-метилирования (*non-CpG methylation*). При этом типе происходит метилирование цитозина в паре с другими, отличными от гуанина, нуклеотидами — аденином, тиминном, цитозином. Наибольший уровень не-CpG-метилирования был найден в стволовых клетках и клетках нервной системы [10, 11], что позволяет предполагать особую роль данного варианта эпигенетической модификации в реализации функций нервной системы в норме и при патологии. До настоящего времени не-CpG-метилирование при БФ не исследовали.

Целью работы было исследовать уровень экспрессии мРНК гена *FXN* и провести анализ клинических, генетических и эпигенетических корреляций у пациентов с БФ и гетерозиготных носителей мутации *FXN*.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе 5-го неврологического отделения Научного центра неврологии с 2017 по 2019 г. Была изучена группа пациентов с БФ и подтвержденной гомозиготной экспансией GAA-повторов в гене *FXN* ( $n = 8$ ; 3 женщины и 5 мужчин). Средний возраст больных составил  $29,9 \pm 9,5$  лет, возраст дебюта заболевания —  $13,8 \pm 6,7$  лет, длительность заболевания —  $16,0 \pm 9,3$  лет. Критерии включения пациентов в группу с БФ: наличие клинического диагноза заболевания с положительными результатами молекулярно-генетической диагностики (гомозиготная экспансия tandemных GAA-повторов в 1-м интроне гена *FXN*). Среднее число GAA-повторов в коротком аллеле гена в группе составило  $506,0 \pm 232,0$  (GAA1), в длинном —  $718,8 \pm 143,8$  (GAA2). Пациентов клинически обследовали по шкале оценки атаксии SARA (средний балл в группе —  $23,1 \pm 11,4$ ) и по шкале Монреальской когнитивной оценки MoCA (средний балл —  $24,6 \pm 2,7$ ); определяли также наличие кардиомиопатии (5/8), нарушений углеводного обмена (3/8), сколиоза и деформации стоп (6/8). Критерии исключения: отсутствие верифицированного диагноза заболевания.

Основную группу пациентов сравнивали с группой гетерозиготных носителей мутации в гене *FXN*, обозначаемой далее как GAA-гетерозиготы ( $n = 6$ ; 5 женщин и 1 мужчина); в эту группу вошли родственники больных БФ первой степени родства. Группа сравнения была старше по возрасту ( $53,7 \pm 19,6$  лет) по сравнению с больными БФ (за счет родителей пациентов). Для гетерозиготных носителей критерием включения было наличие гетерозиготной GAA-экспансии. Длина экспандированного аллеля *FXN* в группе

составила  $664,0 \pm 283,7$  повторов (GAA2). Контрольная группа ( $n = 10$ ) без экспансии GAA-повторов в гене *FXN* была сопоставима по полу и возрасту с основной группой.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega; США). Наличие экспансии GAA-повторов в гене *FXN* оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) соответствующей области с последующим разделением ампликонов в агарозном геле.

Паттерн метилирования определяли методом прямого секвенирования соответствующих участков ДНК после бисульфитной обработки с помощью набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research; США) согласно методике производителя. У каждого обследуемого определяли уровень метилирования CpG-сайтов в трех основных значимых областях гена *FXN*: в промоторной области, UP-GAA-области и DOWN-GAA-области. В промоторной области *FXN* были исследованы 16 CpG-сайтов, в UP-GAA-области — 67 CpG-сайтов, в DOWN-GAA-области — 21 CpG-сайт (с нумерацией от 5'-конца соответствующей области). Степень метилирования сайта рассчитывали по отношению высоты синего пика (метилированный цитозин, C) к суммарной высоте синего и красного пиков (метилированный и неметилированный цитозин, C + T).

Кроме исследования CpG-сайтов в работе проводили поиск и анализ метилирования не-CpG-сайтов. Не-CpG-сайты выявляли при анализе сиквенса по метилированному цитозину (mC), предшествующему аденину, тимину или цитозину (соответственно, mCA, mCT, mCC).

Оценку уровня экспрессии гена *FXN* проводили путем измерения количества мРНК гена *FXN* методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в исследуемых образцах по следующей схеме. Забор периферической крови осуществляли в пробирки с ЭДТА, образцы крови предварительно обрабатывали специальным буфером для лизиса эритроцитов Buffer EL (QIAGEN; Германия), аликвотировали и хранили при  $-80$  °C. Для выделения геномной РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN; Германия) по соответствующему протоколу производителя. Тотальную кДНК из полученных образцов РНК получали с помощью набора для обратной транскрипции и амплификации кДНК (Евроген; Россия) с добавлением олиго dT праймера, аликвотировали и хранили при  $-20$  °C. Содержание мРНК гена *FXN* в исследуемых образцах определяли по пороговому циклу методом ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем SYBR Green, с нормированием на референсный ген *GAPDH*. В качестве метода подсчета уровня экспрессии использовали формулу  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ .

Статистический анализ осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 (IBM; США) с использованием непараметрических методов статистики: критерия Манна-Уитни, критерия Спирмена. Для ROC-анализа применяли программу MedCalc 18 (MedCalc Software; Бельгия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Экспрессия гена *FXN* у носителей гомозиготной и гетерозиготной экспансии

В группе БФ у пациентов с гомозиготной экспансией GAA-повторов уровень экспрессии составил 0,05 [0,00; 0,127]; в группе их родственников с гетерозиготной экспансией —



0,57 [0,54; 0,66]; в референсной группе контроля — 1,016 [0,847; 1,214]. Группы статистически значимо различались между собой ( $p < 0,05$ ).

Учитывая перекрывающиеся значения уровней экспрессии между контрольной группой и группой GAA-гетерозигот, был проведен ROC-анализ. Площадь под кривой для анализируемого показателя составила 0,986; при разграничительном значении, равном 0,79, специфичность составила 95% и чувствительность — 93%. При ROC-анализе результатов оценки экспрессии гена в группах GAA-гетерозигот и GAA-гомозигот площадь под кривой составила 0,934; при разграничительном значении, равном 0,15, специфичность составила 93% и чувствительность — 87%.

### Клинические сопоставления

Проводили сопоставления экспрессии *FXN* с клиническими данными в группе больных БФ. При корреляционном анализе между уровнем экспрессии и возрастом пациентов, возрастом начала и длительностью заболевания, баллом по шкале оценки тяжести атаксии SARA, когнитивными изменениями по MoCA взаимосвязей выявлено не было ( $p > 0,05$ ). По полученным данным, уровень экспрессии не был связан с наличием кардиомиопатии, нарушением углеводного обмена или костными деформациями ( $p > 0,05$ ).

В группе сравнения среди родственников с гетерозиготной мутацией наименьший уровень экспрессии *FXN* был у носительницы гетерозиготной GAA-экспансии (750 GAA-повторов) 72 лет (матери пациента). В анамнезе у обследуемой — многолетняя эндокринопатия (тяжелый сахарный диабет 2-го типа). У других обследованных из группы GAA-гетерозигот сахарного диабета не было.

### Генетические сопоставления

Исследовали корреляцию между уровнем экспрессии мРНК *FXN* и длиной экспандированных аллелей. В группе БФ экспрессия не была ассоциирована ни с длиной меньшего аллеля GAA1 (статистической значимости не достигала), ни с длиной большего аллеля GAA2. В группе GAA-гетерозигот также не выявлено связи между уровнем экспрессии и длиной экспандированного аллеля GAA2.

### Эпигенетические сопоставления

В работе проведен поиск не-СрG-сайтов во всех исследуемых областях. В промоторной области было обнаружено 2 не-СрG-сайта, в UP-GAA-области не-СрG-

сайтов выявлено не было, в DOWN-GAA-области найдено 15 не-СрG-сайтов.

При корреляционном анализе у пациентов с БФ выявлена прямая связь между уровнем экспрессии мРНК гена *FXN* и уровнем метилирования сайта СрG-54 в UP-GAA-области ( $r = 0,782$ ;  $p = 0,037$ ). В области DOWN-GAA выявлена обратная корреляция между уровнем экспрессии *FXN* и уровнем метилирования трех не-СрG-сайтов: не-СрG-7a ( $r = -0,788$ ;  $p = 0,035$ ), не-СрG-7b ( $r = -0,795$ ;  $p = 0,032$ ) и не-СрG-8a ( $r = -0,875$ ;  $p = 0,009$ ). Связи уровня метилирования указанных не-СрG-сайтов с длиной GAA1 либо GAA2 выявлено не было. В то же время для рядом расположенных СрG-сайтов метилирование не коррелировало с экспрессией, но зависело от длины экспандированного аллеля (табл. 1).

В группе сравнения у GAA-гетерозигот выявлена корреляция между уровнем экспрессии и уровнем метилирования СрG-13 в промоторной области ( $r = -0,947$ ;  $p = 0,017$ ), а также между уровнем экспрессии и уровнем метилирования СрG-3 в DOWN-GAA-области ( $r = -0,894$ ;  $p = 0,041$ ).

С учетом небольшого числа обследуемых в группах нами был проведен расчет корреляций в совмещенной группе, составленной из пациентов, родственников и здоровых добровольцев, с поправкой на группу. Выявленные корреляции между уровнем экспрессии *FXN* и уровнем метилирования отдельных сайтов представлены в табл. 2. Суммируя полученные результаты, можно отметить, что для СрG-сайтов выявлены обратные корреляции между экспрессией гена и метилированием в промоторе и UP-GAA-области и прямые корреляции между экспрессией гена и метилированием в DOWN-GAA-области, тогда как для не-СрG-сайтов в DOWN-GAA-области выявлены обратные корреляции.

Метилированный цитозин в не-СрG-сайтах предшествовал следующим нуклеотидам: сайт 5a — mCCC, сайт 7a — mCTT, сайт 7b — mCCC, сайт 8a — mCAG, сайт 8b — mCAT, сайт 10b — mCTG.

В совмещенной выборке степень метилирования не-СрG-сайтов DOWN-GAA-области не коррелировала с длиной экспансии (GAA1, GAA2) — как и в группе пациентов с БФ.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недостаточность белка фратаксина при БФ имеет системный эффект и приводит к различным неврологическим и экстраневральным проявлениям заболевания [1, 9]. Тяжесть генетических изменений при

**Таблица 1.** Корреляции уровня экспрессии гена *FXN* и длины экспансии повторов в меньшем аллеле гена с уровнем метилирования не-СрG-сайтов DOWN-GAA области и рядом расположенных с ними СрG-сайтов у пациентов с БФ

| Условные обозначения сайтов | Корреляция* уровня метилирования с экспрессией | Корреляция* уровня метилирования с длиной GAA1 | Последующие за метилированным цитозином нуклеотиды | Место расположения цитозина (GRCh38) |
|-----------------------------|--|--|--|--------------------------------------|
| СрG-7                       | —  | −0,901*  | mCG  | chr9:69,037,380                      |
| не-СрG-7a                   | −0,788*  | —  | mCTT   | chr9:69,037,382                      |
| не-СрG-7b                   | −0,795*  | —  | mCCC   | chr9:69,037,388                      |
| СрG-8                       | —  | −0,836*  | mCG  | chr9:69,037,390                      |
| не-СрG-8a                   | −0,875*  | —  | mCAG   | chr9:69,037,397                      |
| СрG-9                       | —  | −0,772*  | mCG  | chr9:69,037,420                      |
| СрG-10                      | —  | −0,791*  | mCG  | chr9:69,037,434                      |

Примечание: # — коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ); \* —  $p < 0,05$ ; «—» — нет корреляционной связи; mC — метилированный цитозин.

**Таблица 2.** Корреляции уровня экспрессии гена *FXN* и длины экспансии повторов в меньшем аллеле гена с уровнем метилирования не-CpG-сайтов DOWN-GAA области и рядом расположенных с ними CpG-сайтов у пациентов с БФ

| Промотор: обратные корреляции  | DOWN-GAA: прямые корреляции   |
|--|---|
| – CpG-5 ( $r = -0,511$ )*<br>– CpG-13 ( $r = -0,542$ )*<br>– CpG-16 ( $r = -0,511$ )*  | – CpG-2 ( $r = 0,567$ )*<br>– CpG-12 ( $r = 0,520$ )*   |
| UP-GAA: обратные корреляции  | DOWN-GAA: обратные корреляции   |
| – CpG-43 ( $r = -0,615$ )*<br>– CpG-44 ( $r = -0,508$ )*<br>– CpG-45 ( $r = -0,533$ )* | – не-CpG-5a ( $r = -0,514$ )*<br>– не-CpG-7a ( $r = -0,571$ )*<br>– не-CpG-7b ( $r = -0,506$ )*<br>– не-CpG-8a ( $r = -0,625$ )*<br>– не-CpG-8b ( $r = -0,644$ )*<br>– не-CpG-10b ( $r = -0,540$ )* |

Примечание: \* —  $p < 0,05$ .

БФ — длина экспансии GAA-повторов — лишь отчасти может объяснить то многообразие клинической картины, которую наблюдают при данной патологии (вариабельный возраст начала и темп прогрессирования, особенности клинических проявлений, характер полиневропатии и вовлечения кортикоспинальных трактов, тяжесть и характер кардиомиопатии, нарушения углеводного обмена и др.). Закономерно, что поиск объяснения такого широкого фенотипического полиморфизма ведут путем изучения факторов и процессов, регулирующих реализацию генетической информации: метилирования ДНК, модификации гистонов, пространственной организации ДНК, антисмысловых транскриптов и некодирующих РНК. Из-за комплексности и многоплановости процессов, вызванных интронной GAA-экспансией, пока не удастся выделить главенствующие мишени, воздействие на которые помогло бы решить проблему недостаточности фратаксина и нарушенной транскрипции *FXN*, и, следовательно, предложить эффективную терапевтическую стратегию. В работе был сделан акцент на одном из эпигенетических аспектов — метилировании ДНК. Данный аспект представляется перспективным в свете появившихся работ по таргетному эпигенетическому редактированию, которое может позволить восстановить нарушенную транскрипцию, как было показано для умственной отсталости на примере экспансии тринуклеотидных повторов в гене *FMR1* [12–14].

Результаты по изучению степени экспрессии *FXN* представлены в ряде зарубежных работ. Так, в одной из них уровень мРНК *FXN* у пациентов с БФ были снижен до 19%, у гетерозиготных носителей — до 53% от уровня контроля, при этом уровень мРНК коррелировал с уровнем фратаксина, возрастом начала заболевания и длиной экспансии [15]. В другой работе были получены сопоставимые результаты, а также показано, что уровень мРНК и уровень белка фратаксина относительно стабильны во времени и меняются на фоне действия эпигенетической терапии — ингибитора гистоновых деацетилаз. Иными словами, уровень мРНК — измеряемый и изменяемый показатель, который можно использовать в клинических исследованиях [16].

Проведенный нами анализ экспрессии гена *FXN* выявил также существенное снижение уровня мРНК у пациентов — носителей гомозиготной GAA-экспансии (ниже 15%) относительно контрольной группы, и в группе родственников с гетерозиготной экспансией повторов (ниже 79%). Однако в нашем исследовании статистически значимых корреляций ни с клиническими, ни с генетическими характеристиками выявлено не было, вероятнее всего, из-за небольшого размера выборки. При

этом обращает на себя внимание тот факт, что в группе гетерозигот у пациентки с сахарным диабетом 2-го типа был выявлен наименьший уровень мРНК *FXN*. Возможно, у гетерозигот низкий уровень экспрессии мРНК и белка фратаксина может быть предиктором нарушений углеводного обмена, которые наблюдают у пациентов с БФ и могут также быть выявлены у их родственников — гетерозиготных носителей мутации [17, 18].

Работы по исследованию ДНК-метилирования при БФ немногочисленны [8, 19–23]. При этом БФ рассматривают как модельное заболевание с особым типом экспансии тринуклеотидных повторов — на обоих аллелях в некодирующей, регуляторной области гена [20]. В двух работах было обнаружено гиперметилирование нескольких сайтов в UP-GAA-области при БФ [21, 22]. Другие исследователи также показали гиперметилирование UP-GAA и выявили гипометилирование DOWN-GAA в клетках периферической крови пациентов, в головном мозге и миокарде [23], что подтверждает системный эффект экспансии GAA-повторов и информативность данных, получаемых на лейкоцитах периферической крови. Еще в одной работе на большой выборке пациентов с БФ кроме гиперметилирования UP-GAA и гипометилирования DOWN-GAA показана обратная корреляционная связь между уровнем метилирования одного UP-CpG-сайта с уровнем мРНК *FXN* [8]. Уровень мРНК коррелировал также с количеством GAA-повторов, возрастом начала заболевания, тяжестью симптомов. В нашей ранее опубликованной работе [19] было подтверждено гиперметилирование UP-GAA-области и гипометилирование DOWN-GAA-области при БФ, выявлены прямая связь степени метилирования сайтов UP-GAA-области с длиной экспансии у гомозиготных носителей мутации и обратная связь степени метилирования сайтов DOWN-GAA-области с длиной экспансии у гетерозиготных носителей мутации.

Данная работа является продолжением предыдущей и исследует влияние эпигенетического профиля *FXN* на экспрессию соответствующей мРНК. Сопоставляя результаты предыдущей и настоящей работ, можно отметить, что гиперметилирование отдельных CpG-сайтов, располагающихся до области повторов (промотор и UP-GAA), связано с меньшим уровнем мРНК и с большим числом tandemных GAA-повторов в гене *FXN*. В DOWN-GAA гипометилирование отдельных CpG-сайтов связано с меньшим уровнем мРНК и с большим числом tandemных GAA-повторов.

Как было отмечено выше, не-CpG-метилирование при БФ до настоящего времени не исследовали. Функциональное значение не-CpG-сайтов обсуждают,

однако уже сейчас понятно, что оно имеет большое значение в регуляции экспрессии [24]. Не-CpG-сайты преимущественно располагаются там, где меньше плотность CpG-сайтов, т. е. обычно внутри гена. Метилирование не-CpG внутри гена ассоциировано с уменьшением его экспрессии. Считается, что по сравнению с CpG оно более подвержено изменениям, которые могут происходить в процессе развития организма и под воздействием различных факторов окружающей среды [25]. Так, в нейронах на стадии эмбриона не-CpG-сайты практически не метилированы и метилируются в процессе развития. Именно на нейроны приходится наибольшая часть не-CpG-метилирования взрослого организма, меньше — на глию, стволовые клетки, гаметы; оно практически отсутствует в других клетках. Ориентировочное соотношение в нейронах не-CpG-метилирования к CpG-метилированию — 1 : 3. Чаще всего первое встречается в динуклеотиде CpA, в меньшей степени — в динуклеотиде CpT и еще меньше — в CpC. Считается, что функция не-CpG-метилирования зависит от молекулярного контекста: так, метилирование цитозина в последовательности mCAC может приводить к снижению экспрессии гена, тогда как метилирование в mCAG — к ее повышению [10, 11].

В нашей работе были найдены 2 не-CpG-сайта в промоторной области, в области UP-GAA не-CpG найдены не были, и в DOWN-GAA области выявлены 15 не-CpG. Для сравнения, встречаемость CpG в этих же секвенированных областях следующая: 16 CpG — в промоторе, 67 CpG — в UP-GAA и 21 CpG — в DOWN-GAA. Из приведенных данных видно, что чем больше плотность CpG, тем меньше встречаемость не-CpG, и наоборот. Примерное, условное соотношение не-CpG к CpG — 1 : 6; напомним, что исследование проводили на лейкоцитах крови, а не на нейронах, с меньшей долей не-CpG.

В работе корреляций уровня метилирования двух не-CpG-сайтов в области промотора *FXN* с уровнем мРНК выявлено не было. В DOWN-GAA-области был выявлен кластер связанных друг с другом, расположенных рядом не-CpG-сайтов, метилирование которых обратно коррелирует с уровнем мРНК, при этом отсутствует связь уровня метилирования с длиной GAA-экспансии. Однонаправленный эффект всех 6 выявленных не-CpG-сайтов на экспрессию не зависел от контекста, указанная

выше обратная связь отмечена и при конфигурации CpA (mCAC, mCAG), и при CpT (mCTT, mCTG), и при CpC (2 mCCC).

На совмещенной выборке, в отличие от не-CpG-метилирования, уровень CpG-метилирования в DOWN-GAA показал прямые ассоциативные связи с уровнем мРНК, что говорит о возможном разнонаправленном эффекте этих двух типов метилирования. Еще одним различием между ними может быть зависимость от длины GAA-экспансии: при CpG-метилировании она присутствует, тогда как в случае не-CpG не выявляется. Следовательно, не-CpG-метилирование независимо от генетического дефекта может модифицировать экспрессию *FXN*.

Выявленный кластер близкорасположенных не-CpG-сайтов, метилирование которых связано с уменьшением транскрипции гена *FXN*, отстоит от известных и изучаемых при БФ регуляторных последовательностей и мест связывания факторов транскрипции — CTCF, SRF, TFAP2, EGR3, E-box (все они лежат в промоторе и UP-GAA-области) [26, 27]. Область выявленного не-CpG-кластера, находясь в DOWN-GAA-области, входит в состав Alu (SINE)-элемента. Функциональная значимость последнего до конца не ясна, однако удаление его приводит к существенному нарушению транскрипции *FXN* [4, 21]. Это еще раз косвенно подтверждает возможную значимость для транскрипции не-CpG-метилирования данной области.

## ВЫВОДЫ

В работе представлено сопоставление клинических параметров, степени экспансии GAA-повторов и эпигенетических характеристик гена *FXN* с уровнем мРНК в группах пациентов с БФ, их гетерозиготных родственников и лиц контрольной группы. Выявлены значимые для экспрессии сайты метилирования *FXN*. В промоторной области и в области UP-GAA для ряда CpG-сайтов определена отрицательная корреляционная связь метилирования с уровнем экспрессии гена, так же как и для ряда не-CpG-сайтов в области DOWN-GAA. Представляется, что выявленный гиперметилированный кластер не-CpG-сайтов можно рассматривать в качестве точки приложения таргетного эпигенетического редактирования с целью увеличения транскрипции *FXN* и, следовательно, для таргетной терапии БФ.

## Литература

- Иллариошкин С. Н., Ершова М. В. Атаксия Фридрейха. В книге: Иллариошкин С. Н., Руденская Г. Е., Иванова-Смоленская И. А., Маркова Е. Д., Ключников С. А. Наследственные атаксии и параличи. М., 2006; с. 49–113.
- Burk K. Friedreich ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias*. 2017; (4): 4.
- Deutsch EC, Oglesbee D, Greeley NR, Lynch DR. Usefulness of frataxin immunoassays for the diagnosis of Friedreich ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85 (9): 994–1002.
- Yandim C, Nativivili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *Journal of neurochemistry*. 2013; 126 (Suppl. 1): 21–42.
- Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006; 2 (10): 551–8.
- Sandi C, Sandi M, Virmouni SA, Al-Mahdawi S, Pook MA. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Frontiers in Genetics*. 2014; (5): 165.
- Soragni E, Miao W, Iudicello M, Jacoby D, De Mercanti S, Clerico M, et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2014; 76 (4): 489–508.
- Evans-Galea MV, Carroddus N, Rowley SM, Corben LA, Tai G, Saffery R et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2012; 71 (4): 487–97.
- Blair IA, Farmer J, Hersch S, Larkindale J, Lynch DR, Napierala J et al. The current state of biomarker research for Friedreich's ataxia: a report from the 2018 FARA biomarker meeting. *Future Sci OA*. 2019; 5 (6): FSO398.
- He Y, Ecker JR. Non-CG methylation in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015; (16): 55–77.
- Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes*. 2017; (8): e148.
- Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, Graef J, Muffat J, et al. Rescue of Fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell*. 2018; (172): 979–92.
- Lau C-H, Suh Y. In vivo epigenome editing and transcriptional

- modulation using CRISPR technology. *Transgenic Res.* 2018; 27 (6): 489–509.
14. Gomez JA, Beithner U, Segal DJ. Live-animal epigenome editing: Convergence of novel techniques. *Trends Genet.* 2019; 35 (7): 527–41.
  15. Sacca F, Puoro G, Antenora A, Marsili A, Denaro A, Piro R, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS ONE.* 2011; 6 (3): e17627.
  16. Plasterer HL, Deutsch EC, Belmonte M, Egan E, Lynch DR, Rusche JR. Development of frataxin gene expression measures for the evaluation of experimental treatment in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE.* 2013; 8 (5): e63958.
  17. Hebinck J, Hardt C, Schols L, Vorgerd M, Briedigkeit L, Kahn CR, Ristow M. Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes.* 2000; 49 (9): 1604–7.
  18. McCormick A, Farmer J, Perlman S, Delatycki M, Wilmot G, Matthews K, et al. Impact of diabetes in the Friedreich ataxia clinical outcome measures study. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2017; 4 (9): 622–31.
  19. Абрамычева Н. Ю., Федотова Е. Ю., Нужный Е. П., Николаева Н. С., Ключников С. А., Ершова М. В. и др. Эпигенетика болезни Фридрейха: метилирование области экспансии (GAA)n-повторов гена FXN. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2019; 74 (2): 80–7.
  20. Essebier A, Wolf PV, Cao MD, Carroll BJ, Balasubramanian S, Boden M. Statistical enrichment of epigenetic states around triplet repeats that can undergo expansions. *Front Neurosci.* 2016; (10): 92.
  21. Greene E, Mahishi L, Entezam L, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35 (10): 3383–90.
  22. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, Acquaviva F, Giacchetti M, Filla A, et al. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet.* 2008; 45 (12): 808–12.
  23. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet.* 2008; (17): 735–46.
  24. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics.* 2014; 9 (6): 823–28.
  25. Fuso A, Lucarelli M. CpG and non-CpG methylation in the diet-epigenetics-neurodegeneration connection. *Curr Nutr Rep.* 2019; 8 (2): 74–82.
  26. Li K, Singh A, Crooks DR, Dai X, Cong Z, Pan L, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS ONE.* 2010; 5 (8): e12286.
  27. Al-Mahdawi S, Sandi C, Pinto RM, Pook MA. Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus. *PLoS ONE.* 2013; 8 (9): e74956.


## References

1. Illarioshkin SN., Ershova MV. Ataksiya Fridreykha. V knige: Illarioshkin SN, Rudenskaya GE, Ivanova-Smolenskaya IA., Markova ED, Klyushnikov SA. Nasledstvennye ataksii i paraplegii. M., 2006; s.49–113. Russian.
2. Burk K. Friedreich ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias.* 2017; (4): 4.
3. Deutsch EC, Oglesbee D, Greeley NR, Lynch DR. Usefulness of frataxin immunoassays for the diagnosis of Friedreich ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 85 (9): 994–1002.
4. Yandim C, Natisvili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *Journal of neurochemistry.* 2013; 126 (Suppl. 1): 21–42.
5. Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol.* 2006; 2 (10): 551–8.
6. Sandi C, Sandi M, Virmouni SA, Al-Mahdawi S, Pook MA. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Frontiers in Genetics.* 2014; (5): 165.
7. Soragni E, Miao W, Iudicello M, Jacoby D, De Mercanti S, Clerico M, et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol.* 2014; 76 (4): 489–508.
8. Evans-Galea MV, Carroddus N, Rowley SM, Corben LA, Tai G, Saffery R, et al. FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol.* 2012; 71 (4): 487–97.
9. Blair IA, Farmer J, Hersch S, Larkindale J, Lynch DR, Napierala J, et al. The current state of biomarker research for Friedreich's ataxia: a report from the 2018 FARA biomarker meeting. *Future Sci OA.* 2019; 5 (6): FSO398.
10. He Y, Ecker JR. Non-CG methylation in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2015; (16): 55–77.
11. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes.* 2017; (8): e148.
12. Liu XS, Wu H, Krzisch M, Wu X, Graef J, Muffat J, et al. Rescue of Fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell.* 2018; (172): 979–92.
13. Lau C-H, Suh Y. In vivo epigenome editing and transcriptional modulation using CRISPR technology. *Transgenic Res.* 2018; 27 (6): 489–509.
14. Gomez JA, Beithner U, Segal DJ. Live-animal epigenome editing: Convergence of novel techniques. *Trends Genet.* 2019; 35 (7): 527–41.
15. Sacca F, Puoro G, Antenora A, Marsili A, Denaro A, Piro R, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS ONE.* 2011; 6 (3): e17627.
16. Plasterer HL, Deutsch EC, Belmonte M, Egan E, Lynch DR, Rusche JR. Development of frataxin gene expression measures for the evaluation of experimental treatment in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE.* 2013; 8 (5): e63958.
17. Hebinck J, Hardt C, Schols L, Vorgerd M, Briedigkeit L, Kahn CR, Ristow M. Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes.* 2000; 49 (9): 1604–7.
18. McCormick A, Farmer J, Perlman S, Delatycki M, Wilmot G, Matthews K, et al. Impact of diabetes in the Friedreich ataxia clinical outcome measures study. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2017; 4 (9): 622–31.
19. Абрамычева NYu, Fedotova EYu, Nuzhnyi EP, Nikolaeva NS, Klyushnikov SA, Ershova MV, i dr. Epigenetika bolezni Fridreykha: metilirovanie oblasti ekspansii (GAA)n-povtorov gena FXN. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2019; 74 (2): 80–7.
20. Essebier A, Wolf PV, Cao MD, Carroll BJ, Balasubramanian S, Boden M. Statistical enrichment of epigenetic states around triplet repeats that can undergo expansions. *Front Neurosci.* 2016; (10): 92.
21. Greene E, Mahishi L, Entezam L, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35 (10): 3383–90.
22. Castaldo I, Pinelli M, Monticelli A, Acquaviva F, Giacchetti M, Filla A, et al. DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J Med Genet.* 2008; 45 (12): 808–12.
23. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet.* 2008; (17): 735–46.
24. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics.* 2014; 9 (6): 823–28.

25. Fuso A, Lucarelli M. CpG and non-CpG methylation in the diet-epigenetics-neurodegeneration connection. *Curr Nutr Rep*. 2019; 8 (2): 74–82.
26. Li K, Singh A, Crooks DR, Dai X, Cong Z, Pan L, et al. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS ONE*. 2010; 5 (8): e12286.
27. Al-Mahdawi S, Sandi C, Pinto RM, Pook MA. Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (9): e74956.



## ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ ПОЗДНЕЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

Д. С. Бережной, Т. Н. Федорова, О. И. Куликова , А. В. Ставровская, Д. А. Абаймов, А. С. Гущина, А. С. Ольшанский, Д. Н. Воронков, С. Л. Стволинский

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Оценка эффективности антиоксидантных (АО) препаратов при введении на поздней стадии экспериментального паркинсонизма в условиях тотальной гибели нейронов черной субстанции (ЧС) и нарушений дофаминергической иннервации стриатума является актуальной проблемой. Целью исследования было оценить эффективность АО карнозина и липовой кислоты (ЛК) в модели поздней стадии паркинсонизма. Паркинсонизм индуцировали у крыс с помощью унилатерального стереотаксического введения 6-гидроксидофамина (ГДА) в ЧС правого полушария. АО вводили 4 раза, начиная с 14-го дня после введения токсина. Изучали влияние препаратов на поведение, гибель нейронов ЧС и метаболизм медиаторов-моноаминов. Оба препарата снижали развитие неврологической симптоматики и нарушения поведения, вызванные ГДА. Введение ГДА приводило к снижению уровня дофамина (ДА) и его метаболитов в правом стриатуме на 90% ( $p = 0,01$ ) и гибели более 95% нейронов в ЧС правого полушария ( $p = 0,01$ ). АО значимо не влияли на количество нейронов в ЧС, но увеличивали содержание метаболитов ДА относительно животных, получавших ГДА, при этом повышение содержания ДА (в 5,8 раз;  $p = 0,007$ ) наблюдали только у животных, получавших карнозин. Введение ЛК способствовало снижению серотонина на 23% ( $p = 0,006$ ) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (ГИУК) на 36% ( $p = 0,009$ ). Таким образом, при отсутствии прямого нейропротекторного эффекта было обнаружено симптоматическое действие карнозина и ЛК, что обосновывает возможность их использования в качестве дополнительной терапии болезни Паркинсона.

**Ключевые слова:** паркинсонизм, крысы линии Wistar, карнозин, липовая кислота, нейромедиаторы, физиологическое тестирование

**Информация о вкладе авторов:** Д. С. Бережной — анализ литературы, планирование исследования, подготовка черновика рукописи и финального варианта статьи; Т. Н. Федорова — анализ литературы, планирование исследования, подготовка финального варианта статьи; О. И. Куликова — анализ литературы, планирование исследования, подготовка финального варианта статьи; А. В. Ставровская — анализ литературы, планирование исследования, подготовка черновика рукописи; Д. А. Абаймов — подготовка черновика рукописи; А. С. Гущина — планирование исследования, подготовка черновика рукописи; А. С. Ольшанский — подготовка черновика рукописи; Д. Н. Воронков — подготовка черновика рукописи; С. Л. Стволинский — планирование исследования, подготовка черновика рукописи; все авторы участвовали в сборе, анализе и интерпретации данных.

**Соблюдение этических стандартов:** все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными.

✉ **Для корреспонденции:** Куликова Ольга Игоревна  
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367; kulikova@neurology.ru

**Статья получена:** 12.08.2019 **Статья принята к печати:** 30.08.2019 **Опубликована онлайн:** 18.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.060

## EFFECTS OF CARNOSINE AND LIPOIC ACID IN THE LATE STAGE OF PARKINSON'S DISEASE IN RATS

Berezhnoy DS, Fedorova TN, Kulikova OI , Stavrovskaya AV, Abaimov DA, Gushchina AS, Olshansky AS, Voronkov DN, Stvolinsky SL

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The late stage of Parkinson's disease is characterized by massive neuronal loss in the substantia nigra (SN) and degeneration of the dopaminergic innervation in the striatum. There is a need to assess the neuroprotective effect of antioxidants (AO) at this stage of the disease. The aim of our study was to assess the efficacy of two AO, carnosine and lipoic acid (LA), in the rat model of late-stage parkinsonism. The pathology was induced by a unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the SN of the right brain hemisphere. AO were administered 4 times, starting on day 14 following the injection of the toxin. We investigated the effect of the injected drugs on the behavior of rats, the loss of neurons in the SN and the metabolism of biogenic neurotransmitter amines. Both AO dampened the development of 6-OHDA-induced neurological and behavioral symptoms. 6-OHDA induced a 90% drop ( $p = 0.01$ ) in the levels of dopamine (DA) and its metabolites in the right striatum and caused death of over 95% of neurons ( $p = 0.01$ ) in the SN of the right hemisphere ( $p = 0.01$ ). AO did not have a significant effect on the number of neurons in the SN but caused an increase in the levels of DA metabolites, as compared to their levels in the animals exposed to 6-OHDA. Elevated DA (a 5.8-fold increase,  $p = 0.007$ ) was observed only in the animals treated with carnosine. LA stimulated a 23% decline in serotonin levels ( $p = 0.06$ ) and a 36% increase ( $p = 0.009$ ) in its metabolite, 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA). We conclude that although carnosine and LA did not have a direct neuroprotective effect, they could relieve the symptoms. This suggests that these AO could be used as an adjunctive component to antiparkinsonian therapy.

**Keywords:** parkinsonism, Wistar rats, carnosine, lipoic acid, neurotransmitters, behavioral tests

**Author contribution:** Berezhnoy DS analyzed the literature; planned the study; acquired, analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript and revised its final version. Fedorova TN analyzed the literature; planned the study; analyzed and interpreted the obtained data; revised the manuscript. Kulikova OI analyzed the literature; planned the study; acquired, analyzed and interpreted the obtained data; revised the manuscript. Stavrovskaya AV analyzed the literature; planned the study; acquired, analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript. Abaimov DA acquired, analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript. Gushchina AS planned the study; acquired, analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript. Olshansky AS acquired and analyzed the data; prepared the draft of the manuscript. Voronkov DN acquired analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript. Stvolinsky SL planned the study; acquired, analyzed and interpreted the obtained data; prepared the draft of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** all experiments involving the use of animals were conducted in full compliance with the international Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga I. Kulikova  
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; kulikova@neurology.ru

**Received:** 12.08.2019 **Accepted:** 30.08.2019 **Published online:** 18.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.060

Болезнь Паркинсона (БП) — это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (кчЧС). В настоящее время основные методы терапии БП симптоматические и остается актуальным поиск нейропротекторных препаратов, способных замедлить или остановить течение данного заболевания [1, 2].

Наиболее часто в качестве модели паркинсонизма на животных используют токсическую модель с введением 6-гидроксидофамина (ГДА) — селективного катехоламинергического нейротоксина, действующего как прямой источник свободнорадикальных соединений и блокатор комплексов I и IV электронтранспортной цепи митохондрий [3]. Введение крысам ГДА в область ЧС приводит практически к полной гибели дофаминергических нейронов и их терминалей в стриатуме в течение первых 10–14 дней [4]. Применение антиоксидантных (АО) препаратов как до введения ГДА, так и сразу после операции, показывает их эффективность и наличие существенного нейропротекторного эффекта [5]. Это может быть связано с их прямым действием на образующиеся в результате окисления ГДА свободные радикалы и, отчасти, с влиянием на сам процесс аутоокисления ГДА [6]; при этом действие АО направлено скорее не на предотвращение развития патологии, а на инактивацию самого токсина как этиологического фактора.

В условиях моделирования ранней стадии паркинсонизма у крыс эффективное протекторное действие проявили АО-препараты карнозин и альфа-липовая кислота (ЛК) [7]. В то же время представляет интерес оценка их эффективности при введении на более поздней стадии, когда уже произошла гибель нейронов и проявились нарушения в дофаминергической иннервации стриатума, что соответствует времени постановки диагноза и началу лечения пациентов с БП.

В связи с этим целью данного исследования было оценить влияние карнозина и ЛК на поведение и нейрохимические показатели ткани мозга крыс в модели поздней стадии паркинсонизма, индуцированного ГДА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 40 аутбредных крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3 месяцев и массой тела 250–300 г, содержащихся в стандартных контролируемых условиях вивария при 12-часовом световом цикле и свободном доступе к воде и пище.

Всех животных разделили на четыре группы: ложнооперированные животные ( $n = 9$ ), получавшие эквивалентный объем растворителя (0,05% аскорбиновой кислоты), — группа «контроль» и животные трех экспериментальных групп, которым в начале исследования вводили в ЧС ГДА (Sigma; США) в дозе 12 мкг в 3 мкл 0,05%-го раствора аскорбиновой кислоты в соответствии с координатами атласа мозга крыс ( $AP = -4,8$ ;  $L = 1,9$ ;  $V = 8,0$ ) [8]. Для анестезии применяли золетил 100 в дозе 3 мг/100 г и ксиланит в дозе 3 мг/кг массы тела внутримышечно; для премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг массы тела подкожно за 10–15 мин до введения ксиланита. На 14-, 16-, 18- и 20-й дни после введения токсина животные первой группы ( $n = 9$ ) получали внутривенно инъекции 0,9%-го раствора NaCl («ГДА + 0,9% NaCl»); второй и третьей групп ( $n = 11$  и  $n = 11$ ) — исследуемые вещества: карнозин дозой 50 мг/кг массы тела (Свидлайт АБ; Швеция) («ГДА + карнозин») и ЛК дозой 50 мг/кг массы тела (Chem-Impex Int'l Inc.; США) («ГДА + ЛК») соответственно.

На 21- и 22-й дни после введения токсина проводили физиологическое тестирование животных в тестах «открытое поле» (ОП) и «сужающаяся дорожка» (СД). Поскольку не все животные были способны пройти тест СД до конца, поведение животных на дорожке дополнительно оценивали по специальной шкале неврозоподобного состояния (табл. 1) [9]. На 25-й день эксперимента животных умерщвляли при помощи гильотины (НПК Открытая Наука; Россия) и извлекали на льду мозг, из которого выделяли дорсальный стриатум левого и правого полушарий для последующего биохимического анализа и фрагмент среднего мозга, содержащий ЧС, — для

**Таблица 1.** Балльная оценка неврозоподобного состояния животных в тесте «сужающаяся дорожка». Представлен вид активности, разные его варианты и соответствующие баллы

| Вид активности           | Элементы                 | Балл |
|--------------------------|--------------------------|------|
| Груминг                  | Нос-щеки                 | 1    |
|                          | Нос-щеки-уши             | 2    |
|                          | Нос-щеки-уши-живот       | 3    |
|                          | Нос-щеки-уши-живот-спина | 4    |
|                          | -/- + покусывания        | 5    |
| Движение                 |                          |      |
| Головой                  | Обнюхивание              | 1    |
|                          | Влево-вправо             | 2    |
|                          | Жевание                  | 3    |
|                          | Лизание                  | 3    |
| Телом                    | Поворот                  | 3    |
|                          | Пячение                  | 4    |
|                          | Замирание                | 5    |
| Свешивание               | Голова                   | 1    |
|                          | Половина тела            | 2    |
| Остановка на дорожке     |                          | 3    |
| Соскальзывание с дорожки |                          | 2    |
| Икота                    |                          | 4    |

иммуногистохимического окрашивания. Полученные образцы хранили в жидком азоте.

### Количественная оценка дофаминергических нейронов

Количественную оценку дофаминергических нейронов в области ЧС животных контрольной группы и группы «ГДА + NaCl» проводили с помощью специфического иммуногистохимического окрашивания тирозингидроксилазы (ТГ), ключевого фермента синтеза дофамина, иммунофлуоресцентным методом [10]. Образцы, фиксированные 4%-м формалином, пропитывали сахарозой, заключали в среду OCT Tissue Tek (Sigma; США) и готовили замороженные фронтальные срезы толщиной 12 мкм в области ЧС. Срезы инкубировали 24 ч с поликлональными кроличьими антителами к тирозингидроксилазе (Т8700; Sigma; США) в разведении 1 : 800 во влажной камере при комнатной температуре. Связывание первичных антител визуализировали при помощи козьих антител, меченых флуорохромом CF488, выработанных против иммуноглобулинов кролика (1 : 500; Sigma; США). Срезы заключали под покровное стекло в среду FluoroShield (Sigma; США) и фотографировали (не менее 8–10 срезов у животного с интервалом 36–48 мкм) под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u (Nikon; США), при увеличении объектива  $\times 10$ . Тела нейронов подсчитывали на поле зрения в программе ImageJ (NIH; США).

### Содержание основных нейромедиаторных аминов и их метаболитов

Содержание основных нейромедиаторных аминов и их метаболитов: дофамина (ДА), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) оценивали в стриатуме левого и правого полушарий с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на жидкостном хроматографе System Gold (Beckman Coulter Inc.; США), оснащенном амперометрическим детектором RECIPE EC 3000 (Recipe GmbH; Германия). Ткань мозга гомогенизировали в 20 объемах 0,1 N HClO<sub>4</sub> с добавлением диоксисбензиламина (0,5 ммоль/мл) в качестве внутреннего стандарта, затем центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин, для анализа использовали супернатант [7].

### Статистическая обработка данных

Использовали программу Statistica 10.0 (Dell. Inc.; США). Статистическую значимость различий определяли с помощью факторного дисперсионного анализа (ANOVA) и HSD теста Tukey для post hoc анализа. Попарное сравнение

выборки проводили с использованием *t*-теста Стьюдента и *U*-критерия Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения значений. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ неврологической симптоматики

Результаты теста СД показали наличие выраженных нарушений у животных, которым был введен ГДА ( $F(3,36) = 10,54$ ;  $p = 0,001$ ). В контрольной группе все животные проходили по дорожке в среднем за  $13,88 \pm 1,73$  с, среди животных в группе «ГДА + NaCl» только 3 из 11 животных смогли пройти тест до конца. Остальные животные демонстрировали замирание и не справлялись с тестом за отведенное время. В связи с этим в качестве интегральной характеристики по данному тесту использовали балльную оценку неврозоподобного состояния (табл. 2). В обеих группах у животных, получавших карнозин или ЛК, выраженных нарушений в поведении не было отмечено, и по результатам post hoc анализа обе группы не отличались от контрольных животных, но значимо отличались от группы «ГДА + NaCl» (табл. 2).

Оценка поведения животных в тесте ОП не выявила значимых изменений горизонтальной активности среди всех экспериментальных групп ( $F(3,36) = 1,83$ ;  $p = 0,16$ ), однако попарное сравнение показало значимые различия между группами «контроль» и «ГДА + NaCl» ( $7,97 \pm 0,42$  и  $4,21 \pm 0,77$ ;  $p = 0,001$ ). Результаты дисперсионного анализа показали изменения вертикальной активности животных ( $F(3,36) = 3,04$ ;  $p = 0,04$ ). По результатам апостериорного анализа по этому параметру, среди всех экспериментальных групп вертикальная активность была значимо снижена только в группе «ГДА + 0,9% NaCl», но не у животных, получавших карнозин или ЛК (табл. 2).

### Количество дофаминергических нейронов

Количество дофаминергических нейронов в кЧС определяли по иммуногистохимической локализации маркера дофаминовых нейронов тирозингидроксилазы. Окрашивание срезов среднего мозга на фермент тирозингидроксилазу выявило гибель нейронов у всех животных, которым вводился ГДА ( $F(3,10) = 6,33$ ;  $p = 0,01$ ) (рис. 1), и отсутствие эффектов вводимых антиоксидантных препаратов ( $F(2,8) = 0,51$ ;  $p = 0,61$ ). Так, если у контрольных животных в исследуемой области кЧС насчитывали в среднем  $166 \pm 48$  нейронов, то у животных всех экспериментальных групп, которым вводили ГДА, —  $4 \pm 2$ ,  $p = 0,01$ . Полученные данные подтверждают релевантность используемой модели.

**Таблица 2.** Влияние карнозина и липоевой кислоты (ЛК) на основные параметры поведения экспериментальных животных в тестах «сужающаяся дорожка» (СД) и «открытое поле» (ОП). Приведены результаты post hoc сравнений, выполненных с помощью HSD теста Tukey

|                  | Оценка прохождения СД (баллы) | Горизонтальная активность в ОП (м) | Вертикальная активность в ОП (стойки, шт.) |
|------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| Контроль         | $5,13 \pm 0,64$               | $7,97 \pm 0,42$                    | $11,88 \pm 1,61$                           |
| «ГДА + NaCl»     | $13,60 \pm 1,53\#$            | $4,21 \pm 0,77$                    | $4,20 \pm 1,52\#$                          |
| «ГДА + Карнозин» | $7,18 \pm 1,05^*$             | $6,32 \pm 1,38$                    | $8,64 \pm 1,50$                            |
| «ГДА + ЛК»       | $5,27 \pm 1,27^*$             | $6,16 \pm 1,14$                    | $9,90 \pm 2,29$                            |

**Примечание:** \* — значимые отличия от группы «ГДА + NaCl»,  $p < 0,05$ ; # — значимые отличия от контрольной группы,  $p < 0,05$ .

### Определение содержания медиаторов-моноаминов и их метаболитов

Факторный анализ содержания моноаминов и их метаболитов в стриатуме экспериментальных животных показал наличие изменений только в правом полушарии, в которое производили введение токсина ( $F(21,81) = 3,29$ ;  $p = 0,001$ ), но не в левом ( $F(21,69) = 1,15$ ;  $p = 0,32$ ). Однако попарное сравнение групп «ГДА + NaCl» с контролем выявило значимое повышение уровня ДОФУК (на  $19,0 \pm 5,3\%$ ) и ГВК (на  $19,1 \pm 3,8\%$ ) в левом полушарии при введении ГДА (рис. 2); при этом карнозин снижал ДОФУК до уровня контрольной группы.

В результате анализа содержания моноаминов в стриатуме правого полушария, у всех животных, которым вводили токсин, вне зависимости от терапии, наблюдали значительное снижение содержания ДА и его основных метаболитов (в среднем на 90%) (рис. 3). Интермедиат 3-МТ снижался менее интенсивно (в среднем на 58%).

Статистически значимых изменений в содержании серотонина выявлено не было, а концентрация его метаболита ГИУК в этих условиях достоверно увеличилась (на 38%) по сравнению с контролем (рис. 4).

Достоверное увеличение содержания ДА в стриатуме (в 5,8 раза,  $p = 0,007$ ) по сравнению с группой «ГДА + NaCl» наблюдали только у животных, получавших карнозин. При этом содержание метаболитов ДА (ДОФУК и ГВК) увеличивалось при введении карнозина в 3,4 ( $p = 0,04$ ) и 8,8 ( $p = 0,01$ ) раза, а при введении ЛК в 4,7 ( $p = 0,03$ ) и 7,4 ( $p = 0,04$ ) раза соответственно (рис. 3). Влияния исследуемых препаратов на уровень 3-МТ отмечено не

было. Содержание серотонина и его метаболита ГИУК в группе, получавшей ЛК, снижалось примерно на 23% ( $p = 0,006$ ) и 36% ( $p = 0,009$ ) соответственно по отношению к группе «ГДА + NaCl». Карнозин не оказывал влияния на содержание серотонина и его метаболитов.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведена комплексная оценка влияния АО карнозина и ЛК на поведение животных в физиологических тестах и на метаболизм ДА и серотонина в нервной ткани стриатума на модели паркинсонизма у крыс. Паркинсонизм индуцировали унилатеральным введением ГДА в ЧС, с инъекцией АО, начиная с 14-го дня после операции, чтобы исключить их влияние на аутоокисление токсина и процессы гибели нейронов, происходящие ранее.

Гибель нейронов и денервация ипсилатерального стриатума были подтверждены методом иммуногистохимического окрашивания дофаминергических нейронов ЧС и значительным снижением уровня ДА и его метаболитов в стриатуме правого полушария, в которое вводили токсин, при этом вне зависимости от терапии, уровень ДА и его метаболитов оставался сниженным относительно контроля. В то же время карнозин и ЛК повлияли на метаболизм ДА, увеличив содержание его метаболитов относительно группы животных, получавших токсин, при этом достоверное повышение содержания самого ДА наблюдали только в группе животных, получавших карнозин. Введение ЛК способствовало снижению серотонина и его метаболита ГИУК относительно группы, получавшей токсин. Учитывая,

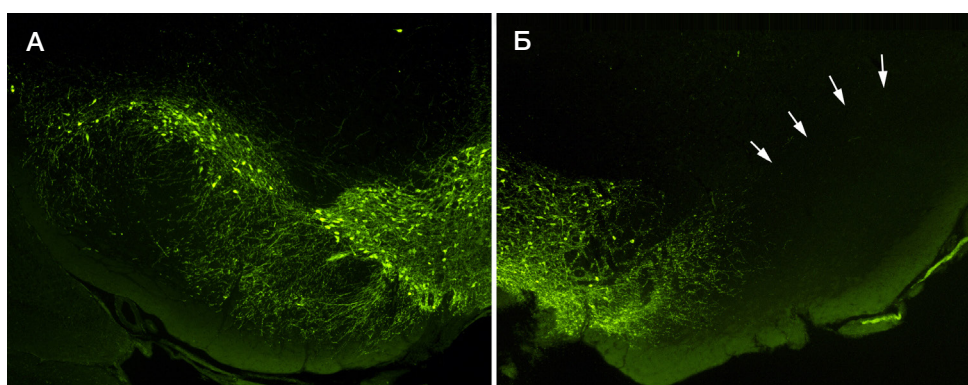


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное выявление тирозингидроксилазы в ЧС при одностороннем интранигральном введении 6-гидроксидофамина. А. Левое полушарие, введение физиологического раствора. Б. Правое полушарие, введение ГДА (стрелками показана поврежденная область ЧС, лишенная дофаминовых нейронов; ув. об.  $\times 10$ )

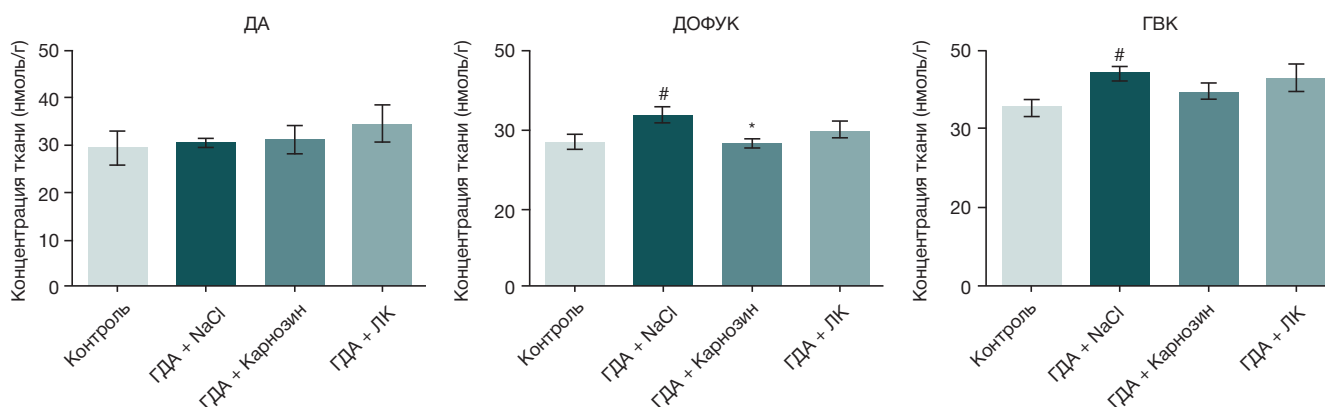
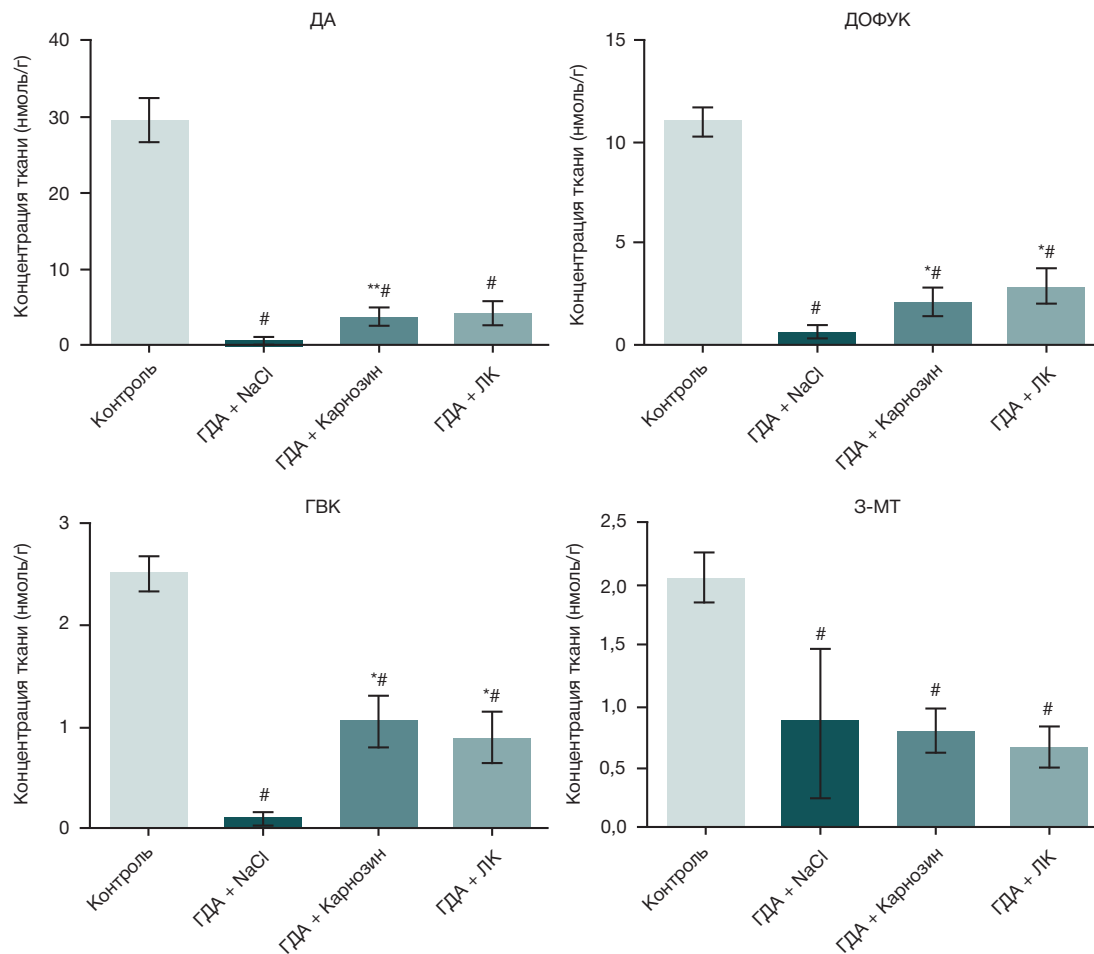
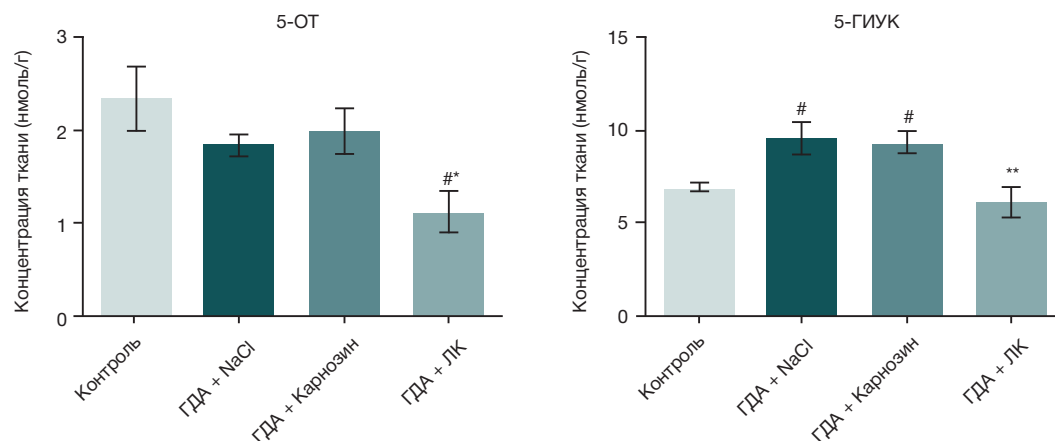


Рис. 2. Влияние карнозина и липоевой кислоты (ЛК) на содержание дофамина (ДА), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме левого полушария. # — достоверные отличия от контрольной группы,  $p < 0,05$ ; \* — достоверные отличия от группы «ГДА + NaCl»,  $p < 0,05$



**Рис. 3.** Влияние карнозина и липоевой кислоты (ЛК) на содержание дофамина (ДА), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК) и 3-метокситирамина (3-МТ) в стриатуме правого полушария. # — достоверные отличия от контрольной группы,  $p < 0,05$ ; \* — достоверные отличия от группы «ГДА + NaCl»,  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$



**Рис. 4.** Влияние карнозина и липоевой кислоты (ЛК) на содержание серотонина (5-ОТ) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в стриатуме правого полушария. # — достоверные отличия от контрольной группы,  $p < 0,05$ ; \* — достоверные отличия от группы «ГДА + NaCl»,  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$

что серотонин усиливает активность нейрхимических механизмов двигательных нарушений при БП, а снижение серотонинергической нейротрансмиссии в системе базальных ядер головного мозга, напротив, оказывает антипаркинсонический эффект [11], установленное влияние ЛК на серотонинергическую иннервацию может вносить определенный вклад в устранение двигательных нарушений при паркинсонизме.

Физиологическое тестирование выявило снижение паркинсоноподобной неврологической симптоматики и значительно менее выраженные поведенческие

нарушения у животных, получавших оба АО-препарата. Четырехкратное введение как карнозина, так и ЛК на 14–20-й дни эксперимента предотвращало развитие неврозоподобного состояния животных, вызванного ГДА.

На экспериментальных моделях токсин-индуцированного паркинсонизма у крыс показаны положительные нейропротекторные эффекты как карнозина [12], так и липоевой кислоты [13]. Оба препарата восстанавливали антиоксидантный статус мозга, снижали уровень перекисного окисления, а липоевая кислота также увеличивала двигательную активность животных [13].



Однако в данных исследованиях препараты вводились одновременно с токсином, и не была проведена оценка гибели нейронов ЧС. Это осложняет интерпретацию полученных результатов и оставляет открытым вопрос о механизмах действия данных соединений. Проведенное нами исследование позволяет обоснованно судить о симптоматических эффектах применения данных препаратов на поздних сроках развития экспериментального паркинсонизма.

В целом, полученные данные указывают на целесообразность применения изученных антиоксидантных препаратов в дополнение к базисной терапии паркинсонизма. Ранее уже было предложено использование липоевой кислоты в качестве

дополнительной терапии к леводопе [14], а для сочетанного применения карнозина с леводопой даже была показана клиническая эффективность [15].

## ВЫВОДЫ

При отсутствии прямого нейропротекторного эффекта нами было обнаружено значимое симптоматическое действие карнозина и ЛК, механизм которого связан с компенсаторным увеличением содержания ДА и его метаболитов и одновременным снижением уровня серотонина. В целом, полученный эффект предполагает возможность использования изученных антиоксидантов в качестве дополнительной симптоматической терапии БП.

## Литература

1. Sarkar S, Raymick J, Imam S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (6): E904. DOI: 10.3390/ijms17060904. PMID: 27338353.
2. Иллариошкин С. Н., Сломинский П. А., Шадрина М. И., Багыева Г. Х., Загоровская Т. Б., Маркова Е. Д. и др. Гетерогенность спорадической болезни паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2007; 1 (1): 23–31.
3. Mazzi EA, Reams RR, Soliman KF. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Research.* 2004; 1004 (1): 29–44.
4. Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 1995; 4 (2): 131–7.
5. Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 2005; 39 (10): 1119–25. PMID: 7583676.
6. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2000; 74 (4): 1605–12. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x. PMID: 10737618.
7. Kulikova OI, Berezhnoy DS, Stvolinsky SL, Lopachev AV, Orlova VS, Fedorova TN. Neuroprotective effect of the carnosine — alpha-lipoic acid nanomicellar complex in a model of early-stage Parkinson's disease. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018; 95: 254–9. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.03.025. PMID: 2960191.
8. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 6th Edition. San Diego: Academic Press, 2006. 456 p.
9. Болотова В. Ц., Крауз В. А., Шустов Е. Б. Биологическая модель экспериментального невроза у лабораторных животных. *Биомедицина.* 2015; (1): 66–80.
10. Худоевков Р. М., Воронков Д. Н., Дикалова Ю. В. Количественная морфохимическая характеристика нейронов черной субстанции мозга крысы и ее объемная реконструкция. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013; 156 (6): 861–4.
11. Крыжановский Г. Н., Магаева С. В., Трекова Н. А., Ветрилэ Л. А., Башарова Л. А., Атаджанов М. А. Участие серотонинергического аппарата стриатума в паркинсоническом синдроме. *Бюлл. эксперим. биол. и медицины.* 1993; (5): 466–9.
12. Zhao J, Shi L, Zhang LR. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. *Exp Ther Med.* 2017; 14 (1): 664–70.
13. de Araujo DP, De Sousa CN, Araujo PV, Menezes CE, Sousa Rodrigues FT, Escudeiro S S, et al. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA in rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; (1): 571–8.
14. Di Stefano A, Sozio P, Cocco A, Iannitelli A, Santucci E, Costa M, et al. L-dopa- and dopamine-(R)-alpha-lipoic acid conjugates as multifunctional codrugs with antioxidant properties. *J Med Chem.* 2006; 49 (4): 1486–93.
15. Федорова Т. Н., Багыева Г. Х., Степанова М. С., Добротворская И. С., Иванова-Смоленская И. А., Полевая Е. В. и др. Эффективность карнозина при болезни Паркинсона. *Неврологический вестник.* 2009; 41 (1): 24–9.

## References

1. Sarkar S, Raymick J, Imam S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (6): E904. DOI: 10.3390/ijms17060904. PMID: 27338353.
2. Illarioshkin SN, Slominsky PA, Shadrina MI, Bagyeva GK, Zagorovskaya TB, Markova ED, et al. The heterogeneity of sporadic Parkinson's disease: a molecular approach to solving a problem. *Annaly Klinicheskoy I Eksperimental'noy Nevrologii.* 2007; 1 (1): 23–31. Russian.
3. Mazzi EA, Reams RR, Soliman KF. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Research.* 2004; 1004 (1): 29–44.
4. Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 1995; 4 (2): 131–7.
5. Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 2005; 39 (10): 1119–25. PMID: 7583676.
6. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2000; 74 (4): 1605–12. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x. PMID: 10737618.
7. Kulikova OI, Berezhnoy DS, Stvolinsky SL, Lopachev AV, Orlova VS, Fedorova TN. Neuroprotective effect of the carnosine — alpha-lipoic acid nanomicellar complex in a model of early-stage

- Parkinson's disease. Regul Toxicol Pharmacol. 2018; 95: 254–9. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.03.025. PMID: 2960191.
8. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Edition. San Diego: Academic Press, 2006. 456 p.
9. Bolotova VTs, Krauz VA, Shustov EB. Biological model of experimental neurosis in laboratory animals. Biomedicina. 2015; (1): 66–80. Russian.
10. Khudoerkov RM, Voronkov DN, Dikalova YuV. Quantitative morphochemical characteristics of the neurons of the rat brain's substantia nigra and its volume reconstruction. Bull experiment biol and medicine. 2013; 156 (6): 861–4. Russian.
11. Kryzhanovsky GN, Magaeva SV, Trekova HA, Vetrila LA, Basharova LA, Atadzhanov MA. Participation of the serotonergic apparatus of the striatum in the Parkinsonian syndrome. Bull experiment biol and medicine. 1993; (5): 466–9. Russian.
12. Zhao J, Shi L, Zhang LR. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. Exp Ther Med. 2017; 14 (1): 664–70.
13. de Araujo DP, De Sousa CN, Araujo PV, Menezes CE, Sousa Rodrigues FT, Escudeiro S S, et al. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic Acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA in rat. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; (1): 571–8.
14. Di Stefano A, Sozio P, Cocco A, Iannitelli A, Santucci E, Costa M, et al. L-dopa- and dopamine-(R)-alpha-lipoic acid conjugates as multifunctional codrugs with antioxidant properties. J Med Chem. 2006; 49 (4): 1486–93.
15. Fedorova TN, Bagieva GH, Stepanova MS, Dobrotvorskaya MS, Ivanova-Smolenskaya IA, Polevaya EV, et al. Effectivity of carnosine in Parkinson's disease. Neurological bull. 2009; 41 (1): 24–9. Russian.

## ИЗМЕНЕНИЯ КОННЕКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЯМИ ВЕРБАЛЬНОЙ ОПЕРАТИВНОЙ ПАМЯТИ ПРИ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

В. Ф. Фокин ✉, Н. В. Пономарева, Р. Н. Коновалов, М. В. Кротенкова, Р. Б. Медведев, О. В. Лагода, М. М. Танашян

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Один из методов оценки когнитивных функций у пациентов с хроническими цереброваскулярными заболеваниями — исследование коннективности нейросетей с помощью анализа показателей функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) покоя. Основной целью исследования было оценить взаимосвязь коннективности различных отделов мозга с характеристиками вербальной оперативной памяти (ВОП) у больных с дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ). В исследовании участвовали 22 женщины с ДЭ, разделенные на две группы: с удовлетворительной и сниженной ВОП. У всех пациенток определяли коннективность между различными областями мозга с помощью анализа фМРТ покоя с использованием программных приложений SPM-12 и CONN18b в среде Matlab, а также оценивали отношение объемов серого вещества к белому и сопряженность этого показателя с ВОП. У больных в группе с удовлетворительной ВОП и в группе со сниженной ВОП статистически значимые различия коннективности обнаружены между следующими областями: левой парагиппокампальной областью и правой супрамаргинальной извилиной; правым полушарием мозжечка и левой теменной, а также левой лобной областями; правой поясной и левой язычной извилинами. Кроме того, в обеих группах выявлены статистически значимые различия в отношениях между объемами серого и белого вещества ( $p = 0,007$ ). Полученные результаты указывают, что снижение памяти у больных с ДЭ сопровождается сокращением коннективности между областями коры, а также между мозжечком и корой, что может быть связано с более значительной утратой белого вещества.

**Ключевые слова:** дисциркуляторная энцефалопатия, нейровизуализация, фМРТ покоя, вербальная оперативная память, коннективность, когнитивные функции, серое и белое вещество мозга

**Финансирование:** работа была выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН.

**Информация о вкладе авторов:** В. Ф. Фокин — анализ данных, написание статьи; Н. В. Пономарева — сбор и анализ психометрических и нейровизуализационных данных, участие в написании статьи; Р. Н. Коновалов — нейровизуализационные исследования, обработка результатов; М. В. Кротенкова — нейровизуализационные исследования, анализ результатов; Р. Б. Медведев — клинические обследования, анализ литературы; О. В. Лагода — анализ клинических данных; М. М. Танашян — обобщение клинического материала в контексте полученных результатов.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 11/14 от 19 ноября 2014 г.); все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Виталий Федорович Фокин  
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367; fvf@mail.ru

**Статья получена:** 19.08.2019 **Статья принята к печати:** 13.09.2019 **Опубликована онлайн:** 22.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.061

## BRAIN CONNECTIVITY CHANGES IN PATIENTS WITH WORKING MEMORY IMPAIRMENTS WITH CHRONIC ISCHEMIC CEREBROVASCULAR DISEASE

Fokin VF ✉, Ponomareva NV, Konovalov RN, Krotenkova MV, Medvedev RB, Lagoda OV, Tanashyan MM

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

One of the methods of assessment of cognitive functions in patients with chronic ischemic cerebrovascular disease — CICD (dyscirculatory encephalopathy) implies studying connectivity of neural networks through the analysis of rest functional magnetic resonance imaging (rest fMRI) data. The main objective of this study was to assess the relationship between working memory (WM) characteristics and connectivity of various parts of the brain in patients diagnosed with CICD. The study involved 22 female CICD patients; they were divided into two groups, one with satisfactory level of WM and the other with compromised WM. We assessed intra-brain connectivity with the help of rest fMRI, using the SPM-12 and CONN18b software applications in Matlab platform. The other aspects evaluated were the gray to white matter ratio and the association of this indicator with WM. Significant differences in the intra-brain connectivity were registered in both the satisfactory WM group and the compromised WM group. The brain parts where those differences were found are left parahippocampal area and right supramarginal gyrus; right cerebellar hemisphere and left parietal, as well as left frontal areas; right cingular and left lingual gyri. In addition, we detected significant differences in the ratio in the gray and white matter volumes in both groups ( $p = 0.007$ ). The results obtained indicate that memory deterioration in CICD patients is concomitant with deteriorating connectivity between the cortical areas, as well as between cerebellum and cortex, which may be associated with a more significant loss of the white matter.

**Keywords:** neuroimaging, rest fMRI, working memory, connectivity, cognitive functions, gray and white matter of the brain, chronic ischemic cerebrovascular disease

**Funding:** the study was ordered by the Research Center of Neurology (Federal Research Institution).

**Author contribution:** Fokin VF — data analysis, article authoring; Ponomareva NV — psychometric and neuroimaging data collection and analysis, participation in authoring the article; Konovalov RN — neuroimaging, processing of the results; Krotenkova MV — neuroimaging, analysis of the results; Medvedev RB — clinical examinations, analysis of the literature; Lagoda OV — analysis of the clinical data; Tanashyan MM — generalization of the clinical material in the context of the results obtained.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Research Center of Neurology Ethics Committee (Protocol № 11/14 dated November 19, 2014); all participants signed the voluntary informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vitaly F. Fokin  
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; fvf@mail.ru

**Received:** 19.08.2019 **Accepted:** 13.09.2019 **Published online:** 22.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.061

Сосудистые поражения головного мозга у пожилых людей являются важной не только медицинской, но и социально-экономической проблемой. По данным ряда авторов, когнитивные нарушения сосудистого генеза выявляют у 5–22% пожилых людей [1, 2]. В отечественной литературе такие расстройства традиционно рассматривают в рамках дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ). Определенное место в клинической картине ДЭ занимают мнестические расстройства, включая снижение вербальной оперативной памяти (ВОП) [3–5]. Патоморфологической основой когнитивных нарушений при ДЭ являются диффузные и множественные лакунарные очаговые изменения в подкорковом белом веществе и коре головного мозга, причем наиболее часто встречающиеся подкорковые нарушения связаны с атеросклеротическим поражением или липогиалинозом мелких пенетрирующих артерий, кровоснабжающих глубинные отделы мозга [4]. Многочисленные исследования свидетельствуют, что нейрохимической основой сосудистых когнитивных нарушений является ацетилхолинергическая недостаточность. Причиной ее возникновения при ДЭ служит ишемическое поражение перивентрикулярного белого вещества, в котором проходят, в том числе, ацетилхолинергические аксоны [6]. Необходимость ранней диагностики когнитивных нарушений не вызывает сомнений, так как своевременное проведение адекватной терапии именно на ранних стадиях заболевания наиболее эффективно и позволяет улучшить прогноз. Когнитивную деятельность сопровождает координированная обработка информации в распределенных областях мозга. Нарушение коммуникаций в нейронных сетях приводит к ошибкам сопряженности информации, поступающей из различных областей мозга, и, как следствие, к когнитивной дисфункции. Неполная синхронизация новой коры со структурами древней и старой коры, подкорковыми образованиями и мозжечком сопровождается нарушением высших психических функций, включая процессы памяти. Эти процессы можно наблюдать при нормальном старении, особенно при сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях мозга, и часто они вызваны потерей белого вещества, обеспечивающего коммуникации между различными образованиями мозга [7, 8].

Связанность компонентов системы в единое целое называют связностью; это определение можно отнести и к работе мозга. Связность, по данным фМРТ покоя, определяют по синхронизации BOLD (blood oxygen level-dependent) сигнала в различных областях мозга. Связность, по данным фМРТ покоя и фоновой электроэнцефалографии, связана с когнитивными функциями, в том числе и с памятью. В общем случае снижение связности между различными областями мозга приводит к когнитивной дисфункции [9, 10].

Нормальное функционирование нервных сетей зависит от адекватного соответствия метаболических потребностей и кровоснабжения. Связность в нейронных сетях при ДЭ закономерно снижается, как и когнитивные функции, что связано с гибелью нейронов и их аксонов в различных образованиях мозга. Повреждения белого вещества часто обнаруживают при МРТ-сканировании головного мозга в пожилом возрасте; эти повреждения активно участвуют в патогенезе когнитивного снижения и деменции. Связь сосудистых факторов риска с повреждением белого вещества нарушает синхронизированную деятельность различных, особенно удаленных, областей мозга между собой. На практике для оценки относительного

преобладания поражения серого или белого вещества часто используют отношение серого вещества к белому [11, 12].

Целью исследования было оценить по данным фМРТ покоя сопряженность вербальной оперативной памяти с изменениями связности и с отношением серого вещества к белому у больных ДЭ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в ФГБНУ НЦН в 2017–2019 гг. В нем участвовали 22 пациентки в возрасте 50–85 лет (средний возраст — 64 года). Критерии включения в исследование: наличие хронических цереброваскулярных заболеваний (ДЭ 1–2-й стадии; диагноз ДЭ устанавливали в соответствии с классификацией сосудистых поражений головного и спинного мозга, разработанной в НИИ неврологии РАМН в 1985 г.); наличие основного сосудистого заболевания и рассеянных очаговых неврологических симптомов в сочетании с общемозговыми симптомами: головной болью, головокружением, шумом в ушах, снижением памяти, работоспособности и интеллекта; наличие зарегистрированной артериальной гипертензии; наличие нарушений когнитивных функций (нарушение памяти, работоспособности, раздражительности) [13]; все пациентки были правшами. Критерии исключения: деменция выраженностью 1 балл и более по клинически-рейтинговой шкале деменции (Clinical Dementia Rating Scale [14]), а также наличие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения; черепно-мозговой травмы; тяжелая кардиальная, метаболическая (сахарный диабет 2-го типа) патология; почечная недостаточность, некомпенсированные нарушения функций щитовидной железы; противопоказания к проведению МРТ-исследования.

Разделению пациентов на две группы предшествовало прохождение ими ряда тестов. Для психометрического обследования проводили тест вербальной памяти Лурии [15], адаптированный для больных с данным видом сосудистой патологии. Оценивали суммарное количество слов, которые запоминали пациентки при пяти повторениях 10 слов. В зависимости от успешности выполнения части этого теста, связанного с непосредственным воспроизведением слов, пациентки были разделены на две равные группы с более низкими и более высокими, чем медиана, показателями запомненных слов:  $27,7 \pm 1,4$  и  $35,8 \pm 0,8$ . Различие по этому показателю памяти в образованных группах статистически высоко достоверно ( $p = 0,000006$ ). Группы статистически не различались по возрасту ( $p = 0,26$ ) и для удобства обозначения условно были названы группой со сниженной ВОП и группой с удовлетворительной ВОП. Пациенты групп различались также и по отсроченному воспроизведению слов ( $p = 0,0008$ ).

По результатам проведенного теста вербальной беглости (ВБ) [16], группы не различались между собой по суммарному показателю ВБ ( $p = 0,57$ ).

По результатам выполнения корректурной пробы, основанной на n-back тесте Кирчнера, характеризующего устойчивость и концентрацию внимания [16], группы также не различались между собой ( $p = 0,77$ ).

Всем испытуемым проводили оценку когнитивных функций по Монреальской шкале (MoCa), разработанной для скрининга когнитивных нарушений. По данному тесту пациентки обеих групп тоже не различались ( $p = 0,68$ ), средние значения для обеих групп составили  $25,6 \pm 1,2$  и  $25,0 \pm 0,9$ , означая, что у больных обеих групп имели место



достаточно легкие когнитивные нарушения (норма 26–30 баллов) [17].

Пациенты значимо не различались по тесту серийного счета: вычитания из 100 по 7 [15].

Всем обследуемым проводили фМРТ покоя головного мозга в последовательности T2\* для получения BOLD-сигнала на магнитно-резонансном томографе Magnetom Verio (Siemens; Germany) с величиной магнитной индукции 3,0 Тесла. Исследуемые придерживались инструкции: максимально расслабиться, лежать спокойно с закрытыми глазами (для исключения стимуляции зрительного анализатора) и не думать ни о чем конкретном. fMRI-данные обрабатывали в программе SPM12 (Functional Imaging Laboratory at University College London; Великобритания) в среде MATLAB (MathWorks; США). Для изучения коннективности использовали приложение CONN-18b (McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology; США) в toolbox программы SPM-12 [18]. Оценивали коннективность в различных нейросетях мозга, включая сеть пассивного режима работы мозга (СПРРМ).

В двух группах больных, различающихся по характеристикам ВОП, проводили сравнение коннективности; оценивали достоверность различий по стандартизованному коэффициенту регрессии с поправкой на множественность сравнений в программе CONN-18b (McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology; США).

В той же программе CONN 18b проводили волюметрические исследования, оценивая в целом мозге объем серого и белого вещества, а также цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Группы с низкой и удовлетворительной памятью не различались по объему ЦСЖ ( $p = 0,58$ ), что указывает на примерно равный объем атрофии у пациентов в обеих группах. Анализировали отношение объема серого вещества к белому веществу.

Использовали статистический пакет Statistica-12 (Dell; США) для дисперсионного анализа и других методов вариационной статистики, а также приложения SPM-12 и CONN-18b в среде MATLAB для оценки коннективности. Коннективность и групповые различия коннективности оценивали с поправкой на множественность сравнений с учетом ошибки ложноположительных результатов (FDR, false discovery rate).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе больных ДЭ с низкой оперативной памятью коннективность левой передней парагиппокампальной

области была ограничена, в основном, подкорковыми образованиями (рис. 1А). У больных с удовлетворительной памятью (тест на количество слов) помимо коннективных связей с подкорковыми образованиями имели место отрицательные показатели коннективности между левой передней парагиппокампальной областью и правой супрамаргинальной извилиной, которые, вероятно, указывают на тормозный характер этих связей (рис. 1Б). Межгрупповое сравнение коннективности показало, что достоверное различие по коннективности между группами имеет место между левой передней парагиппокампальной областью и правой супрамаргинальной извилиной (рис. 1В).

Значимые различия коннективности в двух группах больных наблюдали также между правым полушарием мозжечка (сегменты 4 и 5) и новой корой. В группе со сниженной памятью отсутствовала негативная сопряженность между правым полушарием мозжечка и корой (рис. 2). Различия между группами были статистически значимы ( $p < 0,05$ ) (рис. 2В).

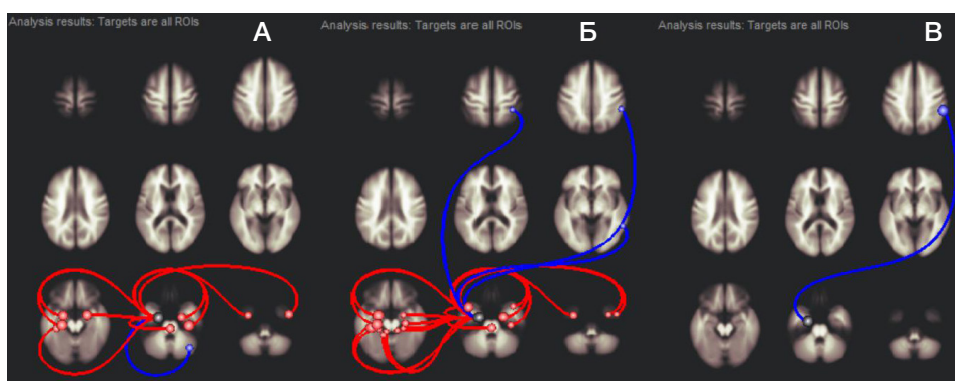
Корреляционные связи поясной извилины, входящей в СПРРМ, также различались в сравниваемых группах (рис. 3). В группе больных с удовлетворительной ВОП обнаружена более высокая коннективность между правой поясной и левой язычной извилинами, чем у больных со сниженной памятью (рис. 3В).

Статистические показатели всех найденных межгрупповых различий, достоверно различающихся с учетом множественности сравнений, представлены в таблице.

Поскольку для ДЭ характерно повреждение белого вещества, возможно, что снижение коннективности и памяти может быть связано с потерей белого вещества. Получены статистически значимые различия отношения объема серого вещества к белому в группах с удовлетворительной и сниженной ВОП. У лиц со сниженной памятью это отношение достоверно выше, чем у лиц с удовлетворительной памятью ( $p = 0,007$ ) (рис. 4). Это указывает на относительно большую утрату белого вещества у больных со сниженной памятью.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Больные ДЭ страдают прогрессирующим ухудшением памяти, связанным, в основном, с ухудшением воспроизведения заученного материала [6]. На ранней стадии когнитивного снижения у некоторых пациентов ВОП больных ДЭ почти не отличается от памяти здоровых



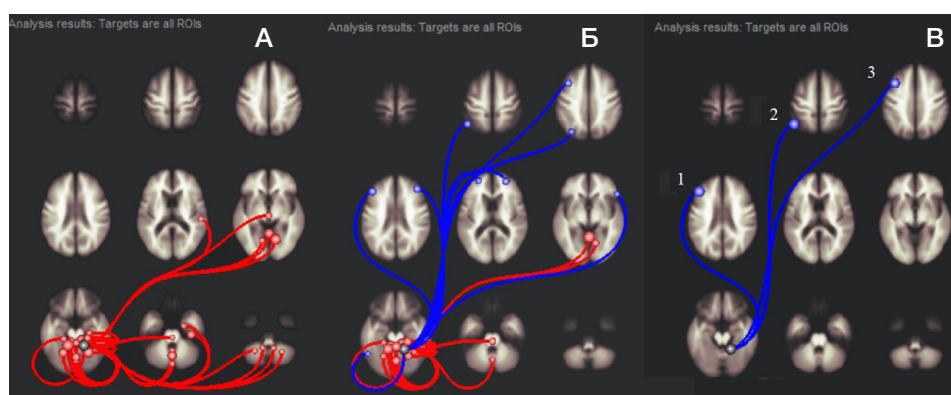
**Рис. 1.** Коннективность левой передней парагиппокампальной области с различными образованиями мозга в группе больных ДЭ со сниженной ВОП (А) и удовлетворительной ВОП (Б). В. Сравнение коннективности между группами (Б–А). Красными линиями показана положительная корреляция, синими — отрицательная. Синие линии на рис. В указывают на значимые различия у больных с удовлетворительной вербальной оперативной памятью по сравнению с больными со сниженной вербальной оперативной памятью. Представлены только статистически достоверные связи с учетом поправки FDR ( $p < 0,05$ ) на множественность сравнений



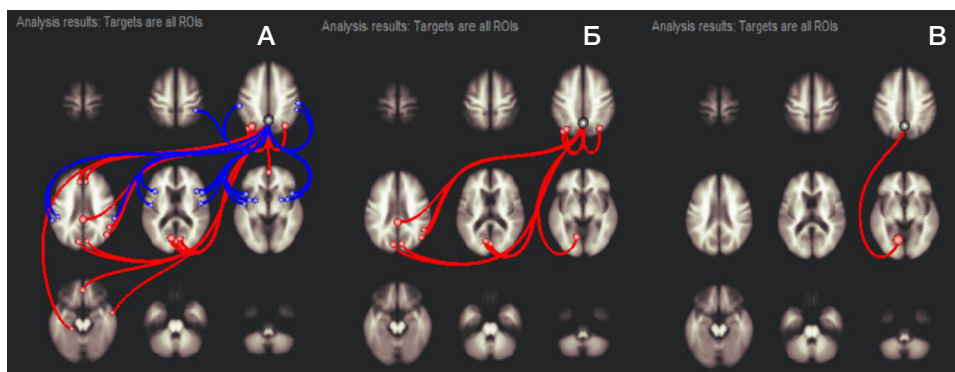
людей, тогда как в последующем она закономерно снижается [19]. В настоящей работе сделана попытка исследовать патогенетические механизмы снижения вербальной оперативной памяти у больных ДЭ, связанные с изменением функциональной связности в нейросетях мозга. Ухудшение памяти обычно связывают с повреждением гиппокампа и энторинальной коры. Значимых различий по показателям связности в группах больных со сниженной и удовлетворительной ВОП в гиппокампе не было, однако такие различия имели место в парагиппокампальной области, в которой происходит соединение новой коры (неокортекса) и гиппокампального комплекса (аллокортекса). Эта область получает когнитивную и сенсорную информацию от ассоциативной коры и передает ее гиппокампу для перевода в долгосрочную память. Супрамаргинальная извилина связана с интеграцией слуховой и зрительной информации и участвует в механизмах оперативной памяти. Поэтому закономерны полученные результаты

о более высоких показателях связности между парагиппокампальной областью и супрамаргинальной извилиной у лиц с удовлетворительной ВОП [19].

Когнитивное снижение связано и с мозжечком. В группе больных ДЭ с удовлетворительной ВОП найдена значимая отрицательная связность правого полушария (сегменты 4 и 5) мозжечка с корой и подкорковыми образованиями. Ухудшение оперативной памяти при ДЭ связано со значительным сокращением связности между корой и мозжечком при сохранении связности на уровне подкорковых образований. Мозжечок связывают преимущественно с разными двигательными функциями. Однако примерно со второй половины прошлого века появляются работы, указывающие на связь мозжечка с немоторными функциями, включая когнитивные. Интересно, что двигательные нарушения при ДЭ часто идут параллельно снижению когнитивных функций. Речь идет в первую очередь о функциях языка, обучения и памяти [20, 21]. Представительства этих функций в мозжечке



**Рис. 2.** Коннективность сегментов 4 и 5 правого полушария мозжечка с различными областями головного мозга в группах больных ДЭ со сниженной и удовлетворительной ВОП. Сегменты 4–5 относятся к переднему мозжечку. **А.** Группа пациентов с низкой ВОП. **Б.** Группа пациентов с удовлетворительной ВОП. **В.** Разность коннективностей (**Б–А**). 1, 2 — области интересов находятся в левой лобно-теменной сети (ЛТС); 3 — средняя лобная извилина

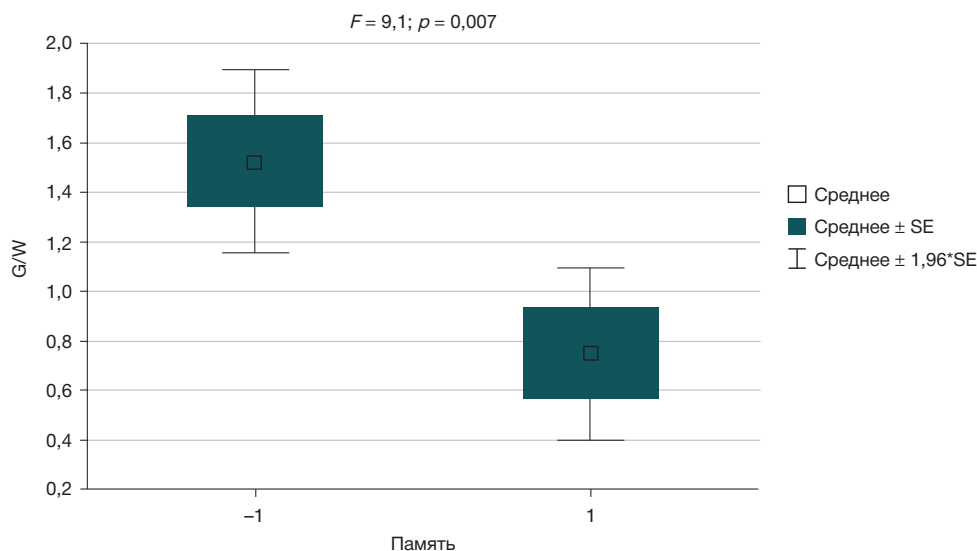


**Рис. 3.** Коннективность задней части правой поясной извилины, входящей в СПРРМ, в группах больных ДЭ со сниженной и удовлетворительной ВОП. (Обозначения см. на рис. 1 и 2.) Межгрупповые различия коннективной связи найдены между правой поясной извилиной и левой язычной извилиной

**Таблица.** Статистические показатели межгрупповых различий коннективности у больных со сниженной и удовлетворительной ВОП

| Области интересов                  | Бета  | Т-критерий | Некорректированный уровень значимости | Уровень значимости $p$ с поправкой на множественность (FDR) |
|------------------------------------|-------|------------|---------------------------------------|---|
| Л-ЛТС, лобная область — мозжечок   | –0,18 | –4,46      | 0,000242                              | 0,02196   |
| Л-ЛТС, теменная область — мозжечок | –0,23 | –4,41      | 0,000268                              | 0,02196   |
| СЛИ — мозжечок                     | –0,21 | –4,05      | 0,000622                              | 0,03401   |
| Л-ПГО — Пр-СМИ                     | –0,30 | –5,33      | 0,000032                              | 0,00524   |
| СПРРМ — Л-ЯИ                       | 0,25  | 4,43       | 0,000259                              | 0,04240   |

**Примечания:** бета — стандартизированный коэффициент регрессии; FDR — ошибка ложноположительных результатов; отрицательный знак у бета и Т-критерия указывает на отрицательную коннективность; Л — левый; Пр — правый; ЛТС — лобно-теменная сеть; СЛИ — средняя лобная извилина; ПГО — парагиппокампальная область; СМИ — супрамаргинальная извилина; СПРРМ — сеть пассивного режима работы мозга; ЯИ — язычная извилина.



**Рис. 4.** ВОП и отношение между объемом серого и белого вещества мозга (G/W). «-1» и «1» — группы больных ДЭ со сниженной и удовлетворительной ВОП соответственно. Отношение между объемами серого (G) и белого (W) вещества (по оси ординат). Статистические показатели различий между группами:  $F$  — критерий Фишера,  $p$  — уровень значимости (вверху)

пространственно разнесены, при этом память связана с сегментами мозжечка 4, 5 и 6 [22]. Накапливаются данные об участии мозжечка в регуляции сенсомоторных, вестибулярных и когнитивных функций [23]. В наших исследованиях ВОП также была связана с 4-м и 5-м сегментами мозжечка. Исследование функциональной топографии мозжечка выявило связи переднего отдела мозжечка не только с регуляцией сенсомоторных функций, но и с когнитивными функциями, а также с рядом нейросетей, включая СПРРМ, фронто-париетальные сети и др. Вероятно, что рассогласование работы новой коры и мозжечка, о чем свидетельствуют данные снижения коннективности при развитии ДЭ, сказывается и на нарушении моторных и когнитивных функций.

Существенную роль в процессах памяти играет и СПРРМ [24]. Язычная извилина принимает участие в переработке зрительной информации, и ее коннективность с СПРРМ достоверно выше у лиц с удовлетворительной ВОП.

Можно предполагать, что одна из причин ухудшения коннективности и памяти — в сокращении доли белого вещества, которое наблюдается при нормальном и сосудистом типах старения. Развитие ДЭ сопровождается повреждением белого вещества, при этом часто нарушается соотношение между серым и белым веществом, которое интегративно отражает преимущественную утрату серого или белого вещества. Как было показано методами диффузионно-тензорной томографии в лонгитудинальных исследованиях, созревание нейронных связей и развитие тонкой структуры белого вещества способствуют увеличению объема оперативной памяти [12, 25]. Уменьшение объема белого вещества при нейродегенеративных болезнях Альцгеймера и Крейтцфельда-Якоба непосредственно коррелирует с сокращением рабочей памяти [26, 27]. ДЭ практически во всех случаях сопровождается артериальной гипертензией. При этом повышение артериального давления у пожилых людей, имеющих

субъективные жалобы на снижение памяти, происходило на фоне дегенеративных изменений не только серого, но и белого вещества, близких к тем, которые наблюдают на ранних стадиях болезни Альцгеймера [28]. Поражение белого вещества (лейкоареоз) при ДЭ коррелирует, в целом, с когнитивным снижением [29]. Понятно, что сокращение доли белого вещества будет тем больше, чем больше утрата длинноаксонных нейронов, включая те, которые участвуют во взаимодействии новой коры с подкорковыми центрами и мозжечком, а также в корково-корковой интеграции.

Таким образом, кажется вероятным, что ухудшение оперативной памяти при ДЭ в значительной мере связано с сокращением в мозге доли белого вещества.

## ВЫВОДЫ

1. У больных ДЭ нарушения ВОП более значительны в случае снижения функциональной коннективности в нейросетях мозга, оцененной с помощью фМРТ.
2. Статистически значимые различия между группами больных ДЭ с более высокими и более низкими показателями ВОП были выявлены по показателям коннективности между следующими областями мозга: правым полушарием мозжечка и левой теменной, а также левой лобной областями; левой парагиппокампальной областью и правой супрамаргинальной извилиной; правой поясной и левой язычной извилинами.
3. У пациентов с удовлетворительной и сниженной памятью имеют место статистически значимые различия в соотношении между объемами серого и белого вещества, причем снижение памяти сопровождается более значительной утратой белого вещества.
4. Изменение коннективности отражает патофизиологические механизмы нарушений ВОП, зависящие преимущественно от утраты белого вещества. Дальнейшие исследования позволят оценить прогностическую значимость выявленного снижения коннективности для ВОП при ДЭ.

## Литература

1. Левин О. С. Дисциркуляторная энцефалопатия: современные представления о механизмах развития и лечении. *Consilium medicum*. 2007; (8): 72–9.
2. Яхно Н. Н., Захаров В. В., Локшина А. Б., Коберская Н. Н., Мхитарян Э. А. Деменции: руководство для врачей. М.: МЕДпресс-информ, 2013; 264 с.
3. Яхно Н. Н. Когнитивные нарушения в неврологической практике. *Неврологический журнал*. 2006; 11 (1): 4–12.
4. Танашян М. М., Медведев Р. Б., Евдокименко А. Н., Гемджян Э. Г., Скрылев С. И., Лагода О. В. и др. Прогнозирование ишемических повреждений головного мозга при реконструктивных операциях на внутренних сонных артериях. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2017; 23 (1): 59–65.
5. Левин О. С., Аникина М. А., Васенина Е. Е. Когнитивные и нейропсихиатрические расстройства при экстрапирамидных заболеваниях. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2012; 4 (2S): 22–30.
6. Захаров В. В., Локшина А. Б. Когнитивные нарушения при дисциркуляторной энцефалопатии. *ПМЖ*. 2009; (20): 1325–31.
7. Bennett IJ, Madden DJ. Disconnected Aging: Cerebral White Matter Integrity and Age-Related Differences in Cognition. *Neuroscience*. 2014; p. 187–205. Published online 2013 Nov 23. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.026.
8. van Kesteren MTR, Fernández G, Norris DG, Hermans EJ. Persistent schema-dependent hippocampal-neocortical connectivity during memory encoding and postencoding rest in humans. *PNAS*. 2010; 107 (16): 7550–5; Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914892107>.
9. Пирадов М. А., Супонев Н. А., Селиверстов Ю. А. и др. Возможности современных методов нейровизуализации в изучении спонтанной активности головного мозга в состоянии покоя. *Неврологический журнал*. 2016; 21 (1): 4–12. DOI: 10.18821/1560-9545-2016-21-1-4-12.
10. Пономарева Н. В., Фокин В. Ф., Потаев Е. И., Иллариошкин С. Н. Влияние генетических факторов на нейрофизиологические механизмы нейродегенеративных заболеваний. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2018; 12 (специальный выпуск): 46–54. DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.6.
11. Andreone BJ, Lacoste B, Gu Ch. Neuronal and vascular interactions. *Annu Rev Neurosci*. 2015; (38): 25–46. DOI: 10.1146/annurev-neuro-071714-033835.
12. de Leeuw FE, de Groot JC, Oudkerk M, Witteman JC, Hofman A, et al. Hypertension and cerebral white matter lesions in a prospective cohort study. *Brain*. 2002; 125 (4): 765–72.
13. Танашян М. М., Максимова М. Ю., Домашенко М. А. Дисциркуляторная энцефалопатия. Путеводитель врачей назначений. *Терапевтический справочник*. 2015; (2): 1–25.
14. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*. 1982; (140): 566–72.
15. Лурья А. Р., Симерницкая Э. Г. О функциональном взаимодействии полушарий головного мозга в организации вербально-мнестических функций. *Физиология человека*. 1975; 1 (3): 411–7.
16. Фокин В. Ф., Шабалина А. А., Пономарева Н. В., Медведев Р. Б., Лагода О. В., Танашян М. М. Сопряженность показателей энергетического обмена и уровня гормона стресса кортизола с когнитивными характеристиками больных дисциркуляторной энцефалопатией. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2018; 4 (12): 47–51.
17. Kasten M, Bruggemann N, Schmidt A, Klein Ch. Validity of the MoCA and MMSE in the detection of MCI and dementia in Parkinson disease. *Neurology*. 2010; 75 (5): 478–9. DOI:10.1212/WNL.0b013e3181e7948a.
18. Whitfield-Gabrieli S, Nieto-Castanon A. Conn: A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks. *Brain Connect*. 2012; 2 (3): 125–41. DOI: 10.1089/brain.2012.0073.
19. Eichenbaum H, Lipton PA. Towards a Functional Organization of the Medial Temporal Lobe Memory System: Role of the Parahippocampal and Medial Entorhinal Cortical Areas. *Hippocampus*. 2008; (1) 8: 1314–24.
20. Desmond JE, Fiez JA. Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning and memory. *Trends in Cognitive Sciences*. 1998; 2 (9): 355–61.
21. Larsell O, Jansen J. The human cerebellum, cerebellar connections, and cerebellar cortex. University of Minnesota Press, 1972; 201 p.
22. Habas Ch, Kamdar N, Nguyen D, Prater R, Beckmann ChF, et al. Distinct cerebellar contributions to intrinsic connectivity networks. *The Journal of Neuroscience*. 2009; 29 (26): 8586–94.
23. Schmahmann JD, The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters*. 2018; Available from: <https://DOI.org/10.1016/j.neulet.2018.07.005>.
24. Beason-Held LL, Hohman TJ, Venkatraman VAJ, Resnick SM. Brain Network Changes and Memory Decline in Aging. *Brain Imaging Behav*. 2017; 11 (3): 859–73. DOI: 10.1007/s11682-016-9560-3.
25. Krogsrud SK, Fjell AM, Tamnes ChK. Development of white matter microstructure in relation to verbal and visuospatial working memory — A longitudinal study. *PLoS One*. 2018; 13 (4): e0195540. Published online 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195540.
26. Caverzasi E, Mandelli ML, DeArmond SJ, et al. White matter involvement in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*. 2014; 137 (12): 3339–54. Published online 2014 Nov 3. DOI: 10.1093/brain/awu298.
27. Caballero MAA, Suárez-Calvet M, Duering M. White matter diffusion alterations precede symptom onset in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*. 2018; 141 (10): 3065–80. Published online 2018. DOI: 10.1093/brain/awy229.
28. Chetouani A, Chawki MB, Hossu G. Cross-sectional variations of white and grey matter in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Neuroimage Clin*. 2018; (17): 804–10. Published online 2017. DOI:10.1016/j.nicl.2017.12.024.
29. Левин О. С. Патология белого вещества при дисциркуляторной энцефалопатии: диагностические и терапевтические аспекты. *Трудный пациент*. 2011; (12): 16–24.

## References

1. Levin OS. Discirkuljatornaja jencefalopatija: sovremennye predstavlenija o mehanizmah razvitija i lechenii. *Consilium medicum*. 2007; (8): 72–9.
2. Yahno NN, Zaharov VV, Lokshina AB, Koberskaya NN, Mhitaryan EA. Demencii: rukovodstvo dlja vrachej. M.: MEDpress-inform, 2013; 264 s.
3. Jahno NN. Kognitivnye narushenija v nevrologicheskoy praktike. *Nevrologicheskij zhurnal*. 2006; 11 (1): 4–12.
4. Tanashyan MM, Medvedev RB, Evdokimenko AN, Gemdzhyan EG, Skrylev SI, Lagoda OV, i dr. Prognozirovanie ishemicheskikh povrezhdenij golovnog mozga pri rekonstruktivnyh operacijah na vnutrennih sonnyh arterijah. *Angiologija i sosudistaja hirurgija*. 2017; 23 (1): 59–65.
5. Levin OS, Anikina MA, Vasenina EE. Kognitivnye i nejropsihiatricheskie rasstrojstva pri jekstrapiramidnyh zabolevanijah. *Nevrologija, nejropsihiatrija, psihosomatika*. 2012; 4 (2S): 22–30.
6. Zaharov VV, Lokshina AB. Kognitivnye narushenija pri discirkuljatornoj jencefalopatii. *RMZh*. 2009; (20): 1325–31.
7. Bennett IJ, Madden DJ. Disconnected Aging: Cerebral White Matter Integrity and Age-Related Differences in Cognition. *Neuroscience*. 2014; r. 187–205. Published online 2013 Nov 23. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.026.
8. van Kesteren MTR, Fernández G, Norris DG, Hermans EJ.

- Persistent schema-dependent hippocampal-neocortical connectivity during memory encoding and postencoding rest in humans. *PNAS*. 2010; 107 (16): 7550–5; Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914892107>.
9. Piradov MA, Suponeva NA, Seliverstov YuA, i dr. Vozmozhnosti sovremennykh metodov nejrovizualizatsii v izuchenii spontannoj aktivnosti golovnogo mozga v sostojanii pokoja. *Nevrologicheskij zhurnal*. 2016; 21 (1): 4–12. DOI: 10.18821/1560-9545-2016-21-1-4-12.
  10. Ponomareva NV, Fokin VF, Rogaev EI, Illarionovskij SN. Vlijanie geneticheskikh faktorov na nejrofiziologicheskie mehanizmy nejrodegenerativnykh zabolevanij. *Annaly klinicheskoy i jeksperimental'noj nevrologii*. 2018; 12 (special'nyj vypusk): 46–54. DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.6.
  11. Andreone BJ, Lacoste B, Gu Ch. Neuronal and vascular interactions. *Annu Rev Neurosci*. 2015; (38): 25–46. DOI: 10.1146/annurev-neuro-071714-033835.
  12. de Leeuw FE, de Groot JC, Oudkerk M, Witteman JC, Hofman A, et al. Hypertension and cerebral white matter lesions in a prospective cohort study. *Brain*. 2002; 125 (4): 765–72.
  13. Tanashjan MM, Maksimova MYu, Domashenko MA. Discirkuljatornaja jencefalopatiya. Putevoditel' vrachebnykh naznachenij. *Terapevticheskij spravocnik*. 2015; (2): 1–25.
  14. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*. 1982; (140): 566–72.
  15. Luriya AR, Simernickaya YeG. O funkcional'nom vzaimodejstvii polusharij golovnogo mozga v organizatsii verbal'no-mnesticheskikh funkcij. *Fiziologija cheloveka*. 1975; 1 (3): 411–7.
  16. Fokin VF, Shabalina AA, Ponomareva NV, Medvedev RB, Lagoda OV, Tanashyan MM. Sopryazhennost' pokazatelej jenergeticheskogo obmena i urovnja gormona stressa kortizola s kognitivnymi harakteristikami bol'nykh discirkuljatornoj jencefalopatiej. *Annaly klinicheskoy i jeksperimental'noj nevrologii*. 2018; 4 (12): 47–51.
  17. Kasten M, Bruggemann N, Schmidt A, Klein Ch. Validity of the MoCA and MMSE in the detection of MCI and dementia in Parkinson disease. *Neurology*. 2010; 75 (5): 478–9. DOI:10.1212/WNL.0b013e3181e7948a.
  18. Whitfield-Gabrieli S, Nieto-Castanon A. Conn: A Functional Connectivity Toolbox for Correlated and Anticorrelated Brain Networks. *BrainConnect*. 2012; 2 (3): 125–41. DOI: 10.1089/brain.2012.0073.
  19. Eichenbaum H, Lipton PA. Towards a Functional Organization of the Medial Temporal Lobe Memory System: Role of the Parahippocampal and Medial Entorhinal Cortical Areas. *Hippocampus*. 2008; (1) 8: 1314–24.
  20. Desmond JE, Fiez JA. Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning and memory. *Trend in Cognivity Sciences* 1998; 2 (9): 355–61.
  21. Larsell O, Jansen J. The human cerebellum, cerebellar connections, and cerebellar cortex. University of Minnesota Press, 1972; 201 p.
  22. Habas Ch, Kamdar N, Nguyen D, Prater R, Beckmann ChF, et al. Distinct cerebellar contributions to intrinsic connectivity networks. *The Journal of Neuroscience*. 2009; 29 (26): 8586–94.
  23. Schmahmann JD, The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters*. 2018; Available from: <https://DOI.org/10.1016/j.neulet.2018.07.005>.
  24. Beason-Held LL, Hohman TJ, Venkatraman VAJ, Resnick SM. Brain Network Changes and Memory Decline in Aging. *Brain Imaging Behav*. 2017; 11 (3): 859–73. DOI: 10.1007/s11682-016-9560-3.
  25. Kogersrud SK, Fjell AM, Tamnes ChK. Development of white matter microstructure in relation to verbal and visuospatial working memory — A longitudinal study. *PLoS One*. 2018; 13 (4): e0195540. Published online 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195540.
  26. Caverzasi E, Mandelli ML, DeArmond SJ, et al. White matter involvement in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*. 2014; 137 (12): 3339–54. Published online 2014 Nov 3. DOI: 10.1093/brain/awu298.
  27. Caballero MAA, Suárez-Calvet M, Duering M. White matter diffusion alterations precede symptom onset in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*. 2018; 141 (10): 3065–80. Published online 2018. DOI: 10.1093/brain/awy229.
  28. Chetouani A, Chawki MB, Hossu G. Cross-sectional variations of white and grey matter in older hypertensive patients with subjective memory complaints. *Neuroimage Clin*. 2018; (17): 804–10. Published online 2017. DOI:10.1016/j.nicl.2017.12.024.
  29. Levin OS. Patologija belogo veshhestva pri discirkuljatornoj jencefalopatii: diagnosticheskie i terapevticheskie aspekty. *Trudnyj pacient*. 2011; (12): 16–24.



## ПАРАКВАТНАЯ МОДЕЛЬ ПАРКИНСОНИЗМА И ВЫЯВЛЕНИЕ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО $\alpha$ -СИНУКЛЕИНА В ЭНТЕРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ У КРЫС

А. В. Ставровская <sup>✉</sup>, Д. Н. Воронков, К. А. Кутукова, М. В. Иванов, А. С. Гущина, С. Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание с широким спектром моторных и немоторных нарушений. Немоторные симптомы (в частности, нарушения функций желудочно-кишечного тракта) обычно опережают манифестацию нарушений моторики на 5–15 лет. Характерный признак БП, цитоплазматические агрегаты фосфорилированного белка  $\alpha$ -синуклеина, обнаруживают не только в церебральных нейронах, но и в интрамуральных вегетативных сплетениях кишечника. В связи с этим большое значение имеет оценка периферического звена молекулярного патогенеза БП на экспериментальных моделях, в том числе при воздействии специфических «паркинсонических» нейротоксинов, таких как гербицид паракват. Целью работы было выявить комплекс ранних патологических изменений, вовлекающих  $\alpha$ -синуклеин, при системном многократном введении крысам параквата в дозе 6 мг/кг. У экспериментальных животных было показано снижение двигательной активности в открытом поле, двукратное ( $p = 0,044$ ) одностороннее увеличение числа случаев соскальзывания в тесте «сужающаяся дорожка», снижение интенсивности окрашивания на тирозингидроксилазу (ТирГд) структур черной субстанции среднего мозга и нервных волокон миентерального сплетения кишечника крысы на 50% ( $p = 0,033$ ) и на 20% ( $p = 0,01$ ) соответственно, а также увеличение содержания фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в телах миентеральных нейронов и в ТирГд-позитивных волокнах. Полученные изменения, свидетельствующие о развитии периферической  $\alpha$ -синуклеинопатии на ранней стадии экспериментального паркинсонизма, сходны с таковыми у пациентов в дебюте БП. Предложенный режим введения параквата может быть чрезвычайно перспективным в моделировании БП.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, моделирование на животных,  $\alpha$ -синуклеин, паракват, поведение, тирозингидроксилаза

**Финансирование:** работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00320.

**Благодарности:** авторы благодарят сотрудников лаборатории экспериментальной патологии нервной системы А. С. Ольшанского и Н. Г. Ямщикову за вклад в работу.

**Информация о вкладе авторов:** А. В. Ставровская — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, введение препаратов, проведение поведенческих тестов, подготовка черновика рукописи; Д. Н. Воронков — анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка и проведение морфохимического исследования образцов мозга экспериментальных крыс, подготовка черновика рукописи; К. А. Кутукова — анализ литературы, анализ данных, подготовка и проведение морфохимического исследования образцов тонкого кишечника экспериментальных крыс, подготовка черновика рукописи; М. В. Иванов — подготовка и проведение морфохимического исследования образцов тонкого кишечника экспериментальных крыс; А. С. Гущина — сбор данных, введение препаратов, проведение поведенческих тестов, ветеринарное сопровождение исследования; С. Н. Иллариошкин — общее руководство исследованием, подготовка черновика рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** содержание животных и проведение экспериментов с ними осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals»; исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 2–5/19 от 20 февраля 2019 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алла Вадимовна Ставровская  
пер. Обуха, д. 5, г. Москва, 103064; alla\_stav@mail.ru

**Статья получена:** 12.08.2019 **Статья принята к печати:** 26.08.2019 **Опубликована онлайн:** 13.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.058

## PARAQUAT-INDUCED MODEL OF PARKINSON'S DISEASE AND DETECTION OF PHOSPHORYLATED $\alpha$ -SYNUCLEIN IN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM OF RATS

Stavrovskaya AV <sup>✉</sup>, Voronkov DN, Kutukova KA, Ivanov MV, Gushchina AS, Illarioshkin SN

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder with a variety of motor and non-motor features. Non-motor symptoms, such as gastrointestinal dysfunction, usually set in 5 to 15 years earlier than motor manifestations. Cytoplasmic aggregates of phosphorylated  $\alpha$ -synuclein are a typical marker of PD. They are observed not only in cerebral neurons but also in intramural plexuses of the intestine. Therefore, it is essential to investigate the peripheral component of the molecular pathogenesis of the disease using PD models, including those involving the use of parkinsonian neurotoxins, such as the well-known herbicide paraquat. The aim of this study was to identify a complex of early  $\alpha$ -synuclein-related changes induced by long-term systemic administration of paraquat to rats at doses of 6 mg/kg. The open-field test revealed a decline in the motor activity of the experimental animals; the tapered beam walking test demonstrated a two-fold increase ( $p = 0.044$ ) in the number of left paw slips. Besides, the intensity of staining for tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra and myenteric plexus fibers was 50% ( $p = 0.033$ ) and 20% ( $p = 0.01$ ) lower, respectively, in the main group than in the controls. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein content was increased in the cell bodies of myenteric neurons and in TH-positive nervous fibers of the experimental animals. Changes indicating the development of peripheral  $\alpha$ -synuclein pathology in the early stage of induced PD are similar to the changes observed in patients with PD at the onset of the disease. The proposed paraquat regimen could be very promising for PD modeling.

**Keywords:** Parkinson's disease, animal models,  $\alpha$ -synuclein, paraquat, behavior, tyrosine hydroxylase

**Funding:** this work supported by the Russian Science Foundation (Grant 19-15-00320).

**Acknowledgement:** the authors thank their colleagues, Olshansky AS and Yamshchikova NG (the Laboratory of Experimental Pathology of the Nervous System), for their valuable contribution.

**Author contribution:** Stavrovskaya AV planned the study, analyzed the literature, collected, analyzed and interpreted the obtained data, conducted behavioral tests, administered drugs to the animals, and prepared the draft of the manuscript; Voronkov DN analyzed the literature, analyzed and interpreted the obtained data, prepared brain slides, conducted the histopathologic examination, and prepared the draft of the manuscript; Kutukova KA analyzed the literature, analyzed the obtained data, prepared jejunum slides, carried out the histopathologic examination, and prepared the draft of the manuscript; Ivanov MV prepared jejunum slides and carried out the histopathologic examination; Gushchina AS collected data, administered drugs to the rats, carried out behavioral tests, and monitored the animals' health as a vet; Illarioshkin SN supervised the study and prepared the draft of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the animals were treated and the experiments were conducted in full compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; the study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (Protocol № 2–5/19 dated February 20, 2019).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alla V. Stavrovskaya  
per. Obukha, 5, Moscow, 103064; alla\_stav@mail.ru

**Received:** 12.08.2019 **Accepted:** 26.08.2019 **Published online:** 13.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.058



Болезнь Паркинсона (БП) относится к числу наиболее распространенных неврологических расстройств, особенно у лиц старше 60 лет. Общее число пациентов с БП в мире составляет не менее 4 млн и, согласно прогнозам, может удвоиться к 2040 г. по мере увеличения доли пожилых людей в обществе [1]. Патогенетическое лечение БП не разработано, поэтому особое значение имеет изучение молекулярных механизмов заболевания, в том числе на модельных животных.

Характерные моторные симптомы БП (брадикинезия, мышечная ригидность, тремор покоя) обусловлены поражением дофамин-продуцирующих нейронов черной субстанции среднего мозга, дегенерацией nigrostriatного дофаминергического пути и развивающимся нейротрансмиттерным дисбалансом в центральной нервной системе (ЦНС) [2]. У больных БП наблюдается также целый ряд немоторных клинических проявлений, самый частый из которых, дисфункция желудочно-кишечного тракта (констипация и др.), развивается задолго до манифестации первых моторных симптомов заболевания [3]. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта при БП связывают с вовлечением в патологический процесс периферических отделов вегетативной нервной системы, однако до настоящего времени соответствующие пусковые механизмы и закономерности взаимодействия «периферического» и «центрального» звеньев патогенеза БП остаются не вполне ясными.

Основным молекулярным событием, приводящим к повреждению нейронов ЦНС при БП, считают нарушение конформации небольшого синаптического белка  $\alpha$ -синуклеина [4]. Именно агрегаты фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в цитоплазме нейронов являются основным биохимическим субстратом телец Леви — классических патоморфологических маркеров БП [2]. Интересно, что патологическую агрегацию  $\alpha$ -синуклеина обнаруживают не только в церебральных нейронах, но и в биопсийном и аутопсийном материалах интрамуральных вегетативных сплетений кишечника больных БП, в связи с чем выдвинуто предположение об энтеральных сплетениях как о первичном сайте патологического процесса, распространяющегося далее на структуры ЦНС через волокна блуждающего нерва [5]. Существуют данные о том, что триггерную роль в  $\alpha$ -синуклеиновом каскаде могут играть некоторые нейротоксины окружающей среды, такие как тяжелые металлы, пестициды и фунгициды [6, 7]. Так, образование агрегатов  $\alpha$ -синуклеина и Леви-патологии способен инициировать сильный гербицид неспецифического действия паракват (1,1-диметил-4,4-бипиридин), который широко используют для уничтожения сорняков во фруктовых садах, на пахотных землях сельскохозяйственного использования, плантациях кофе, какао, чая и т. д., а также в качестве высушивающего агента при переработке сельскохозяйственной продукции [6, 8, 9]. Его особенностью является структурное сходство с активным метаболитом известного нейротоксина, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), — токсичным катионом 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП<sup>+</sup>), что позволяет использовать паракват для моделирования БП на животных. Токсичный эффект параквата связан с образованием супероксидных радикалов, но при этом он обладает низкой аффинностью к комплексу I дыхательной цепи митохондрий.

При моделировании БП обычно используют длительное системное введение параквата в дозе 10 мг/кг, что приводит к выраженным нарушениям движения

экспериментальных животных и вызывает значительные дегенеративные изменения дофаминергических нейронов черной субстанции [10]. Однако такой подход не пригоден для изучения начальных стадий патологического процесса и оценки премоторных симптомов заболевания. Целью работы было выявить у крыс комплекс наиболее ранних патологических изменений, вовлекающих  $\alpha$ -синуклеин, при введении малой дозы параквата и сопоставить их с симптомами, развивающимися у таких животных на ранней стадии экспериментального паркинсонизма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на крысах-самцах линии Wistar ( $n = 18$ ) в возрасте 3–3,5 месяца, которых содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом цикле свет/тьма.

Экспериментальные животные были разделены на две группы: группа «паракват» ( $n = 10$ ) и группа «контроль» ( $n = 8$ ). Крысам первой группы вводили паракват в дозе 6 мг/кг, объемом 0,5 мл. Контрольным животным вводили только физиологический раствор в том же объеме. Токсин растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально через день в течение 4 недель. На следующий день после последней инъекции проводили тесты «открытое поле» (ОП) и «сужающаяся дорожка» (СД), которые позволяют оценить нарушения локомоции экспериментальных животных. Исходный уровень двигательной активности был определен у интактных крыс, т. е. до начала введения препаратов. Установка ОП (изготовлена в мастерских ФГБНУ ИЦН) представляла собой квадратный короб, со стороной 75 см и высотой 40 см; площадь пола установки разделена на 25 квадратов. При проведении теста оценивали величину пройденного крысой пути за 3 мин. Установка СД (Open science; Россия) представляла собой 2 планки, наложенные друг на друга, длиной 165 см: ширина нижней планки — от 10 до 5,5 см, ширина верхней планки — от 6 до 1,5 см, высота — 2 см. На узком конце дорожки располагается короб (укрытие), имеющий съемную крышку и отверстие в передней панели, через которое животное может проникнуть внутрь. Вся конструкция приподнята над полом на высоту 70 см. Экспериментальное животное должно пройти по верхней планке от начала дорожки до укрытия. Подсчитывали число оступаний (соскальзываний) с верхней планки на нижнюю при проходе по всей длине установки и общее количество шагов каждой конечностью. Регистрацию поведения экспериментальных животных проводили с помощью системы видеонаблюдения Any-maze (Stoelting Inc., США).

Для морфологического исследования было взято по четыре образца мозга животных из групп «контроль» и «паракват». Мозг извлекали и фиксировали 4%-м раствором формалина. Образцы пропитывали средой O.C.T. (TissueTek; США) и готовили серийные фронтальные срезы толщиной 10 мкм на криостате Tissue-Tek Cryo3 Flex (Sakura Finetek; США). Срезы окрашивали иммунофлуоресцентным методом для выявления тирозингидроксилазы (ТирГд) — маркерного белка дофаминергических волокон и кислого глиофибрилярного белка (GFAP) для оценки нейродегенеративных изменений в nigrostriatной дофаминергической системе. Ядра клеток докрашивали DAPI. Для выявления ТирГд использовали поликлональные кроличьи антитела (1 : 500, Sigma; Германия) и соответствующие вторичные антитела

козы против иммуноглобулинов кролика, меченые флуорохромом CF488 (1 : 500, Sigma; Германия). Для выявления GFAP использовали антитела, меченые флуорохромом Cy3 (Sigma; 1 : 80). С каждого мозга на уровне хвостатого ядра и черной субстанции исследовали 5–10 срезов, взятых на разных уровнях по rostroкаудальной оси. Срезы изучали под флуоресцентным микроскопом Eclipse NiU (Nikon; Япония). Количественную оценку плотности ТирГд-позитивных волокон проводили, выделяя исследуемые области вручную, при увеличении объектива  $\times 40$  в программе ImageJ (Wayne Rasband (NIH); США) и оценивали среднюю интенсивность флуоресценции (с коррекцией на фоновое окрашивание) ткани в стриатуме.

Участки тощей кишки длиной 5–7 см извлекали, разрезали продольно вдоль брыжейки, промывали физиологическим раствором и расправляли на дне чашки Петри, покрытой парафином. Фиксировали в 4%-м растворе формалина на фосфатном буфере в течение 3 ч, затем промывали фосфатным буфером (pH = 7,4) и под бинокулярной лупой Wild M7A (Wild Heerbrugg; Германия) при помощи глазного пинцета удаляли слизистую оболочку и подслизистую основу. Полученные тотальные препараты тонкого кишечника, состоящие из кольцевого и продольного мышечных слоев и располагающегося между ними межмышечного нервного сплетения, использовали для проведения иммунофлуоресцентных реакций. Для выявления нервных волокон в энтеральных сплетениях использовали первичные антитела к  $\beta$ -III-тубулину, ТирГд и  $\alpha$ -синуклеину, фосфорилированному по серину-129 ( $\alpha$ -Syn-p129), в разведении 1 : 250. Для визуализации связывания использовали вторичные антитела (Sigma; Германия), меченые флуорохромом CF488, в разведении 1 : 100. Препараты исследовали и фотографировали под микроскопом Nikon Eclipse NiU (Nikon; Япония) с цифровой камерой Nikon DS-Qi (Nikon; Япония). Морфометрию выполняли с помощью программы NIS Elements (Nikon;

Япония) на фотоизображениях, полученных при увеличении объектива  $\times 10$ , исследуя не менее 30–40 полей зрения на животное. В программе NIS Elements оценивали среднюю интенсивность и яркость флуоресценции (с коррекцией на фоновое окрашивание)  $\beta$ -III-тубулин- и ТирГд-позитивных нервных волокон в межмышечном нервном сплетении.

Анализ полученных данных проводили в программе Statistica 12 (StatSoft; США), используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями по критерию Фишера и тест Манна–Уитни, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего за время эксперимента животным было сделано 12 инъекций параквата. Исходная величина пройденного в ОП пути у интактных крыс составила  $4,96 \pm 0,7$  м. Тестирование поведения на следующий день после последней инъекции показало снижение двигательной активности в ОП у крыс, получавших паракват, однако статистически значимых различий с контролем получено не было (рис. 1).

Тест «СД» выявил нарушения координации у крыс под действием параквата, что выразилось в статистически значимом увеличении числа оступаний левыми конечностями на нижнюю планку дорожки (рис. 2). Число оступаний подсчитывалось в процентах от общего числа шагов соответствующими конечностями.

При исследовании черной субстанции у животных, получавших паракват, выявляли снижение окрашивания на ТирГд и повреждение дофаминергических нейронов, однако наиболее выраженные изменения отмечали в стриатуме. По сравнению с контрольной группой, интенсивность окрашивания стриатума животных на ТирГд статистически значимо снижалась (рис. 3). При этом диффузное снижение плотности выявляемых

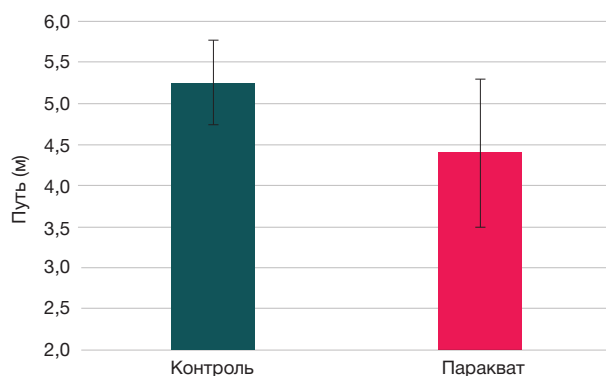


Рис. 1. Длина пробега в открытом поле животных групп «контроль» и «паракват»

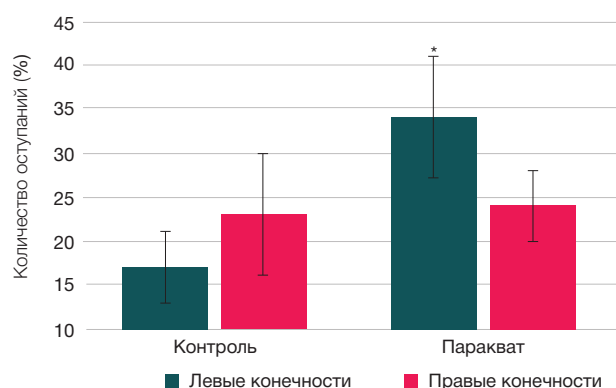


Рис. 2. Количество оступаний (в % от общего количества шагов) животных групп «контроль» и «паракват» в тесте «сужающаяся дорожка» (\* —  $p = 0,0445$ )

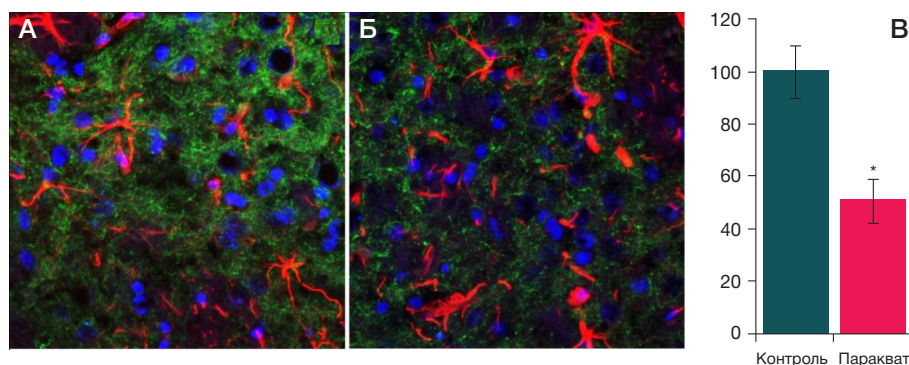
дофаминергических волокон отмечали преимущественно в дорсальных отделах стриатума. Кроме того, выявляли умеренный глиоз — гипертрофию отростков GFAP-позитивных астроцитов.

В миентеральном сплетении тонкого кишечника крыс при введении параквата было выявлено снижение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на  $\beta$ -III-тубулин и ТирГд (рис. 4). Содержание фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -Syn-p129) увеличивалось в телах миентеральных нейронов и в ТирГд-позитивных волокнах (рис. 5).

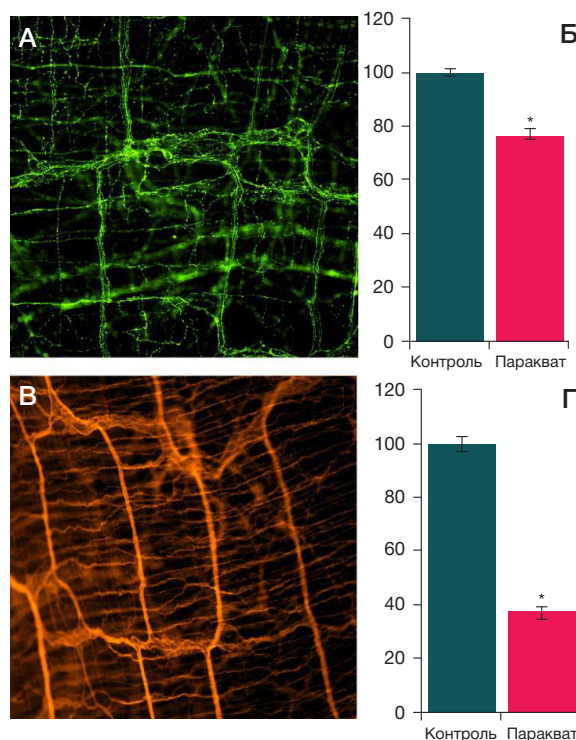
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Паракват — весьма перспективный токсин для моделирования БП за счет ряда особенностей этого соединения, позволяющих использовать индуцированные им модели при проверке различных гипотез патогенеза БП и тестирования новых препаратов [11]. Согласно литературным данным, введение параквата вызывает в

нейронах окислительный стресс, продукцию свободных радикалов *in vitro* и *in vivo*, а также повышение уровней  $\alpha$ -синуклеина и тау-белка с их аккумуляцией [8, 12, 13]. Несмотря на структурное сходство параквата и МФП<sup>+</sup> [14], проникновение в мозг и механизм действия этих нейротоксинов разные. Оба они представляют собой заряженные молекулы, но паракват, в отличие от МФП<sup>+</sup>, проникает в мозг с помощью транспортера нейтральных аминокислот [15, 16]. Данные об эффекте параквата на дофаминергические нейроны довольно противоречивы. В одних работах были показаны нарушения двигательной функции и гибель дофаминергических нейронов после системного введения параквата мышам и крысам [14, 10, 17], другие исследователи при использовании параквата не обнаружили изменений моторики животных, несмотря на дегенерацию нигростриатного пути [18, 14]. При этом, индуцируя агрегацию  $\alpha$ -синуклеина и другие нарушения в дофаминергических нейронах черной субстанции, паракват не оказывает выраженного эффекта на уровень дофамина в стриатуме. Возможно, сохранность уровня

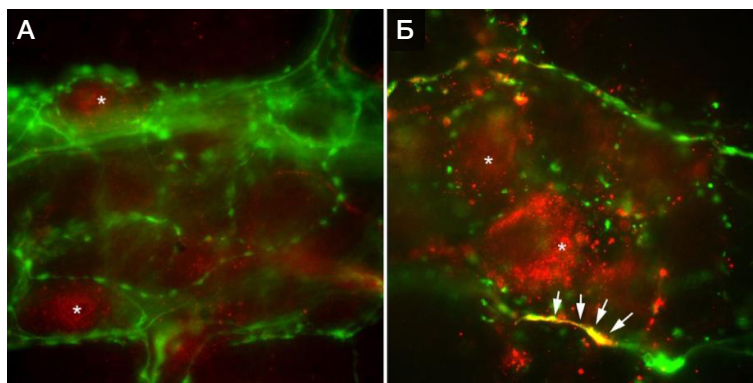


**Рис. 3.** Изменения в стриатуме экспериментальных животных под действием параквата. Снижение плотности ТирГд-позитивных волокон и гипертрофия астроцитов в стриатуме под действием параквата в группе «контроль» (А), в группе «паракват» (Б). Окрашка на ТирГд показана зеленым, GFAP — красным, DAPI — синим. (Иммунофлуоресцентное окрашивание; ув. об.  $\times 40$ ). Б. Изменения интенсивности окрашивания на ТирГд в % от интактного контроля (\* —  $p = 0,033$ ; критерий Манна-Уитни)



**Рис. 4.** Морфология нервных волокон миентерального сплетения кишечника крысы, содержащих ТирГд (А) и  $\beta$ -III-тубулин (Б), и изменения интенсивности окрашивания на ТирГд (Б) и  $\beta$ -III-тубулин (Г) в группе, получавшей паракват (% от контроля; ув. об.  $\times 10$ ; \* —  $p = 0,01$ )





**Рис. 5.** Локализация  $\alpha$ -Syn-p129 (показано красным) и ТирГд (показано зеленым) в ганглиях миентерального сплетения у контрольных (А) и получавших паракват (Б) животных. Синуклеин-позитивные включения в содержащем ТирГд волокне показаны стрелками; тела нейронов — звездочками (\*) (ув. об.  $\times 40$ )

дофамина в этой модели обусловлена компенсаторным повышением активности ТирГд в стриатуме [19].

Для моделирования БП у крыс чаще всего используют введение параквата, растворенного в физиологическом растворе, в дозе 10 мг/кг. Показано, что такой режим введения параквата внутривентриально в течение 3 недель вызывает селективную гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции, снижение двигательной координации, тонуса и сократительной способности мышц [10]. Более высокие дозы параквата (20–25 мг/кг) используют для моделирования тяжелых повреждений внутренних органов, в частности, почек и легочной ткани [20]. Однако наш предшествующий опыт применения параквата в дозе 10 мг/кг для моделирования БП на крысах вышеуказанной линии и возраста оказался негативным, к 5-й инъекции все животные ( $n = 10$ ) погибли, а при патологоанатомическом исследовании погибших животных были обнаружены характерные для действия параквата изменения в легочной и почечной тканях и тканях других висцеральных органов [20]. Использование в настоящей работе дозы параквата 6 мг/кг позволило избежать гибели животных и в то же время воспроизвести поведенческие и морфохимические нарушения, имитирующие симптомы начальной стадии БП, включая типичную асимметрию двигательных нарушений. Латерализацию двигательных симптомов при БП (гипокинезии, тремора покоя и др.) отмечают уже в дебюте заболевания, и она может становиться менее выраженной по мере его прогрессирования [21]. Моторная асимметрия имеет большую клиническую значимость для дифференциальной диагностики БП и других сходных паркинсонических синдромов. Вместе с тем, асимметрия повреждения нейронов черной субстанции у людей с БП продемонстрирована лишь в немногих работах [22, 21], а моделей, воспроизводящих односторонние двигательные нарушения при системном введении нейротоксинов, практически не описано. Проведенное нами исследование восполняет этот пробел.

В миентеральном сплетении интенсивность окрашивания  $\beta$ -III-тубулин-позитивных нервных волокон под действием параквата снижалась относительно контроля. Хотя нарушение сборки микротрубочек под влиянием параквата [23] было описано ранее, полученные нами данные о снижении окрашивания на  $\beta$ -III-тубулин вступают в противоречие с результатами некоторых других исследователей [6]. По-видимому, выявленные изменения могут отражать не столько снижение абсолютного числа тубулин-позитивных нервных волокон, сколько изменение морфологии сети энтеральной нервной системы, т. е. ее разрежение.

В исследованном материале мы не выявили тел нейронов, содержащих ТирГд; полученные результаты свидетельствуют о том, что ТирГд-позитивные волокна в межмышечном сплетении являются симпатическими афферентами, и это согласуется с данными других авторов [24, 25]. Интенсивность окрашивания на ТирГд под действием параквата также снижалась относительно контроля, что может свидетельствовать о повреждении симпатической иннервации тонкого кишечника. Кроме этого, такое снижение могло быть вызвано не только изменением плотности волокон, но и изменением функционального состояния нейронов.

$\alpha$ -Синуклеин в структурах периферической вегетативной нервной системы был выявлен нами как у экспериментальных, так и у контрольных животных. Известно, что часть  $\alpha$ -синуклеина в нормальных условиях находится в нейронах в фосфорилированной форме [26]. Этот белок локализовался диффузно в some части нейронов миентеральных ганглиев. В то же время у животных, получавших паракват, было обнаружено усиление окрашивания тел нейронов и утолщение ТирГд-позитивных нервных волокон, иммунопозитивных к фосфорилированной форме  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -Syn-p129). Изменения морфологии нервных волокон и накопление  $\alpha$ -Syn-p129 может свидетельствовать об образовании специфических для БП белковых агрегатов под действием параквата. Увеличение экспрессии  $\alpha$ -синуклеина в нейронах черной субстанции под действием параквата, показанное ранее [6], вместе с результатами нашей работы подчеркивает сходство молекулярного патогенеза данной модели паркинсонизма с механизмами развития БП у человека.

Вероятными причинами накопления  $\alpha$ -синуклеина в энтеральной нервной системе при воздействии параквата являются продукция АФК и воспаление [27]. Показано, что воспалительные заболевания кишечника у приматов вызывают накопление фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в нейронах миентеральных ганглиев [28]. Нарушение баланса между фосфорилированным и нефосфорилированным пулами  $\alpha$ -синуклеина сопровождают образование токсических фибрилл белка и формирование его нерастворимых агрегатов [29]. Патологическое накопление  $\alpha$ -синуклеина в волокнах, иннервирующих желудочно-кишечный тракт, и энтеральных ганглиях, характерное для ранних стадий БП, рассматривают как потенциальный биомаркер заболевания [30].

## ВЫВОДЫ

Системное введение параквата в дозе 6 мг/кг вызывало поведенческие и морфохимические изменения, сходные

с таковыми у пациентов на ранней стадии БП, включая ключевое звено патогенеза —  $\alpha$ -синуклеиновую патологию в структурах периферической вегетативной нервной системы. Такой режим введения параквата представляется

чрезвычайно перспективным в моделировании БП и имеет большое значение для лучшего понимания патогенеза заболевания и разработки новых терапевтических стратегий.

## Литература

1. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014; (29): 1583–90.
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; (3): 17013.
3. Chaudhuri K Ray, Titova N, editors. *Nonmotor Parkinson's: The hidden face.* International Review of Neurology. Vol. 133. Academic Press, 2017; 794 p.
4. Иллариошкин С. Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал.* 2015; (4): 4–13.
5. Jellinger KA. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 2011; (310): 107–11.
6. Manning-Bog A, McCormack A, Li J, Uversky V, Fink A, Di Monte D. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2002; (277): 1641–4.
7. Moretto A, Colosio C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2011; (32): 383–91.
8. Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, Tetreault NA, Salcedo J, Masliah E, et al. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: Effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse.* 2007; (61): 991–1001.
9. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem.* 2010; (285): 13621–9.
10. Fahimi MA, Shechab S, Nemmar A, Adem A, Dhanasekaran S, Hasan MY. Daily Subacute Paraquat Exposure Decreases Muscle Function and Substantia Nigra Dopamine Level. *Physiol Res.* 2013; (62): 313–21.
11. Tieu K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011; (1): a009316.
12. Bus JS, Gibson JE. Paraquat: Model for Oxidant-Initiated Toxicity. *Environ Health Perspect.* 1984; (55): 37–46.
13. Wills J, Credle J, Oaks AW, Duka V, Lee JH, Jones J, et al. Paraquat, but Not Maneb, Induces Synucleinopathy and Tauopathy in Striata of Mice through Inhibition of Proteasomal and Autophagic Pathways. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0030745.
14. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002; (10): 119–27.
15. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood — brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 2001; (906): 135–42.
16. McCormack AL, Di Monte DA. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem.* 2003; (85): 82–6.
17. Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Endogenous Dopamine Is Involved in the Herbicide Paraquat-Induced Dopaminergic Cell Death. *Toxicological Sciences.* 2014; 139 (2): 466–78.
18. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: Environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 2000; (873): 225–34.
19. Ossowska K, Wardas J, Smialowska M, Kuter K, Lenda T, Wieronska JM, et al. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: An animal model of pre-clinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci.* 2005; (22): 1294–304.
20. Junboa Z, Yongtaob Y, Hongboa Li, Fenshuanga Z, Ruyuna L, Chun'aia Y. Experimental study of sucralose intervention for paraquat poisoning in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2017; (53): 57–63.
21. Riederer P, Jellinger KA, Kolber P, Hipp G, Sian-Hulsmann J, Kruger R. Lateralisation in Parkinson disease. *Cell Tissue Res.* 2018; (373): 297. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2832-z>.
22. Djaldetti R, Ziv I, Melamed E. The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology.* 2006; 5 (9): 796–802. DOI: 10.1016/s1474-4422(06)70549-x
23. Li WD, Zhao YZ, Chou IN. Paraquat-induced cytoskeletal injury in cultured cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987; 91 (1): 96–106.
24. Phillips RJ, Pairitz JC, Powley TL. Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging.* 2007; 28 (7): 1124–37.
25. Phillips RJ, Hudson CN, Powley TL. Sympathetic axonopathies and hyperinnervation in the small intestine smooth muscle of aged Fischer 344 rats. *Auton Neurosci.* 2013; 179 (1–2): 108–121. DOI: 10.1016/j.autneu.2013.09.002.
26. Muntané G, Ferrer I, Martinez-Vicente M.  $\alpha$ -Synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience.* 2012; (200): 106–19. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.042.
27. Toygar M, Aydin I, Agilli M, Aydin FN, Oztosun M, Gul H, et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2015; 34 (2): 198–204. DOI: 10.1177/0960327114533808.
28. Resnikoff H, Metzger JM, Lopez M, Bondarenko V, Mejia A, Simmons HA, et al. Colonic inflammation affects myenteric alpha-synuclein in nonhuman primates. *J Inflamm Res.* 2019; (12): 113–26. DOI: 10.2147/JIR.S196552.
29. Zhang J, Li X, Li JD. The Roles of Post-translational Modifications on  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Front Neurosci.* 2019; (13): 381. DOI: 10.3389/fnins.2019.00381.
30. Yan F, Chen Y, Li M, Wang Y, Zhang W, Chen X, et al. Gastrointestinal nervous system  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97 (28): e11337. DOI:10.1097/MD.00000000000011337.

## References

1. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014; (29): 1583–90.
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; (3): 17013.
3. Chaudhuri K Ray, Titova N, editors. *Nonmotor Parkinson's: The hidden face.* International Review of Neurology. Vol. 133. Academic Press, 2017; 794 p.
4. Иллариошкин С. Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал.* 2015; (4): 4–13.
5. Jellinger KA. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 2011; (310): 107–11.
6. Manning-Bog A, McCormack A, Li J, Uversky V, Fink A, Di Monte D. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation



- of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2002; (277): 1641–4.
7. Moretto A, Colosio C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2011; (32): 383–91.
  8. Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, Tetreault NA, Salcedo J, Masliah E, et al. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: Effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse.* 2007; (61): 991–1001.
  9. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem.* 2010; (285): 13621–9.
  10. Fahimi MA, Shechab S, Nemmar A, Adem A, Dhanasekaran S, Hasan MY. Daily Subacute Paraquat Exposure Decreases Muscle Function and Substantia Nigra Dopamine Level *Physiol Res.* 2013; (62): 313–21.
  11. Tieu K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011; (1): a009316.
  12. Bus JS, Gibson JE. Paraquat: Model for Oxidant-Initiated Toxicity. *Environ Health Perspect.* 1984; (55): 37–46.
  13. Wills J, Credle J, Oaks AW, Duka V, Lee JH, Jones J, et al. Paraquat, but Not Maneb, Induces Synucleinopathy and Tauopathy in Striata of Mice through Inhibition of Proteasomal and Autophagic Pathways. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0030745.
  14. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002; 10: 119–27.
  15. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood — brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 2001; (906): 135–42.
  16. McCormack AL, Di Monte DA. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem.* 2003; (85): 82–6.
  17. Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Endogenous Dopamine Is Involved in the Herbicide Paraquat-Induced Dopaminergic Cell Death *Toxicological Sciences.* 2014; 139 (2): 466–78.
  18. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: Environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 2000; (873): 225–34.
  19. Ossowska K, Wardas J, Smialowska M, Kuter K, Lenda T, Wieronska JM, et al. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: An animal model of pre-clinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci.* 2005; (22): 1294–304.
  20. Junboa Z, Yongtaob Y, Hongboa Li, Fenshuanga Z, Ruyuna L, Chun'aia Y. Experimental study of sucralofate intervention for paraquat poisoning in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2017; (53): 57–63.
  21. Riederer P, Jellinger KA, Kolber P, Hipp G, Sian-Hulsmann J, Kruger R. Lateralisation in Parkinson disease. *Cell Tissue Res.* 2018; (373): 297. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2832-z>.
  22. Djaldetti R, Ziv I, Melamed E. The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology.* 2006; 5 (9): 796–802. DOI: 10.1016/s1474-4422(06)70549-x
  23. Li WD, Zhao YZ, Chou IN. Paraquat-induced cytoskeletal injury in cultured cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987; 91 (1): 96–106.
  24. Phillips RJ, Pairitz JC, Powley TL. Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging.* 2007; 28 (7): 1124–37.
  25. Phillips RJ, Hudson CN, Powley TL. Sympathetic axonopathies and hyperinnervation in the small intestine smooth muscle of aged Fischer 344 rats. *Auton Neurosci.* 2013; 179 (1–2): 108–121. DOI: 10.1016/j.autneu.2013.09.002.
  26. Muntané G, Ferrer I, Martinez-Vicente M.  $\alpha$ -Synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience.* 2012; (200): 106–19. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.042.
  27. Toygar M, Aydin I, Agilli M, Aydin FN, Oztosun M, Gul H, et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2015; 34 (2): 198–204. DOI: 10.1177/0960327114533808.
  28. Resnikoff H, Metzger JM, Lopez M, Bondarenko V, Mejia A, Simmons HA, et al. Colonic inflammation affects myenteric alpha-synuclein in nonhuman primates. *J Inflamm Res.* 2019; (12): 113–26. DOI: 10.2147/JIR.S196552.
  29. Zhang J, Li X, Li JD. The Roles of Post-translational Modifications on  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Front Neurosci.* 2019; (13): 381. DOI: 10.3389/fnins.2019.00381.
  30. Yan F, Chen Y, Li M, Wang Y, Zhang W, Chen X, et al. Gastrointestinal nervous system  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97 (28): e11337. DOI:10.1097/MD.00000000000011337.

## СОСТОЯНИЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ПОСЛЕ АНГИОРЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА СОННЫХ АРТЕРИЯХ

М. М. Танащян<sup>1</sup>, Р. Б. Медведев<sup>1✉</sup>, О. В. Лагода<sup>1</sup>, Е. С. Бердникович<sup>1</sup>, С. И. Скрылев<sup>1</sup>, Э. Г. Гемджян<sup>2</sup>, М. В. Кротенкова<sup>1</sup><sup>1</sup> Научный центр неврологии, Москва, Россия<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва, Россия

Атеросклероз сонных артерий является фактором риска ишемического инсульта. Для улучшения мозговой перфузии и предотвращения развития цереброваскулярной патологии и связанных с ней когнитивных нарушений нередко используют хирургическое лечение. Целью данного проспективного поискового исследования было оценить когнитивные функции (КФ) пациентов после операции (открытого или эндоваскулярного вмешательства) на внутренней сонной артерии. В исследование было включено 90 пациентов (средний возраст — 62 года, 71% мужчин) с атеросклеротическим поражением сонных артерий. КФ оценивали в четырех временных точках (до вмешательства, через 3, 6 и 9 месяцев после него) с использованием когнитивных шкал и измерением когнитивных вызванных потенциалов. Состояние вещества головного мозга до и после вмешательства оценивали по результатам диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии (ДВ-МРТ). Через 3 и 6 месяцев после операции у пациентов наблюдали небольшие разнонаправленные изменения КФ (по шкале MMSE), но к концу срока наблюдения (9 месяцев) распределение оценок КФ у пациентов приблизилось к дооперационному ( $p = 0,43$ ). Таким образом, ассоциированные с вмешательством (независимо от его вида) изменения КФ носили преимущественно транзиторный характер. Единичные случаи ухудшения (по данным ДВ-МРТ после операции) КФ были ассоциированы с острыми очагами ишемии (как симптомными, так и бессимптомными) в веществе мозга, а также с периоперационным инсультом (1 случай). К факторам риска неблагоприятного прогноза для КФ можно отнести: пожилой возраст и изменения в церебральных артериях. Для оценки связи КФ с множественными интраоперационными эмболиями сосудов мозга требуется более длительное наблюдение.

**Ключевые слова:** сонная артерия, стеноз, стент, эндартерэктомия, эмболия, когнитивные функции, дисперсионный анализ

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН.

**Информация о вкладе авторов:** М. М. Танащян — разработка дизайна исследования, редактирование рукописи; Р. Б. Медведев — анализ литературы, разработка дизайна исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; О. В. Лагода и Е. С. Бердникович — анализ литературы, разработка дизайна исследования, сбор и интерпретация данных, редактирование рукописи; С. И. Скрылев — проведение ангиохирургических операций, редактирование рукописи; Э. Г. Гемджян — концепция и дизайн исследования, анализ данных, статистический анализ, составление и редактирование рукописи; М. В. Кротенкова — анализ и интерпретация данных изображения, редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 11/14 от 19 ноября 2014 г.). Все пациенты (или их законно уполномоченные представители) подписали добровольное информированное согласие на проведение оперативного лечения; исследование проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 г.

✉ Для корреспонденции: Роман Борисович Медведев  
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; medvedev-roman@yandex.ru

Статья получена: 15.08.2019 Статья принята к печати: 29.08.2019 Опубликована онлайн: 16.09.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.059

## THE STATE OF COGNITIVE FUNCTIONS AFTER ANGIORECONSTRUCTIVE OPERATIONS ON THE CAROTID ARTERIES

Tanashyan MM<sup>1</sup>, Medvedev RB<sup>1✉</sup>, Lagoda OV<sup>1</sup>, Berdnikovich ES<sup>1</sup>, Skrylev SI<sup>1</sup>, Gemdzian EG<sup>2</sup>, Krotchenkova MV<sup>1</sup><sup>1</sup> Research Centre of Neurology, Moscow, Russia<sup>2</sup> National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Carotid artery stenosis is a risk factor for ischemic stroke. Surgical treatment is often used to improve cerebral perfusion and prevent the development of cerebrovascular pathology and related cognitive impairment. The aim of this prospective pilot study was to evaluate the cognitive functions (CF) of patients after surgery (open or endovascular intervention) on the internal carotid artery. The study included 90 patients (mean age 62 years, 71% of men) with atherosclerotic lesions of the carotid arteries. The CF was evaluated at four time points (before the intervention, 3, 6, and 9 months after) using cognitive scales and measuring cognitive evoked potentials. The state of the brain substance before and after the intervention was evaluated by the results of diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DW-MRI). Three and six months after the operation, the patients demonstrated minor and varied CF alterations by the MMSE scale, but by the end of the observation period (9 months) the participants had their CF at the level close to that registered before the operation ( $p = 0.43$ ). Thus, the intervention-associated changes in CF, regardless of the surgical approach, were primarily transient in nature. The rare cases of CF deterioration, as registered by the postoperative DW-MRI scans, were linked to the acute brain ischemia, both symptomatic and asymptomatic, and a perioperative stroke (1 case). Advanced age and altered cerebral arteries may be listed as the risk factors for the probable CF deterioration. Evaluation of the connections between CF alterations and multiple cases of intraoperative cerebral vascular embolism requires a longer observation period.

**Keywords:** carotid artery, stenosis, stent, endarterectomy, emboli, cognitive function, analysis of variance

**Funding:** the study was ordered by the Research Center of Neurology (Federal Research Institution).

**Author contribution:** Tanashyan MM — study design development, manuscript editing; Medvedev RB — literature analysis, study design development, data collection, analysis and interpretation, manuscript authoring; Lagoda OV and Berdnikovich ES — literature analysis, study design development, data collection and interpretation, manuscript editing; Skrylev SI — angiography, manuscript editing; Gemdzian EG — study concept and design, data analysis, statistical analysis, manuscript compilation and editing; Krotchenkova MV — image data analysis and interpretation, manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Research Center of Neurology Ethics Committee (protocol № 11/14 of November 19, 2014). All patients or their legally authorized representatives have signed the informed consent for surgery; the study followed the ethical principles of the Declaration of Helsinki (1975).

✉ Correspondence should be addressed: Roman B. Medvedev  
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; medvedev-roman@yandex.ru

Received: 15.08.2019 Accepted: 29.08.2019 Published online: 16.09.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.059

Лидирующие позиции сосудистых заболеваний головного мозга среди причин общей смертности и стойкой утраты трудоспособности населения делают ситуацию с их профилактикой и лечением чрезвычайно актуальной как в социальном, так и медицинском плане [1]. Изменение демографической ситуации в сторону увеличения продолжительности жизни и рост выявляемости сосудистой патологии и связанных с ней когнитивных расстройств требуют дальнейшего изучения сосудистых заболеваний головного мозга.

Когнитивная дисфункция нарушает социальную адаптацию пациентов, приводя не только к ухудшению качества их жизни, но и к снижению адекватного контроля за течением как основного заболевания, так и коморбидных состояний: артериальной гипертензии, атеросклероза, сахарного диабета.

Важнейшей причиной развития ишемического инсульта служит стенозирующее атеросклеротическое поражение брахиоцефальных артерий (БЦА) и особенно внутренней сонной артерии (ВСА). Высокая доля нарушений мозгового кровообращения, развивающихся по атеротромботическому подтипу в общей структуре ишемических инсультов (более 30%), и значительный процент их возникновения без предшествующих симптомов (80%) подчеркивают необходимость тщательного обследования пациентов с атеросклерозом.

В патогенезе развития когнитивных нарушений (КН) при атеросклерозе в системе ВСА выделяют два основных механизма — эмболию и церебральную гипоперфузию [2]. При этом независимо от наличия или отсутствия признаков поражения белого вещества, выявляемого при магнитно-резонансной томографии головного мозга, стеноз ВСА является независимым маркером КН. Так, в исследовании, включавшем более 4000 пациентов с асимптомными стенозами ВСА, КН были отмечены в группе больных с выраженной степенью стеноза [3]. Имеются данные о прямой корреляционной связи между увеличением наиболее раннего и информативного маркера атеросклероза — толщиной комплекса интима-медиа ВСА и более низким баллом по результатам нейропсихологического тестирования [4].

Современная доктрина оказания медицинской помощи заключается в изменении фокуса от лечения болезней к активной позиции сохранения своего здоровья каждым человеком. И в этом контексте основной мерой профилактических мероприятий по предотвращению развития цереброваскулярной патологии и КН является обеспечение адекватной перфузии головного мозга.

Наряду с антитромботической терапией большую роль в нормализации мозгового кровотока играют хирургические методы лечения: каротидная эндартерэктомия (КЭЭ) и трансклюминальная баллонная ангиопластика со стентированием сонных артерий (КАС) [5–8]. Вместе с несомненным в целом улучшением церебрального кровообращения вследствие коррекции сосудистого русла в настоящее время (с накоплением клинического материала) выявлены и некоторые неблагоприятные моменты. Так, любое оперативное вмешательство (включая ВСА) чревато интраоперационной эмболией и гемодинамической нестабильностью (вплоть до перерыва кровотока) с развитием ишемии мозговой ткани [9]. Согласно данным рандомизированного исследования CREST, частота периоперационного инсульта после КЭЭ и КАС составила 2,3 и 4,1% соответственно [10]. Результаты диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной

томографии (ДВ-МРТ) свидетельствуют о наличии острых очагов ишемии (ООИ) в веществе мозга у 21% пациентов, перенесших открытые вмешательства, и у 50% пациентов, перенесших эндоваскулярные вмешательства [11].

Связь каротидных реваскуляризаций с когнитивными функциями (КФ) остается не до конца ясной из-за наличия многих факторов: 1) гетерогенности пациентов по клиническим проявлениям, локализации и выраженности стеноза, исходного статуса церебральной перфузии, сроков между появлением симптомов и проведением реваскуляризации [12]; 2) используемых видов оценочных нейропсихологических тестов и сроков оценки; 3) вариативности хирургической техники и критериев классификации постоперационных изменений [13]. Целью нашего исследования было выявить и оценить когнитивные изменения у пациентов, подвергшихся операциям по поводу атеросклеротического поражения ВСА.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 90 пациентов (64 мужчин и 26 женщин в возрасте 47–83 лет, средний возраст — 61 год), наблюдавшихся в отделении общей ангионеврологии Научного центра неврологии (Москва). Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоих полов; наличие у пациентов хронических ишемических цереброваскулярных заболеваний (дисциркуляторная энцефалопатия 1–2-й стадии); пациенты, которым в отделении сосудистой и эндоваскулярной хирургии за период с мая 2015 г. по декабрь 2018 г. было выполнено хирургическое лечение ВСА (каротидная эндартерэктомия (КЭЭ) выполнена 27 пациентам, каротидная ангиопластика со стентированием — 63 больным). Критерии исключения: наличие у пациента выраженной сердечной и соматической патологии; тяжелый инсульт; психические нарушения; наличие гемипарезов вследствие нарушения кровообращения в бассейне задней мозговой артерии; наличие исходно выраженных КН (оценка по шкале MMSE < 24 баллов), препятствующих выполнению нейропсихологических тестов.

Диагноз атеросклеротического поражения сонных артерий верифицировали ультразвуковым обследованием на приборе Viamo (Toshiba; Япония) с использованием алгоритма исследования NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) [14].

Всем пациентам проводили оценку когнитивного статуса до хирургического лечения и затем через 3, 6 и 9 месяцев после него. В исследовании применяли следующие методы оценки КФ: краткую шкалу оценки психического статуса MMSE (Mini-Mental State Examination) [15]; тесты по запоминанию 10 слов, оценки лобной дисфункции (БТЛД), рисования часов, повторения цифр по методу Векслера, концептуализации, а также пробу Шульте и динамический праксис [16]. Выбор методов оценки КФ определяли их функциональной сопоставимостью с исследованием когнитивных вызванных потенциалов (КВП).

Исследование КВП на аппарате Нейро-МВП (Нейрософт; Россия), предназначенное для объективизации изменений КФ, выполняли по методике Р300. Нормативные данные по потенциалу Р300 были получены у 25 здоровых людей соответствующего возраста. Амплитуду Р300 измеряли от вершины предыдущего негативного пика до вершины пика Р300.

При рассмотрении метода хирургического лечения эндоваскулярное вмешательство выполняли тем

пациентам, у которых были противопоказания к КЭЭ в соответствии с критериями исследования SAPHIRE (Stenting and Angioplasty With Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy) [17] и предпочтения для КАС в соответствии с критериями исследования CREST [10]. Через 24 ч после открытого хирургического или эндоваскулярного вмешательств проводили неврологическое обследование с оценкой дефицита по шкале инсульта National Institutes of Health (NIH) [18].

Состояние вещества головного мозга до вмешательства и через 24 ч после него оценивали по результатам ДВ-МРТ на магнитно-резонансном томографе Magnetom Symphony (Siemens; Германия) с величиной магнитной индукции 1,5 Тесла. Ввиду преобладания очагов малых размеров оценку поражения вещества головного мозга проводили на диффузионно-взвешенных изображениях (с коэффициентом диффузионного взвешивания  $b$  1000) [19].

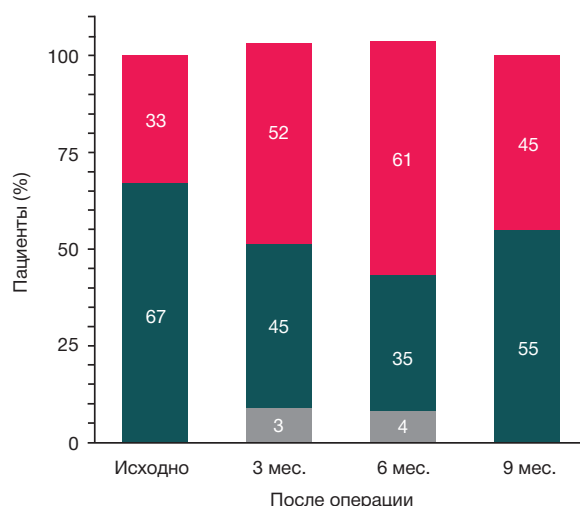
Всем пациентам не менее чем за 5 дней осуществляли коррекцию антитромботической, гиполипидемической, антигипертензивной и антиангинальной терапией. После операции все пациенты получили базовую медикаментозную терапию (антитромботические, антигипертензивные и гиполипидемические средства). Ноотропные препараты не назначали.

Статистический анализ данных проводили с использованием дисперсионного анализа (с повторными измерениями) и анализа таблиц сопряженности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У всех пациентов, включенных в исследование, диагностировали артериальную гипертензию, каждый второй пациент имел два и более факторов риска развития сосудистого заболевания. У 60 (67%) больных в анамнезе были отмечены перенесенные ишемические нарушения мозгового кровообращения. Анализ исходных данных показал, что нормальные показатели по шкале MMSE (28–30 баллов) были у 33% пациентов, легкие КН (25–27 баллов) — у 67% пациентов. По результатам анализа динамики изменения оценок КФ по шкале MMSE через 3, 6 и 9 месяцев после операции, КФ пациентов после операции в целом не ухудшались: к 3 и 6 месяцам были детектированы разнонаправленные изменения КФ (увеличился разброс оценок, появились единичные случаи выраженных изменений КФ), но к 9 месяцам (концу срока наблюдения) эти изменения практически нивелировались и оценки КФ у пациентов приблизились к дооперационным (их различие статистически незначимо;  $p = 0,43$ ) (рис. 1, 2). Таким образом, наблюдавшиеся послеоперационные изменения КФ носили преимущественно транзиторный характер.

При дополнительном нейропсихологическом тестировании у некоторых пациентов исходно были выявлены умеренные нарушения вербального мышления, внимания и кратковременной памяти (табл. 1). Развитие КН



**Рис. 1.** Динамика изменения соотношения долей пациентов (по оси ординат, в %) с различными градациями по шкале MMSE: нет КН (28–30 баллов; верхние поля), легкие КН (25–27 баллов; средние поля) и выраженные КН (< 25 баллов; два нижних поля)

**Таблица 1.** Количественная оценка КФ больных (по результатам скрининговых тестов)\*

| Нейропсихологические тесты | Показатели скрининговых тестов |                |                 |                 |
|----------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                            | До лечения                     | Через 3 месяца | Через 6 месяцев | Через 9 месяцев |
| MMSE                       | 27,1 ± 0,2                     | 28,3 ± 0,1     | 28,2 ± 0,1      | 27,2 ± 0,1      |
| БТЛД                       | 13,1 ± 0,3                     | 17,4 ± 0,1     | 18,1 ± 0,2      | 18,7 ± 0,3      |
| Проба Шульце (с)           | 57,3 ± 8,5                     | 53,4 ± 13,1    | 47,7 ± 9,6      | 46,2 ± 10,3     |
| Повторение цифр (прямое)   | 5,1 ± 1,1                      | 5,9 ± 1,1      | 6,1 ± 1,1       | 6,5 ± 1,2       |
| Повторение цифр (обратное) | 2,5 ± 1,1                      | 3,7 ± 1,0      | 3,8 ± 1,1       | 3,8 ± 1,1       |
| Динамический праксис       | 1,6 ± 0,6                      | 2,1 ± 0,7      | 2,2 ± 0,8       | 2,3 ± 0,6       |
| Тест рисования часов       | 4,6 ± 2,2                      | 5,7 ± 0,2      | 5,9 ± 1,1       | 5,8 ± 1,0       |
| Концептуализация           | 2,3 ± 0,7                      | 2,3 ± 0,1      | 2,2 ± 0,4       | 2,3 ± 0,3       |

**Примечание:** \* — результаты тестов представлены в виде средних значений со стандартными ошибками средних (гистограммы результатов тестов близки к нормальному распределению).

ассоциировалось с выраженностью атеросклеротического поражения БЦА, пожилым возрастом, наличием артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, сахарного диабета, перенесенным ранее нарушением мозгового кровообращения.

Детальное обследование этих пациентов после оперативного вмешательства выявило, что у одного пациента после КЭЭ развился периперационный инсульт по типу артерио-артериальной эмболии в бассейне средней мозговой артерии на стороне вмешательства (неврологический дефицит по шкале инсульта NIH достигал 6 баллов), проявившийся в двигательных нарушениях. При дальнейшем наблюдении пациента с периперационным инсультом и использовании теста вербального мышления и беглости речи было выявлено ухудшение семантической памяти, сохранявшееся на всем протяжении исследования.

Основными нейродинамическими процессами, претерпевшими у пациентов позитивные изменения, были внимание, беглость речи, оперативная и кратковременная память (рис. 3).

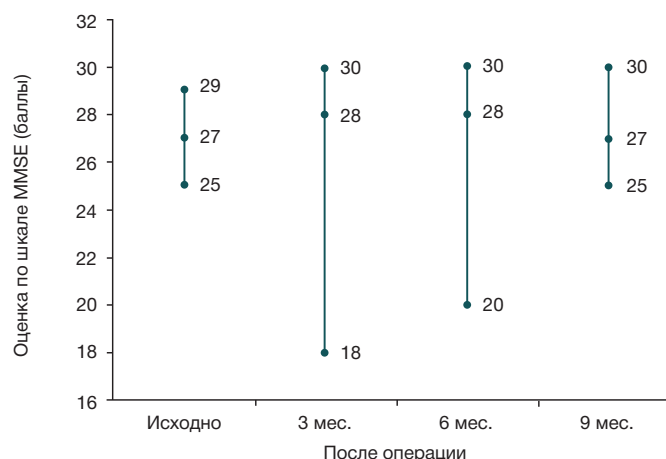
Связи вида оперативного вмешательства и оценок КФ у обследованных пациентов не выявлено. Более выраженные КН в течение всего периода наблюдения выявлены у некоторых пациентов старше 60 лет. У большинства пациентов моложе 60 лет (86%) наблюдали положительные изменения КФ (по шкале MMSE) к 6 месяцу наблюдения, а также увеличивалась доля

больных с нормальными показателями при оценке внимания и кратковременной памяти через 9 месяцев (что подтверждали соответствующие изменения амплитуды пика P300;  $p = 0,05$ ). Влияния ранее перенесенных ишемических инсультов на послеоперационные изменения КФ не обнаружено.

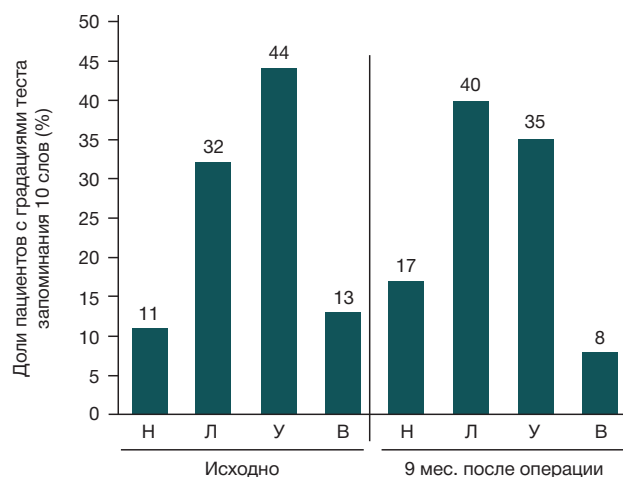
При анализе результатов ДВ-МРТ в ближайшем периперационном периоде выявлено, что бессимптомные ООИ эмболического генеза визуализировались у 30 (33%) больных. Выявленные изменения в веществе головного мозга в большинстве случаев были локализованы в корковом веществе (16 (53%)) на стороне вмешательства (22 (73%)) и имели размеры до 5 мм. Проведение отдельного анализа данных ДВ-МРТ и КВП показало, что наличие положительной динамики по данным КВП к 3 и 6 месяцам после операции (у пациентов без ООИ) и отсутствие значимой динамики у пациентов с наличием ООИ позволяют рассматривать ООИ как фактор, препятствующий восстановлению КФ после операции (рис. 4).

Небольшая положительная динамика КФ у пациентов без выявленных ООИ в веществе мозга отмечена (через 3, 6 и 9 месяцев) также и при нейропсихологическом тестировании.

Независимых и значимых предикторов, ассоциированных с состоянием пациента через 9 месяцев после оперативного вмешательства, выявлено не было.



**Рис. 2.** Динамика изменения оценок КФ (до и в разные сроки после операции) по шкале MMSE: представлены средние величины (с минимальными и максимальными значениями)



**Рис. 3.** Сравнение распределений оценок оперативной памяти у пациентов по тесту запоминания 10 слов до операции (исходно) и после операции (к концу срока наблюдения); градации теста: Н — норма (10 слов); Л — легкие нарушения (8–9); У — умеренные (6–7) и В — выраженные (< 6). К концу срока наблюдения (9 месяцев) у пациентов в целом наблюдали улучшение оперативной памяти



Особую значимость приобретают в контексте изучения КФ данные нейрофизиологического исследования когнитивных вызванных потенциалов Р300. Так, при исходном тестировании 90 пациентов у 22 больных (25%) характеристики не были изменены, в то время как у 68 больных (75%) были выявлены следующие отклонения: у 24 отсутствовал пик Р300, у 25 увеличена латентность пика Р300 и у 19 снижена амплитуда. Отметим, что по характеристикам Р300 (приводим средние значения со стандартными отклонениями) у пациентов с артериальной гипертензией и без нее статистически значимых различий не было:  $366,4 \pm 29,6$  против  $360,9 \pm 51,1$  мс (латентность) и  $5,4 \pm 2,6$  против  $5,4 \pm 3,2$  мкВ (амплитуда). По характеристикам Р300 не обнаружено межполушарной асимметрии, а также корреляции количества пораженных экстракраниальных артерий (от одной до четырех).

В послеоперационном периоде средние значения латентности и амплитуды Р300 не отличались от исходных значений. В отдаленном периоде (9 месяцев) у 61% (55) оперированных больных зарегистрированы уменьшение латентности пика потенциала Р300 и некоторое возрастание амплитуды ответа. Средние значения (со стандартными отклонениями) латентности потенциала Р300 до операции —  $364,5 \pm 37,5$  мс, амплитуды ответа —  $5,4 \pm 2,7$  мкВ, после операции —  $349,5 \pm 42,7$  мс и  $6,4 \pm 3,3$  мкВ соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система внутренней сонной артерии обеспечивает около 2/3 кровоснабжения одноименного полушария головного мозга. Атеросклеротическое поражение экстракраниальных артерий существенным образом дискредитирует мозговой кровоток. Гемодинамическое влияние стеноза ВСА на мозговое кровообращение может приводить к развитию инсульта с явным неврологическим дефицитом или диффузному поражению вещества головного мозга, проявляющемуся негрубой рассеянной неврологической симптоматикой. Изменения КФ после операций исследователей начали интересовать давно. В одном из ранних исследований КФ, касавшемся психопатологических

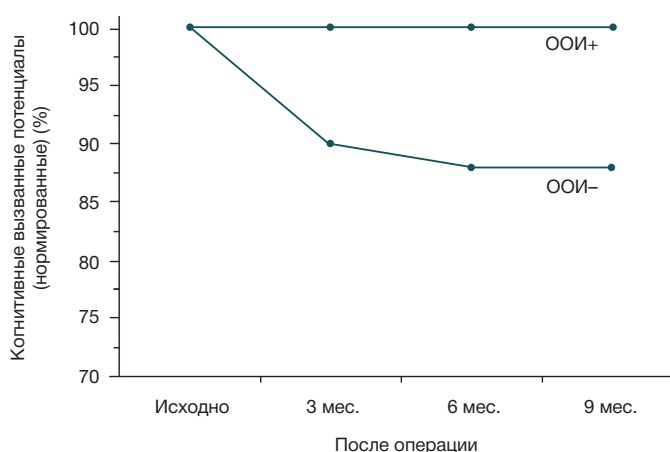
расстройств после кардиальной операции, были отмечены нарушение способности к концентрации внимания, нарушение отсроченной и быстрой памяти, замедленность психомоторных процессов, а факторами риска развития послеоперационных когнитивных осложнений авторы называли старший возраст и гипертонию [20].

С середины 1990-х гг. появились публикации, посвященные изучению КН после операций на сонных артериях. Степень интраоперационной ишемии оценивали путем мониторингирования соматосенсорных корковых вызванных потенциалов во время операции. Измененные нейропсихологические показатели в зависимости от степени интраоперационной ишемии были выявлены у пациентов с перенесенным инсультом и с более выраженной степенью поражения артерий [21].

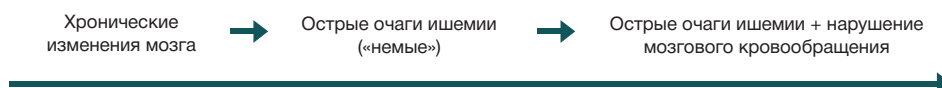
В последующих работах исследовали взаимосвязь между степенью каротидного стеноза и КН у больных без клинических признаков деменции. Показано, что когнитивные функции ухудшаются у недементных больных с высокой степенью стеноза и не меняются при малых степенях. Выявленные мягкие КН по психометрическим тестам коррелировали с изменением латентности потенциала Р300. Измененные потенциалы Р300, связанные с легкими КН, были обнаружены у больных со стенозами ВСА (как асимптомных, так и с наличием очаговой симптоматики) [22]. КВП в отличие от психометрических тестов не зависят от мотивации больного.

Учитывая, что результаты некоторых исследований свидетельствуют о значительном улучшении КФ после каротидных вмешательств [23], а в других представлены доказательства их ухудшения [24, 25], вопрос выявления факторов, способствующих изменению когнитивных способностей в результате операции, остается открытым.

В проведенном нами исследовании КФ у пациентов после операций на ВСА выявлено, что в первые 3 месяца разброс оценок КФ (по шкале MMSE) был максимальный, и, возможно, обусловлен влиянием психоэмоционального состояния пациентов в связи с оперативным вмешательством [26]. Основными нейродинамическими процессами, которые претерпевали изменения, были внимание, беглость речи, оперативная и



**Рис. 4.** Динамика изменения КВП в группе пациентов с интраоперационными острыми очагами ишемии (ООИ+) и без них (ООИ-): за период наблюдения уровень КВП в группе ООИ+ ( $n = 30$ ) не изменился, а в группе ООИ- ( $n = 60$ ) снизился на 15% ( $p = 0,05$ ). Приведены нормированные (деленные на исходные уровни) средние значения КВП (в %)



**Рис. 5.** Возможные изменения вещества мозга с вектором ухудшения КФ после операции

кратковременная память. Через 9 месяцев КФ в среднем вернулись к исходному (дооперационному) уровню. Выскажем предположение, что в отдаленные сроки после операции влияние на КФ оказывают исходный статус КФ и адекватность мероприятий в рамках вторичной профилактики сосудистых заболеваний. Кроме этого, вероятными причинами постепенного регресса КН после операции являются восстановление перфузии и улучшение метаболизма головного мозга [27, 28].

Результаты нашей работы об отсутствии связи КФ и вида (КЭЭ и КАС) оперативного лечения согласуются с другими исследованиями [29, 30].

Мы выявили (по данным к 6 месяцам наблюдения) связь возраста пациентов (моложе 60 лет) с позитивной динамикой КФ (по шкале MMSE), а также увеличение числа пациентов с нормальными показателями кратковременной памяти и внимания (к 9 месяцам наблюдения), что согласуется с существующими литературными данными [31, 32].

Особенностью нашей работы было сопоставление изменений в веществе головного мозга (по данным ДВ-МРТ) со статусом КФ в различные послеоперационные периоды. Так, в 33% случаев в ближайшее время после вмешательства были выявлены те или иные ООИ. Вместе с тем, лишь в одном случае нашего наблюдения у пациента развился острый ишемический инсульт с гемипарезом на контрлатеральной стороне, а остальные ООИ были клинически асимптомными.

Корреляцию острых ишемических поражений (по данным ДВ-МРТ) и параметров нейропсихологического исхода проводили в ограниченном числе работ [33, 34],

в связи с чем сохраняется недостаточность данных по оценке прогностического влияния выявленных поражений на когнитивный статус.

Проведенное нами клиническое нейровизуализационное, нейропсихологическое и нейрофизиологическое исследование позволило сформулировать единую составляющую КФ и установить, что наличие ООИ ухудшает когнитивный прогноз. Динамика этой единой сочетанной меры измерения КФ в остальные сроки наблюдения зависит от их клинического проявления. В связи с этим можно предложить вероятный прогноз ухудшения КФ после операции по поводу атеросклеротического стеноза сонной артерии (рис. 5).

Ограничением исследования является сравнительно короткий срок наблюдения (9 месяцев). Продолжение исследования позволит верифицировать полученные результаты.

## ВЫВОДЫ

1. Одним из важнейших симптомов хронических цереброваскулярных заболеваний у большинства пациентов с атеросклеротической патологией сонных артерий является когнитивная дисфункция, требующая при планировании ангиореconstructивных операций обязательного нейропсихологического, нейровизуализационного и нейрофизиологического тестирования. 2. Когнитивные нарушения у пациентов после ангиореconstructивных операций на сонных артериях сопряжены с возможными изменениями (симптомными или асимптомными) состояния вещества головного мозга.

## Литература

1. Танашян М. М., Медведев Р. Б., Евдокименко А. Н., Гемджян Э. Г., Скрылев С. И., Лагода О. В., и др. Прогнозирование ишемических повреждений головного мозга при реконструктивных операциях на внутренних сонных артериях. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2017; 23 (1): 59–65.
2. Bossema ER, Brand N, Moll FL, Ackerstaff RG, de Haan EH, van Doornen LJ. Cognitive functions in carotid artery disease before endarterectomy. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2006; (28): 357–69.
3. Johnston SC, O'Meara ES, Manolio TA, Lefkowitz D, O'Leary DH, Goldstein S, et al. Cognitive impairment and decline are associated with carotid artery disease in patients without clinically evident cerebrovascular disease. *Ann Intern Med*. 2004; 140 (4): 237–47.
4. Romero JR, Beiser A, Seshadri S, Benjamin EJ, Polak JF, Vasan RS, et al. Carotid artery atherosclerosis, MRI indices of brain ischemia, aging, and cognitive impairment: the Framingham study. *Stroke*. 2009; 40 (5): 1590–6.
5. Кунцевич Г. И., Танашян М. М., Скрылев С. И., Кротенкова М. В., Щипакин В. Л., Кощеев А. Ю., и др. Интраоперационное мониторирование мозгового кровотока и состояние вещества головного мозга при открытых и эндоваскулярных вмешательствах в каротидной системе. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2011; 17 (3): 43–8.
6. Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, Ferguson GG, et al. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991; 325 (7): 445–53.
7. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA*. 1995; 273 (18): 1421.
8. Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study (CAVATAS): a randomised trial. *Lancet*. 2001; 357 (9270): 1729–37.
9. Mas JL, Trinquart L, Leys D, Albucher JF, Rousseau H, Viguier A, et al. Endarterectomy Versus Angioplasty in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis (EVA-3S) trial: results up to 4 years from a randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol*. 2008; 7 (10): 885–92.
10. Brott TG, Hobson RW, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, et al. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2010; 363 (1): 11–23.
11. Медведев Р. Б., Танашян М. М., Скрылев С. И., Гемджян Э. Г., Гулевская Т. С., Ануфриев П. Л. Связь ультразвуковых и морфологических характеристик атеросклеротических бляшек каротидного синуса. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2018; 24 (4): 43–9.
12. Altinbas A, van Zandvoort MJ, van den Berg E, Jongen LM, Algra A, Moll FL, et al. Cognition after carotid endarterectomy or stenting a randomized comparison. *Neurology*. 2011; 77 (11): 1084–90.
13. Zhou W, Hitchner E, Gillis K, Sun L, Floyd R, Lane B, et al. Prospective neurocognitive evaluation of patients undergoing carotid interventions. *J Vasc Surg*. 2012; 56 (6): 1571–8.
14. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998; 339 (20): 1415–25.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12 (3): 189–98.
16. Яхно Н. Н. Когнитивные нарушения в неврологической практике. *Неврологический журнал*. 2006; 11 (1): 4–12.

17. Yadav JS, Wholey MH, Kuntz RE, Fayad P, Katzen BT, Mishkel GJ, et al. Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2004; 351 (15): 1493–501.
18. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989; 20 (7): 864–70.
19. Медведев Р. Б., Танашян М. М., Кунцевич Г. И., Лагода О. В., Скрылев С. И., Кротенкова М. В., и др. Ишемические повреждения головного мозга после каротидного стентирования. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2015; 21 (1): 65–71.
20. Fox HM, Rizzo ND, Gifford S. Psychological observations of patients undergoing mitral surgery; a study of stress. *Psychosom Med*. 1954; 16 (3): 186–208.
21. Kügler CF, Vlajic P, Funk H, Raithel D, Platt D, et al. The event-related P300 potential approach to cognitive functions of nondemented patients with cerebral and peripheral arteriosclerosis. *J Am Geriatr Soc*. 1995; 43 (11): 1228–36.
22. Inoue T, Ohwaki K, Tamura A, Tsutsumi K, Saito I, Saito N. Subclinical ischemia verified by somatosensory evoked potential amplitude reduction during carotid endarterectomy: negative effects on cognitive performance clinical article. *J Neurosurg*. 2013; 118 (5): 1023–9.
23. Xu G, Liu X, Meyer JS, Yin Q, Zhang R. Cognitive performance after carotid angioplasty and stenting with brain protection devices. *Neurol Res*. 2007; (29): 251–55.
24. Witt K, Borsch K, Daniels C, Walluscheck K, Alfke K. Neuropsychological consequences of endarterectomy and endovascular angioplasty with stent placement for treatment of symptomatic carotid stenosis: a prospective randomised study. *J Neurol*. 2007; (254): 1524–32.
25. Lal BK, Younes M, Cruz G, Kapadia I, Jamil Z, Pappas PJ. Cognitive changes after surgery vs stenting for carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2011; 54 (3): 691–8.
26. Выборных Д. Э., Федорова С. Ю., Хрущев С. О., Дроков М. Ю., Гемджян Э. Г., Кузьмина Л. А., и др. Когнитивные нарушения у пациентов с заболеваниями системы крови, перенесших трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. *Обзорные психиатрии и медицинской психологии им. В. М. Бехтерева*. 2019; (2): 18–26.
27. Shimada Y, Kobayashi M, Yoshida K, Terasaki K, Fujiwara S, Kubo Y, et al. Reduced Hypoxic Tissue and Cognitive Improvement after Revascularization Surgery for Chronic Cerebral Ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2019; 47 (1–2): 57–64.
28. List J, Hertel-Zens S, Kübke JC, Lesemann A, Schreiber SJ, Flöel A. Cortical reorganization due to impaired cerebral autoregulation in individuals with occlusive processes of the internal carotid artery. *Brain Stimul*. 2014; 7 (3): 381–7.
29. Kuo-Lun Huang, Ting-Yu Chang, Meng-Yang Ho, Wei-Hao Chen, Mei-Yu Yeh, Yeu-JhyChang, et al. The correlation of asymmetrical functional connectivity with cognition and reperfusion in carotid stenosis patients. *Neuro Image Clinical*. 2018; (20): 476–84.
30. Crawley F, Stygal J, Lunn S, Harrison M, Brown MM. Comparison of microembolism detected by transcranial Doppler and neuropsychological sequelae of carotid surgery and percutaneous transluminal angioplasty. *Stroke*. 2000; (31): 1329–34.
31. Ortega G, Alvarez B, Quintana M, Yugueros X, Alvarez-Sabin J, Matas M. Asymptomatic carotid stenosis and cognitive improvement using transcervical stenting with protective flow reversal technique. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014; 47 (6): 585–92.
32. Turan TN, Smock A, Cotsonis G, Bachman D, Al Kasab S, Lynn MJ, et al. SAMMPRIS Investigators. Is There Benefit from Stenting on Cognitive Function in Intracranial Atherosclerosis? *Cerebrovasc Dis*. 2017; 43 (1–2): 31–5.
33. Танашян М. М., Медведев Р. Б., Гемджян Э. Г., Скрылев С. И., Кротенкова М. В., Щипакин В. Л., и др. Предикторы острых церебральных эмболических повреждений при стентировании сонной артерии. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2019; 25 (4). (В печати)
34. Barber PA, Hach S, Tippett LJ, Ross L, Merry AF. Cerebral ischemic lesions on diffusion-weighted imaging are associated with neurocognitive decline after cardiac surgery. *Stroke*. 2008; (39): 1427–33.

## References

1. Tanashyan MM, Medvedev RB, Evdokimenko AN, Gemdzian EG, Skrylev SI, Lagoda OV, et al. Prediction of ischaemic lesions of the brain in reconstructive operations on internal carotid arteries. *Angiol Sosud Khir*. 2017; 23 (1): 59–65.
2. Bossema ER, Brand N, Moll FL, Ackerstaff RG, de Haan EH, van Doornen LJ. Cognitive functions in carotid artery disease before endarterectomy. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2006; (28): 357–69.
3. Johnston SC, O'Meara ES, Manolio TA, Lefkowitz D, O'Leary DH, Goldstein S, et al. Cognitive impairment and decline are associated with carotid artery disease in patients without clinically evident cerebrovascular disease. *Ann Intern Med*. 2004; 140 (4): 237–47.
4. Romero JR, Beiser A, Seshadri S, Benjamin EJ, Polak JF, Vasan RS, et al. Carotid artery atherosclerosis, MRI indices of brain ischemia, aging, and cognitive impairment: the Framingham study. *Stroke*. 2009; 40 (5): 1590–6.
5. Kuntsevich GI, Tanashyan MM, Skrylev SI, Krotchenkova MV, Shchipakin VL, Koshcheev Alu, et al. Intraoperative monitoring of cerebral blood-flow and condition of cerebral at open and endovascular interventions in carotid system. *Angiol Sosud Khir*. 2011; 17 (3): 43–8.
6. Barnett HJM, Taylor DW, Haynes RB, Sackett DL, Peerless SJ, Ferguson GG, et al. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991; 325 (7): 445–53.
7. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA*. 1995; 273 (18): 1421.
8. Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study (CAVATAS): a randomised trial. *Lancet*. 2001; 357 (9270): 1729–37.
9. Mas JL, Trinquart L, Leys D, Albuquer JF, Rousseau H, Viguier A, et al. Endarterectomy Versus Angioplasty in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis (EVA-3S) trial: results up to 4 years from a randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol*. 2008; 7 (10): 885–92.
10. Brott TG, Hobson RW, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, et al. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2010; 363 (1): 11–23.
11. Medvedev RB, Tanashyan MM, Skrylev SI, Gemdzian EG, Gulevskaya TS, Anufriev PL. Relation between ultrasonographic and morphological characteristics of atherosclerotic plaques of carotid sinus. *Angiol Sosud Khir*. 2018; 24 (4): 43–9.
12. Altinbas A, van Zandvoort MJ, van den Berg E, Jongen LM, Algra A, Moll FL, et al. Cognition after carotid endarterectomy or stenting a randomized comparison. *Neurology*. 2011; 77 (11): 1084–90.
13. Zhou W, Hitchner E, Gillis K, Sun L, Floyd R, Lane B, et al. Prospective neurocognitive evaluation of patients undergoing carotid interventions. *J Vasc Surg*. 2012; 56 (6): 1571–8.
14. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1998; 339 (20): 1415–25.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975; 12 (3): 189–98.
16. Yakhno NN. Cognitive impairment in neurological practice. *Nevrologicheskii Zhurnal*. 2006; 11 (1): 4–12.
17. Yadav JS, Wholey MH, Kuntz RE, Fayad P, Katzen BT, Mishkel GJ, et al. Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in

- high-risk patients. *N Engl J Med*. 2004; 351 (15): 1493–501.
18. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989; 20 (7): 864–70.
  19. Medvedev RB, Tanashian MM, Kuntsevich GI, Lagoda OV, Skrylev SI, Krotenkova MV, et al. Ischaemic lesions of cerebral after carotid stenting. *Angiol Sosud Khir*. 2015; 21 (1): 65–71.
  20. Fox HM, Rizzo ND, Gifford S. Psychological observations of patients undergoing mitral surgery; a study of stress. *Psychosom Med*. 1954; 16 (3): 186–208.
  21. Kügler CF, Vlajic P, Funk H, Raithe D, Platt D, et al. The event-related P300 potential approach to cognitive functions of nondemented patients with cerebral and peripheral arteriosclerosis. *J Am Geriatr Soc*. 1995; 43 (11): 1228–36.
  22. Inoue T, Ohwaki K, Tamura A, Tsutsumi K, Saito I, Saito N. Subclinical ischemia verified by somatosensory evoked potential amplitude reduction during carotid endarterectomy: negative effects on cognitive performance clinical article. *J Neurosurg*. 2013; 118 (5): 1023–9.
  23. Xu G, Liu X, Meyer JS, Yin Q, Zhang R. Cognitive performance after carotid angioplasty and stenting with brain protection devices. *Neurol Res*. 2007; (29): 251–55.
  24. Witt K, Borsch K, Daniels C, Walluscheck K, Alfke K. Neuropsychological consequences of endarterectomy and endovascular angioplasty with stent placement for treatment of symptomatic carotid stenosis: a prospective randomised study. *J Neurol*. 2007; (254): 1524–32.
  25. Lal BK, Younes M, Cruz G, Kapadia I, Jamil Z, Pappas PJ. Cognitive changes after surgery vs stenting for carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*. 2011; 54 (3): 691–8.
  26. Vybornykh DE, Fedorova SYu, Khrushchev SO, Drovkov MYu, Gemdzian EG, Kuzmina LA, Parovichnikova EN. Cognitive impairments in patients with hematological malignancies prior and after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Obozrenie psikiatrii i medicinskoj psihologii im VM Behtereva*. 2019; (2): 18–26.
  27. Shimada Y, Kobayashi M, Yoshida K, Terasaki K, Fujiwara S, Kubo Y, et al. Reduced Hypoxic Tissue and Cognitive Improvement after Revascularization Surgery for Chronic Cerebral Ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2019; 47 (1–2): 57–64.
  28. List J, Hertel-Zens S, Kübke JC, Lesemann A, Schreiber SJ, Flöel A. Cortical reorganization due to impaired cerebral autoregulation in individuals with occlusive processes of the internal carotid artery. *Brain Stimul*. 2014; 7 (3): 381–7.
  29. Kuo-Lun Huang, Ting-Yu Chang, Meng-Yang Ho, Wei-Hao Chen, Mei-Yu Yeh, Yeu-JhyChang, et al. The correlation of asymmetrical functional connectivity with cognition and reperfusion in carotid stenosis patients. *Neuro Image Clinical*. 2018; (20): 476–84.
  30. Crawley F, Stygal J, Lunn S, Harrison M, Brown MM. Comparison of microembolism detected by transcranial Doppler and neuropsychological sequelae of carotid surgery and percutaneous transluminal angioplasty. *Stroke*. 2000; (31): 1329–34.
  31. Ortega G, Alvarez B, Quintana M, Yugueros X, Alvarez-Sabin J, Matas M. Asymptomatic carotid stenosis and cognitive improvement using transcervical stenting with protective flow reversal technique. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014; 47 (6): 585–92.
  32. Turan TN, Smock A, Cotsonis G, Bachman D, Al Kasab S, Lynn MJ, et al. SAMMPRIS Investigators. Is There Benefit from Stenting on Cognitive Function in Intracranial Atherosclerosis? *Cerebrovasc Dis*. 2017; 43 (1–2): 31–5.
  33. Tanashyan MM, Medvedev RB, Gemdzian EG, Skrylev SI, Krotenkova MV, Shchipakin VL, et al. Predictors of acute cerebral embolic lesions during carotid artery stenting. *Angiol Sosud Khir*. 2019; 25 (4). (In Print)
  34. Barber PA, Hach S, Tippett LJ, Ross L, Merry AF. Cerebral ischemic lesions on diffusion-weighted imaging are associated with neurocognitive decline after cardiac surgery. *Stroke*. 2008; (39): 1427–33.



## ДИСЕКЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ СОННОЙ И ПОЗВОНОЧНОЙ АРТЕРИЙ: МОРФОЛОГИЯ, ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ПРОВОЦИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Л. А. Калашникова ✉, Т. С. Гулевская, А. В. Сахарова, Р. П. Чайковская, М. В. Губанова, М. С. Данилова, А. А. Шабалина, Л. А. Добрынина  
Научный центр неврологии, Москва, Россия

Причина и провоцирующие факторы диссекции внутренней сонной и позвоночной (ВСА/ПА) артерий остаются малоизученными. Целью работы было изучить морфологические изменения стенок ВСА/ПА при диссекции, провоцирующие факторы диссекции, клинические признаки и биомаркеры повреждения соединительной ткани (СТ). Обследован 271 больной (средний возраст —  $37,0 \pm 10$  лет, женщины — 54%) с диссекцией ВСА/ПА. Провоцирующие факторы диссекции проанализированы у всех больных. Клинические признаки и биомаркеры повреждения СТ (матриксная металлопротеиназа 9, тканевой ингибитор металлопротеиназы, гидроксипролин, сульфатированные гликозаминогликаны) исследованы у 82 больных и 40 здоровых добровольцев. Гистологическое исследование расслоенных и не расслоенных артерий, проведенное в 5 случаях, обнаружило признаки дисплазии артериальной стенки, сходные с таковыми при фибромышечной дисплазии: истончение, расщепление внутренней эластической мембраны, участки фиброза, неправильной ориентировки и некроза миоцитов в меди. Клинические признаки и биомаркеры дисплазии соединительной ткани (ДСТ) были более выражены при диссекции, чем в контроле. Основными провоцирующими факторами диссекции были повороты головы/физическая нагрузка (42%), травма головы, как правило, легкая (10%), острая респираторная инфекция, перенесенная в течение предшествующего месяца (14%). Заключение: дисплазия артериальной стенки служит причиной диссекции ВСА/ПА, которая развивается спонтанно или под действием провоцирующих факторов. Исследование биомаркеров и клинических признаков ДСТ указывает на наличие распространенного дефекта СТ у больных с диссекцией ВСА/ПА.

**Ключевые слова:** диссекция внутренней сонной и позвоночной артерий, морфологические изменения артериальной стенки, клинические признаки дисплазии соединительной ткани, биомаркеры повреждения соединительной ткани, провоцирующие факторы диссекции

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН.

**Информация о вкладе авторов:** Л. А. Калашникова, М. В. Губанова — анализ литературы, сбор и обработка материала, обработка полученных данных, написание текста статьи; Т. С. Гулевская, А. В. Сахарова, Р. П. Чайковская, А. А. Шабалина — сбор, анализ и интерпретация данных; М. С. Данилова — подбор участников исследования; Л. А. Добрынина — обработка полученных данных, редактирование текста статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 12/14 от 10 декабря 2014 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Андреевна Калашникова  
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; kalashnikovancn@yandex.ru

**Статья получена:** 03.09.2019 **Статья принята к печати:** 19.09.2019 **Опубликована онлайн:** 03.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.064

## INTERNAL CAROTID AND VERTEBRAL ARTERY DISSECTION: MORPHOLOGY, PATHOPHYSIOLOGY AND PROVOKING FACTORS

Kalashnikova LA ✉, Gulevskaya TS, Sakharova AV, Chaykovskaya RP, Gubanova MV, Danilova MS, Dobrynina LA, Shabalina AA  
Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The causes of internal carotid artery (ICA) and vertebral artery (VA) dissection, as well as its provoking factors, remain understudied. The aim of this paper was to explore morphological changes in the ICA/VA walls, factors provoking dissection, clinical signs and biomarkers of connective tissue (CT) damage. A total of 271 patients were examined, of whom 54% were women. The mean age of the participants was  $37.0 \pm 10$  years. Clinical signs and biomarkers of CT damage (matrix metalloproteinase 9, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, hydroxyproline, sulphated glycosaminoglycans) were analyzed in 82 patients and 40 healthy volunteers. Histologic examination of dissected and seemingly intact arteries conducted in 5 cases revealed signs of arterial wall dysplasia similar to those characteristics of fibromuscular dysplasia: thinning and splitting of the internal elastic membrane, areas of fibrosis, irregular orientation of myocytes, and their necrosis in the tunica media. Clinical signs and biomarkers of CT dysplasia (CTD) were more pronounced in patients with arterial dissection than in the controls. The major provoking factors were head turns and physical activity (42%), minor head injury (10%), and acute respiratory infection in the month preceding arterial dissection (14%). We conclude that arterial wall dysplasia is a predisposing factor for ICA/VA dissection, both spontaneous and provoked. The analysis of CTD biomarkers and clinical signs suggests connective tissue pathology in patients with ICA/VA dissection.

**Keywords:** internal carotid artery dissection, vertebral artery dissection, morphological changes in the arterial wall, clinical signs of connective tissue dysplasia, biomarkers of connective tissue damage, factors provoking dissection

**Funding:** this study was part of the state assignment for Research Center of Neurology.

**Author contribution:** Kalashnikova LA, Gubanova MV — literature analysis, data acquisition, processing of the obtained data, manuscript preparation; Gulevskaya TS, Sakharova AV, Chaykovskaya RP, Shabalina AA — data acquisition, analysis and interpretation; Danilova MS — recruitment of participants; Dobrynina LA — processing of the obtained data, manuscript preparation.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (Protocol 12/14 dated December 10, 2014). All study participants consented to participate in the study and to have the results published.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila A. Kalashnikova  
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; kalashnikovancn@yandex.ru

**Received:** 03.09.2019 **Accepted:** 19.09.2019 **Published online:** 03.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.064

Диссекция (расслоение) внутренней сонной (ВСА) и позвоночной артерий (ПА) представляет собой проникновение крови через разрыв интимы из просвета в стенку артерии с распространением между ее слоями

и их расслаиванием, что приводит к формированию интрамуральной гематомы (ИМГ), реже — двойного просвета или расслаивающей аневризмы [1]. Сужение или окклюзия просвета артерии под влиянием ИМГ



служит основной причиной ишемических нарушений мозгового кровообращения. Другим механизмом их развития является артерио-артериальная эмболия тромбами, сформировавшимися в месте разрыва интимы. При отсутствии гемодинамически значимых стенозов единственным клиническим проявлением диссекции может быть шейная и головная боли [1, 2].

До конца прошлого века диссекцию ВСА/ПА считали крайне редкой патологией, поскольку основным методом верификации было патоморфологическое исследование в случаях летального исхода при тяжелом инсульте. Последний при диссекции ВСА/ПА происходит очень редко, что и приводило к ошибочному представлению о раритетности диссекции. После широкого внедрения в клинику методов нейровизуализации, а именно магнитно-резонансной ангиографии (МРА) и компьютерно-томографической ангиографии (КТА), а также режимов магнитно-резонансной томографии (МРТ), позволяющих визуализировать ИМГ, стало очевидным, что диссекция ВСА/ПА служит основной причиной ишемического инсульта в молодом возрасте, а также причиной шейной и головной болей, которые часто не распознают или диагностируют с большим опозданием [1, 3–7].

Целенаправленное изучение диссекции артерий, кровоснабжающих головной мозг, в нашей стране впервые было начато в Научном центре неврологии в конце 1990-х гг. почти одновременно с исследованиями, проводимыми за рубежом. Несмотря на успехи в изучении клинических и нейровизуализационных проявлений диссекции, до настоящего времени остается открытым и малоизученным вопрос о причине развития диссекции. Зарубежные исследователи отмечают наличие слабости стенки артерий, кровоснабжающих головной мозг. В связи с редкостью аутопсий, однако, ее причина остается неясной, хотя авторы констатируют патологию соединительной ткани [8, 9]. Поиск мутаций в гене коллагена, как причины слабости сосудистой стенки у больных с диссекцией, не дал результатов [10, 11].

Целью работы было проанализировать следующие аспекты диссекции ВСА/ПА: 1) морфологические изменения стенки артерий, кровоснабжающих головной мозг; 2) клинические признаки слабости соединительной ткани и биомаркеры ее повреждения; 3) основные факторы, провоцирующие диссекцию.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В течение 2000–2018 гг. обследовали 271 больного (из них 54% женщин, 46% мужчин; средний возраст —  $37,0 \pm 10$  лет) с диссекцией ВСА/ПА. Критерий включения пациентов в исследование: верификация ИМГ с помощью нейровизуализации и/или обнаружение патогномичных для диссекции ангиографических данных. Критерии исключения: травматическая диссекция ВСА/ПА; отсутствие нейровизуализационной верификации при типичных для диссекции клинических проявлениях. До развития диссекции все больные считали себя практически здоровыми. Во всех случаях диссекция была спонтанной и клинически проявлялась ишемическим инсультом (63%), преходящим нарушением мозгового кровообращения (9%), изолированной шейной/головной болью (27%), изолированным поражением каудальной группы нервов (1%). Локализация диссекции была следующей: ВСА — у 139 больных (51%), ПА — у 116 больных (43%), ВСА + ПА — у 16 больных (6%). У 59 больных (22%) имелись

множественные диссекции: поражение обеих ПА, обеих ВСА или их сочетание. Гистологическое исследование артерий, кровоснабжающих головной мозг, проводили сотрудники лаборатории патологической анатомии Научного центра неврологии. В 4 случаях диссекции ВСА, завершившейся летальным исходом вследствие обширного инфаркта головного мозга, проведено исследование как расслоенных, так и нерасслоенных артерий, кровоснабжающих головной мозг. Еще в одном случае был исследован фрагмент ВСА, полученный в ходе реконструктивной операции на ВСА, осложнившейся ее диссекцией с развитием ишемического инсульта. Окраску гистологических препаратов проводили гематоксилином и эозином, фукселином по методу Вейгерта, по методу Косса для выявления солей кальция и по методу ван Гизона.

Клинические признаки дисплазии соединительной ткани (ДСТ), выбранные из диагностических критериев наследственных заболеваний соединительной ткани (48 признаков), были проанализированы у 82 больных с диссекцией ВСА/ПА. Каждый признак оценивали как положительный (1 балл) или отсутствующий (0 баллов). Кроме того, у всех больных оценивали наличие головной боли в анамнезе. Контрольную группу составили 40 здоровых добровольцев (средний возраст —  $38,5 \pm 6,6$  лет, из них 62,5% женщины). Серологические биомаркеры ДСТ (матриксную металлопротеиназу 9 — ММП-9, тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 — ТИМП-1), гидроксипролин, сульфатированные гликозаминогликаны), а также фактор роста фибробластов 21 (ФРФ21) исследовали однократно иммуноферментным методом (ELISA). Орозомукоид определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30iPrime (Thermo Fisher Scientific Oy; Финляндия) у 82 больных. Контрольную группу составили 25 здоровых добровольцев (средний возраст —  $36,9 \pm 6,6$  лет, женщины — 60,1%). Провоцирующие факторы диссекции, частоту ее рецидивов и сезонное распределение по месяцам оценивали у всех больных.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM; США). Количественные переменные представляли в виде среднего и стандартного отклонений, качественные и порядковые переменные — в виде частоты и доли в процентах. Для проверки нормальности распределения количественного признака использовали критерий Шапиро–Уилка. Для сравнения качественных переменных использовали точный критерий Фишера. Для проверки гипотез о различии использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Тестирование гомоскедастичности остатков модели проводили методом Голдфелда–Куандта. Во всех случаях применение ANOVA оказалось адекватным. Статистически значимыми считали результаты при  $p < 0,05$ . Выявление значимых для диссекции признаков ДСТ при помощи бинарной логистической регрессии проводили следующим образом: из всех признаков методом последовательного набора по Вальду отобрали значимые. После этого с учетом значимости различий по разным признакам ДСТ между пациентами и группой контроля (Хи-квадрат) проводили улучшение качества модели включением дополнительных признаков. Таким образом, были отобраны признаки ДСТ, характерные для диссекции ВСА и ПА. При одновременном наличии четырех основных и двух дополнительных признаков была достигнута максимальная предсказательная способность регрессионной модели, что позволяло

выбрать именно такое сочетание признаков ДСТ в качестве диагностически значимых для диссекции ВСА и ПА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Морфологические изменения артерий, кровоснабжающих головной мозг

При макроскопическом исследовании было отмечено расширение и уплотнение расслоенных артерий, что делало их внешне сходными с артериями, обтурированными тромбами. При гистологическом исследовании экстра-интракраниальных артерий было обнаружено изменение внутренней эластической мембраны в виде участков ее истончения, расслоения, выпрямления с исчезновением физиологической извитости, очаговым обызвествлением. На некоторых участках эластическая мембрана полностью отсутствовала. Изменения средней оболочки были представлены ее неравномерной толщиной с зонами резкого истончения, уменьшением числа миоцитов, их неправильной ориентировкой, некрозом, наличием участков фиброза и склероза, уменьшением количества эластических волокон. Указанные изменения носили распространенный характер и обнаруживались не только в артериях, подвергнувшихся диссекции, но и в остальных, внешне неизмененных экстра- и интракраниальных артериях головного мозга (см. рис.).

### Клинические признаки дисплазии соединительной ткани и ее биомаркеры у больных с диссекцией ВСА/ПА

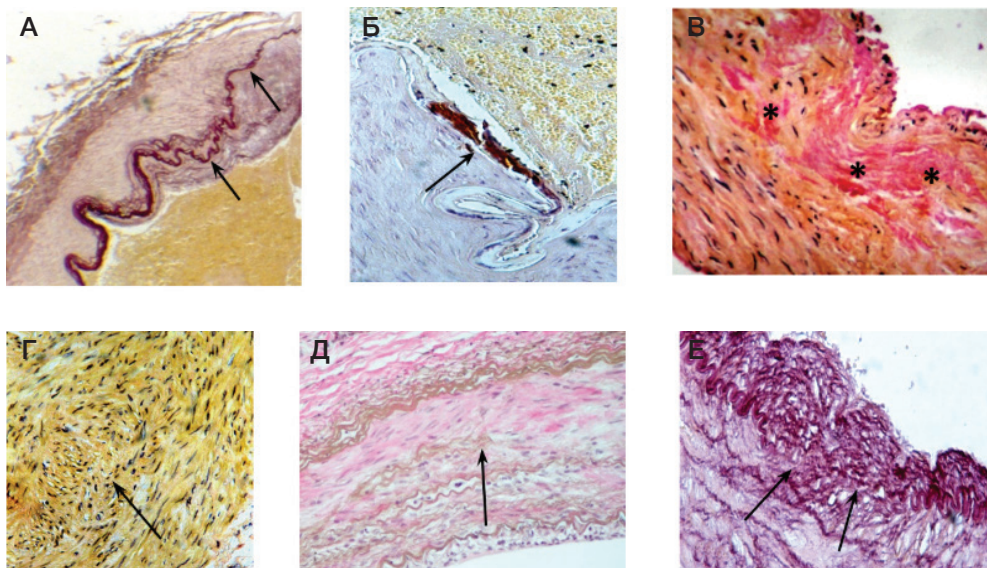
Изучение 48 признаков ДСТ показало, что они более выражены у больных с диссекцией ВСА/ПА (средняя сумма баллов —  $7,9 \pm 3,6$ ), чем в контроле ( $6 \pm 2,5$  балла;  $p = 0,0039$ ), причем у женщин их выраженность была больше ( $8,73 \pm 3,0$  балла), чем у мужчин  $6,4 \pm 2,5$ ;  $p = 0,05$ ). Достоверно чаще, чем в контроле, у больных

с диссекцией ВСА/ПА встречались следующие из 48 оцененных признаков ДСТ: артериальная гипотония (51% vs 20%;  $p < 0,012$ ), склонность к образованию синяков (40% vs 10%;  $p = 0,011$ ); широкие атрофические рубцы после повреждения кожи и операций (22,5% vs 0%;  $p = 0,019$ ); тонкая кожа, через которую просвечивают вены (28,75% vs 5%;  $p = 0,034$ ); арковидное небо (20% vs 0%;  $p = 0,034$ ); склонность к запорам (30% vs 10%;  $p = 0,05$ ); носовые кровотечения (33,75% vs 15%;  $p = 0,043$ ); голубые склеры глаз (20% vs 5%;  $p = 0,05$ ). Кроме того, у больных с диссекцией ВСА/ПА, чаще, чем в контроле (60% vs 35%;  $p = 0,02$ ), в анамнезе отмечена головная боль. В соответствии со статистической значимостью выделенные восемь признаков ДСТ и головная боль были разделены на основные (артериальная гипотония, склонность к синякам, широкие атрофические рубцы на коже после ее повреждения, головная боль в анамнезе) и дополнительные (тонкая кожа, носовые кровотечения, склонность к запорам, голубые склеры, арковидное небо).

При наличии у больного четырех основных и двух дополнительных диагностических признаков согласно регрессионной модели может быть достигнута максимальная предсказательная способность в отношении возможности развития диссекции, в первую очередь, как причины ишемического инсульта (77%), при наличии только четырех основных признаков предсказательная точность модели составляет 75%.

### Биологические маркеры повреждения соединительной ткани

У больных с диссекцией ВСА/ПА было выявлено повышение MMP-9 ( $384 \pm 69,3$  нг/мл vs  $203,1 \pm 60,5$  в контроле;  $p < 0,0005$ ), TIMP-1 ( $393,9 \pm 63,4$  нг/мл vs  $134,4 \pm 30,8$  в контроле;  $p < 0,0005$ ), сульфатированных гликозаминогликанов ( $6,2 \pm 1,4$  мкг/мл vs  $4,5 \pm 0,8$  в контроле;  $p < 0,0005$ ), орозомукоида ( $121,6 \pm 27,8$  мг/дл vs  $88,8 \pm 17,4$  в контроле;  $p < 0,0005$ ). Уровень гидроксипролина



**Рисунок.** Диспластические изменения стенок внутренних сонных и позвоночных артерий: **А.** Истончение внутренней эластической мембраны и ее расслоение в сифоне расслоенной ВСА (стрелки). Окраска фукселином по методу Вейгерта. Увеличение  $\times 100$ . **Б.** Участок обызвествления внутренней эластической мембраны в сифоне расслоенной ВСА (стрелка). Окраска по методу Косса для выявления солей кальция. Увеличение  $\times 200$ . **В.** Очаговый фиброз (звездочка) в средней оболочке экстракраниального отдела расслоенной ВСА. Окраска по методу ван Гизона. Увеличение  $\times 200$ . **Г.** Участок средней оболочки сифона расслоенной ВСА с неправильной ориентировкой миоцитов (стрелка). Окраска по методу ван Гизона. Увеличение  $\times 200$ . **Д.** Участки фиброза и уменьшения числа эластических волокон в средней оболочке нерасслоенной внутренней сонной артерии (стрелка). Окраска по методу ван Гизона. Увеличение  $\times 200$ . **Е.** Отсутствие фрагмента внутренней эластической мембраны (стрелки) в нерасслоенной позвоночной артерии. Окраска фукселином по методу Вейгерта. Увеличение  $\times 200$

был снижен ( $604,9 \pm 350,9$  нг/мл vs  $1293,6 \pm 214,5$  в контроле;  $p < 0,0005$ ) (табл. 1). Уровень ММП-9 был выше при расслоении нескольких артерий ( $400,5 \pm 71,5$  нг/мл), чем одной ВСА ( $375,5 \pm 71,55$  нг/мл;  $p < 0,03$ ) или диссекции одной ПА ( $369,3 \pm 68,6$  нг/мл;  $p < 0,08$ ). Уровень ТИМП-1 при множественных диссекциях также был выше ( $422,2 \pm 53,8$  нг/мл), чем при диссекции одной ВСА ( $378,5 \pm 62,3$  нг/мл;  $p < 0,024$ ) или одной ПА ( $373,6 \pm 60,6$  нг/мл;  $p < 0,008$ ). Уровень сульфатированных гликозаминогликанов при множественных диссекциях составил  $6,8 \pm 1,2$  мкг/мл, при повреждении одной ВСА или одной ПА —  $5,8 \pm 1,3$  мкг/мл и  $5,7 \pm 1,5$  мкг/мл соответственно ( $p < 0,029$  и  $0,016$ ). Уровень орозомукоида при множественных диссекциях был выше ( $129,7 \pm 34$  мг/дл), чем при диссекции одной ВСА ( $118,6 \pm 25,3$ ;  $p < 0,039$ ) и одной ПА ( $112,6 \pm 20,6$  мг/дл;  $p < 0,011$ ) (табл. 2). В первые 3 месяца заболевания уровни орозомукоида и гидроксипролина были выше, чем в более поздние сроки. Уровень ТИМП-1, напротив, был выше в позднем периоде диссекции. ФРФ-21 — биомаркер митохондриальной патологии [12] при диссекции был повышен до  $536 \pm 250$  пг/мл (контроль —  $204 \pm 50$  пг/мл;  $p < 0,0005$ ).

### Провоцирующие факторы развития диссекции

Наиболее часто (42% случаев) провоцирующими факторами диссекции были движения в шейном отделе позвоночника (наклоны, повороты, неудобное вынужденное положение головы, физическое напряжение), которые при диссекции ПА обнаруживали чаще (61%), чем при диссекции ВСА (27%;  $p < 0,0009$ ). Предшествовавшая легкая травма головы была отмечена у 10% больных (ВСА — 14%, ПА — 5%;  $p < 0,05$ ). Острая респираторная инфекция, перенесенная в течение месяца до диссекции ВСА/ПА, выявлена у 14% больных. Контрацептивы перед развитием диссекции принимали 12% женщин.

**Таблица 1.** Биомаркеры ДСТ у больных с диссекцией ВСА/ПА и в контроле (однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA)

| Показатели (среднее $\pm$ SD)               | Диссекция<br>$n = 82$ | Контроль<br>$n = 25$ | $p$        |
|---|-----------------------|----------------------|------------|
| ММП-9, нг/мл                                | $384 \pm 69,3$        | $203,1 \pm 60,5$     | $< 0,0005$ |
| ТИМП-1, нг/мл                               | $393,9 \pm 63,4$      | $134,4 \pm 30,8$     | $< 0,0005$ |
| Орозомукоид, мг/дл                          | $121,6 \pm 27,8$      | $88,8 \pm 17,4$      | $< 0,0005$ |
| Сульфатированные гликозаминогликаны, мкг/мл | $6,2 \pm 1,4$         | $4,5 \pm 0,8$        | $< 0,0005$ |
| Гидроксипролин, нг/мл                       | $604,9 \pm 350,9$     | $1293,6 \pm 214,5$   | $< 0,0005$ |

**Примечание:**  $p$  — уровень значимости; SD — стандартное отклонение (standard deviation).

**Таблица 2.** Биомаркеры ДСТ в зависимости от локализации и распространенности диссекции (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными тестами, сравнениями по методу Шеффе)

| Лабораторный показатель (среднее $\pm$ SD)  | Группа 1                  | Группа 2                 | Группа 3                              | $p$                |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------|
|   | Диссекция ВСА<br>$n = 28$ | Диссекция ПА<br>$n = 27$ | Диссекция более 1 артерии<br>$n = 27$ |                    |
| ММП-9, нг/мл                                | $375,5 \pm 71,5$          | $369,3 \pm 68,6$         | $400,5 \pm 71,5$                      | Группа 1 и 3 0,03  |
|   |                           |                          |                                       | Группа 2 и 3 0,008 |
| ТИМП-1, нг/мл                               | $378,5 \pm 62,3$          | $373,6 \pm 60,6$         | $422,2 \pm 53,8$                      | Группа 1 и 3 0,024 |
|   |                           |                          |                                       | Группа 2 и 3 0,008 |
| Сульфатированные гликозаминогликаны, мкг/мл | $5,8 \pm 1,3$             | $5,7 \pm 1,5$            | $6,8 \pm 1,2$                         | Группа 1 и 3 0,029 |
|   |                           |                          |                                       | Группа 2 и 3 0,016 |
| Орозомукоид, мг/дл                          | $118,6 \pm 25,3$          | $112,6 \pm 20,6$         | $129,7 \pm 34$                        | Группа 1 и 3 0,039 |
|   |                           |                          |                                       | Группа 2 и 3 0,011 |

**Примечание:**  $p$  — уровень значимости; ВСА — внутренняя сонная артерия; ПА — позвоночная артерия; SD — стандартное отклонение.

Проведенный нами анализ сезонного распределения диссекции ВСА/ПА не выявил статистически значимой разницы в частоте ее развития в разные месяцы. Частота ее встречаемости с января по декабрь была следующей: 9,6%, 9,3%, 8,1%, 4,2%, 8%, 9,6%, 5,9%, 10%, 9,6%, 8,5%, 7,0%, 10,4%. Ассоциации с перенесенной в предшествующий месяц респираторной инфекцией обнаружено не было.

### Рецидивы диссекции

Развитие повторной диссекции (рецидив), вовлекающей другую артерию, как правило, одноименную противоположную, было зарегистрировано у 12% больных. Все рецидивы были верифицированы с помощью нейровизуализации. В большинстве случаев они происходили в первые 35 дней заболевания (7,3%), в последующие месяцы (до года) их частота составила 1,5%, в дальнейшем рецидивы развивались через 5–10 лет у 3,3% больных.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Комплексное клиничко-лабораторно-морфологическое исследование у больных с диссекцией ВСА/ПА выявило признаки патологии соединительной ткани, что отмечали и другие авторы [8, 9]. Обнаруженные изменения не соответствуют известным наследственным синдромам патологии соединительной ткани (Элерса–Данло, Марфана, гипермобильности суставов) и могут, на наш взгляд, быть рассмотрены как недифференцированные. В стенках экстра- и интракраниальных артерий, как расслоенных, так и внешне неизмененных, они были представлены выраженными диспластическими изменениями, которые и лежали в основе слабости артериальной стенки, предрасполагая ее к диссекции. Комплекс изменений,



обнаруженных при микроскопическом исследовании экстра- и интракраниальных артерий, по нашему мнению, характерен для фибромышечной дисплазии (ФМД) [13–16]. В связи с этим уместно отметить, что ФМД, международные диагностические критерии которой были опубликованы в 2019 г. [17], имеет много сходных черт с диссекцией ВСА/ПА. Так, при ФМД часто развиваются диссекции различных артерий, включая ВСА/ПА, выявляются аневризмы и извитость артерий, которые обнаруживают и у больных с диссекцией ВСА/ПА. Многие больные с ФМД [17], как и больные с диссекцией [18], страдают головными болями. Частота наследственной отягощенности при ФМД (1,9–7,3%) [17] и диссекции ВСА/ПА (2%) [19] сходна. Полногеномное ассоциативное исследование больных с ФМД выявило полиморфизм гена PNASR1 [20], который был обнаружен и при диссекции ВСА/ПА во время многоцентрового международного обследования 1393 больных, включавших и наших пациентов [21]. Как при диссекции [1, 5, 22], так и при ФМД [17], отмечают неблагоприятное влияние приема контрацептивов. Несмотря на отмеченное сходство между больными с ФМД и диссекцией, при последней отсутствует ключевой диагностический ангиографический признак ФМД — четкообразное изменение артерий (чередование участков сужения и расширения). В связи с этим вопрос наличия ФМД при отсутствии типичного изменения ангиографической картины нуждается в дальнейшем изучении. Косвенным подтверждением такой возможности является наблюдение за одним из наших больных, у которого на протяжении 10 лет трижды развивались повторные диссекции обеих ВСА и правой ПА, а также инфаркт левой почки. При КТА почечных артерий обнаружены характерные для ФМД четкообразные изменения, тогда как в ВСА и ПА их не было. Согласно современным диагностическим критериям ФМД, при наличии у больного типичных изменений хотя бы в одном сосуде, развитие диссекции, выявление извитости или аневризм в других бассейнах необходимо рассматривать как проявления ФМД. Именно такая ситуация сложилась у нашего больного.

Причина диспластических изменений в артериальной стенке, морфологически сходных с таковыми при ФМД, у больных с диссекцией окончательно не ясна. Согласно нашей гипотезе, дисплазия связана с митохондриальными нарушениями [23, 24]. Выявленное нами повышение ФРФ-21, биомаркера митохондриальной патологии [12], у больных с диссекцией ВСА/ПА косвенно подтверждает эту концепцию. Патогенез ФМД также остается нераскрытым, некоторые авторы придают значение повышению уровня трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  и  $\beta 2$  (TGF- $\beta 1$  и TGF- $\beta 2$ ), продуцируемого фибробластами [25].

Оценка клинических признаков ДСТ показала, что они более выражены у больных с диссекцией ВСА/ПА, чем в контроле, что отмечают и другие авторы [9]. Это указывает на распространенный характер повреждения соединительной ткани, что согласуется с электронно-микроскопическим исследованием биоптатов кожи [8, 24]. Отмеченная нами большая встречаемость признаков ДСТ у женщин позволяет предположить, что в их развитии играют роль женские половые гормоны. Наряду с клиническими признаками ДСТ у больных с диссекцией оценивали наличие головной боли в анамнезе, поскольку, согласно нашим исследованиям, она часто связана с диспластическими изменениями стенки экстра- и интракраниальных артерий [18, 22], тогда как в зарубежной литературе ее трактуют как мигрень [5]. Практическое

значение анализа признаков ДСТ у больных с инсультом состоит в том, что они могут быть использованы при уточнении причины инсульта в молодом возрасте, особенно в ситуации, когда недоступно нейровизуализационное исследование. Статистическая обработка данных показала, что при наличии четырех основных и двух дополнительных признаков ДСТ вероятность диссекции как причины ИИ в молодом возрасте достигает 77% [22].

Наличие распространенного повреждения соединительной ткани у больных с диссекцией ВСА/ПА было подтверждено изучением биомаркеров ДСТ. Найденное нами повышение ММП-9, сульфатированных гликозаминогликанов и орозомукоида свидетельствовало о повреждении соединительной ткани (коллагена, межклеточного вещества) и развитии воспалительной реакции в артериальной стенке. Лабораторные признаки воспаления отмечают и другие авторы, связывая их с предшествующей инфекцией, играющей роль провокации диссекции [26]. С этим согласуется более высокий уровень орозомукоида, маркера воспаления, отмеченный нами в первые 3 месяца заболевания. При расслоении 2–3 артерий биомаркеры ДСТ были выше, что указывает на более выраженное повреждение соединительной ткани, обусловившее развитие множественных диссекций. Уровень ТИМП-1, фермента, блокирующего матриксные протеиназы, при давности диссекции более 3 месяцев, был выше, чем в первые 3 месяца, что, по-видимому, отражало переход процесса в репаративную стадию.

В развитии диссекции ВСА и ПА в условиях имеющейся дисплазии их стенки большое значение отводят провоцирующим факторам. К основным из них относят повороты головы, ее травму, как правило, легкую, физическую нагрузку, острую респираторную инфекцию, перенесенную в течение предшествующего месяца, реже — прием гормональных контрацептивов, повышение АД, прием алкоголя непосредственно перед развитием диссекции, употребление препаратов для понижения веса, частые и длительные перелеты на самолете [1, 5, 22]. Наиболее распространенными провоцирующими факторами у наших больных были движения в шее и физическая нагрузка (42%), которые при диссекции ПА встречались чаще (61%), чем при диссекции ВСА (27%). В зарубежной литературе обсуждают провоцирующую роль мануальной терапии [5], которая имела место и у отдельных наших больных, а также травмы шеи [6, 7]. Наибольшая уязвимость ПА при поворотах головы объясняется ее анатомическими особенностями, а именно фиксацией в позвоночном канале. В условиях пониженной эластичности артериальной стенки вследствие ее дисплазии натяжение артерии во время поворота головы приводит к надрыву интимы в первую очередь в местах ее фиксации к окружающим структурам. Легкая травма головы чаще предшествует диссекции ВСА (14%), чем ПА (5%), что отмечают и зарубежные исследователи [5]. Во время травмы головы происходит смещение головного мозга относительно костей черепа, что приводит к натяжению интракраниального отдела ВСА и надрыву интимы в месте фиксации ВСА к костным структурам при входе в канал пирамидки височной кости, где чаще всего и локализуется ИМГ.

Инфекционное, как правило, острое респираторное, заболевание, перенесенное в течение месяца, предшествовавшее диссекции ВСА/ПА, было отмечено у 14% наших больных. При инсультах иного генеза предшествующая инфекция встречается реже, что

подтверждает ее роль в развитии диссекции [27]. Инфекционное заболевание сопровождается повышением уровня протеолитических ферментов лейкоцитарного происхождения и матриксных металлопротеиназ, которые вызывают деградацию белков экстраклеточного матрикса сосудистой стенки и повреждение эндотелия [26, 27]. Обнаруженное нами повышение уровня ММТ-9 и орозомукоида у больных с диссекцией подтверждает этот механизм провоцирующего действия инфекции.

Прием контрацептивов как фактор, провоцирующий диссекцию, был выявлен у 12% обследованных нами женщин, что несколько реже, чем в европейских исследованиях [6, 7]. Гормональные препараты, по-видимому, усиливают диспластические изменения артериальной стенки, предрасполагая ее к расслоению.

Некоторые исследователи придают значение сезонным изменениям климата на основании более частого развития диссекции в холодный период года, предполагая при этом, что сезонность реализует свое влияние через характерное для этого периода года повышение пульсового АД и более частое развитие респираторных инфекционных заболеваний [28, 29]. Проведенный нами анализ сезонного распределения случаев возникновения диссекции ВСА/ПА у 271 больного не выявил статистически значимой разницы в частоте ее развития в разные месяцы, а также и ассоциации с инфекционными заболеваниями. Метеорологическая неустойчивость, в первую очередь изменение атмосферного давления, характерна для всех сезонов года в средней полосе России, где проживало большинство наших больных. Возможно, что патогенетически значимым метеорологическим фактором было снижение атмосферного давления, которое влечет за собой расширение артерии. В этой ситуации в месте ее наименьшей эластичности, обусловленной участками фиброза и неправильной ориентировки миоцитов, может произойти надрыв интимы.

Несмотря на относительно понятный механизм действия большинства провоцирующих факторов, остается неясным, почему в условиях их частой встречаемости в повседневной жизни (повороты головы, физическая нагрузка, респираторные инфекции и др.) и наличии у больных, согласно морфологическим исследованиям, распространенных признаков дисплазии артерий, кровоснабжающих головной мозг, рецидивы диссекции происходят редко. Так, частота рецидивов, верифицированных с помощью нейровизуализации, у наших больных составила 12,1%, причем в большинстве случаев они происходили в первые 35 дней заболевания (7,3%), тогда как в последующие месяцы (до года) их частота была значительно меньше (1,5%), в дальнейшем рецидивы отмечены у 3,3% больных через 5–10 лет от развития первой диссекции. Действительная частота повторных

диссекций в первые дни–недели очевидно больше, так как у 22% наших больных при первом нейровизуализационном обследовании обнаруживали расслоение более одной артерии. По данным зарубежных авторов, рецидивы чаще возникают в первые недели заболевания, и их частота составляет менее 3%. Частота рецидивов в поздние сроки среди 200 больных, наблюдавшихся другими авторами в течение 7,4 лет, составила 7% [30].

Наибольшая частота рецидивов в первый месяц после развития диссекции и редкость ее развития в более поздние сроки позволяют предположить, что существуют «критические» периоды снижения прочности артериальной стенки, способствующие развитию диссекции. Наряду с инфекцией и гормональными изменениями, отмечающимися у небольшой части больных, по-видимому, имеют значение и какие-то эндогенные обменные нарушения, приводящие к деградации экстраклеточного матрикса, некрозу миоцитов средней оболочки артериальной стенки, который был обнаружен нами при гистологическом исследовании экстра- и интракраниальных артерий, а также к нарушению трофической функции фибробластов [14, 13]. Характер предполагаемых обменных нарушений не известен. С позиции нашей концепции митохондриальной цитопатии как причины дисплазии сосудистой стенки [23] интересна параллель с энергетическими кризисами, характерными для митохондриальных заболеваний, которые могли бы объяснить редкость поздних рецидивов диссекции и их частое развитие в ранние сроки.

## ВЫВОДЫ

1. Слабость сосудистой стенки, обусловленная ее дисплазией, предрасполагает к диссекции ВСА/ПА, морфологическая характеристика изменений стенки соответствует ФМД.
2. Под влиянием эндогенных и экзогенных факторов выраженность дисплазии усиливается до критического состояния, что спонтанно или под действием провоцирующих факторов может приводить к диссекции.
3. Продолжительность критического периода — немного больше месяца, во время которого чаще всего и происходят рецидивы. Для их предотвращения в этот период необходимо избегать резких движений головой, с целью чего рекомендуется ношение шейного ортеза.
4. Для выявления клинически асимптомной повторной диссекции через месяц после начала заболевания показано проведение повторной МРТ артерий шеи в режиме T1fs.
5. Изучение генеза дисплазии артериальной стенки при диссекции ВСА/ПА поможет разработать патогенетически обоснованное профилактическое лечение наряду с применением препаратов, улучшающих трофику соединительной ткани.

## Литература

1. Калашникова Л. А., Добрынина Л. А. Диссекция артерий головного мозга: ишемический инсульт и другие клинические проявления. М.: Изд-во «Вако», 2013; 208 с.
2. Robertson JJ, Koyfman A. Cervical artery dissection: a review. J Emerg Med. 2016; 51 (5): 508–18. PubMed PMID: 27634674.
3. Hakimi R, Sivakumar S. Imaging of Carotid Dissection. Curr Pain Headache Rep. 2019; 23 (1): 2. PubMed PMID: 30661121.
4. Калашникова Л. А., Добрынина Л. А., Древал М. В., Доронина Е. В., Назарова М. А. Шейная и головная боль как

единственное проявление диссекции внутренней сонной и позвоночной артерий. Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2015; (3): 9–16. PubMed PMID: 24300790.

5. Débette S. Pathophysiology and risk factors for cervical artery dissection: what have we learned from large hospital-based cohorts? Curr Opin Neurol 2014; (1): 20–8. PubMed PMID: 24300790.
6. von Babo M, De Marchis GM, Sarikaya H, Stapf C, Buffon F, Fischer U, et al. Differences and similarities between spontaneous



- dissections of the internal carotid artery and the vertebral artery. *Stroke*. 2013; 44 (6): 1537–42. PubMed PMID: 23632978.
7. DeBette S, Grond-Ginsbach C, Bodenart M, Kloss M, Engelter S, Metso, et al. Differential features of carotid and vertebral artery dissections: the CADISP study. *Neurology*. 2011; 77 (12): 1174–81. PubMed PMID: 21900632.
  8. Brandt T, Hausser I, Orberk E, Grau A, Hartschuh W, Anton-Lamprecht I, et al. Ultrastructural connective tissue abnormalities in patients with spontaneous cervicocerebral artery dissections. *Ann Neurol*. 1998; (44): 281–285. PubMed PMID: 9708556.
  9. Giossi A, Ritelli M, Costa P, Morotti A, Poli L, Del Zotto E, et al. Connective tissue anomalies in patients with spontaneous cervical artery dissection. *Neurology*. 2014; 83 (22): 2032–7. PubMed PMID: 25355826.
  10. Grond-Ginsbach C, Thomas-Feles C, Werner I, Weber R, Wigger F, Hausser I, et al. Mutations in the tropoelastin gene (ELN) were not found in patients with spontaneous cervical artery dissections. *Stroke*. 2000; 31 (8): 1935–8. PubMed PMID: 10926960.
  11. Grond-Ginsbach C, Weber R, Haas J, Orberk E, Kunz S., Busse O, et al. Mutations in the COL5A1 coding sequence are not common in patients with spontaneous cervical artery dissections. *Stroke*. 1999; 30 (9):1887–90. PubMed PMID: 10471441.
  12. Lehtonen JM, Forsström S, Bottani E, Viscomi C, Baris OR, Isoniemi H, et al. FGF 21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology*. 2016; 87 (22): 2290–9. PubMed PMID: 27794108.
  13. Калашникова Л. А., Гулевская Т. С., Ануфриев П. Л., Гнедовская Е. В., Коновалов Р. Н., Пирадов М. А. Ишемический инсульт в молодом возрасте, обусловленный стенозирующим расслоением (диссекцией) интракраниального отдела внутренней сонной артерии и ее ветвей (клинико-морфологическое наблюдение). *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2009; 3 (1): 18–24.
  14. Anderson RM, Schechter MM. A case of spontaneous dissecting aneurysm of the internal carotid artery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1959; (22): 195–201. PMID: 13793447.
  15. Southerland AM, Meschia JF, Worrall BB. Shared associations of nonatherosclerotic, large-vessel, cerebrovascular arteriopathies: considering intracranial aneurysms, cervical artery dissection, moyamoya disease and fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Neurol*. 2013; (26): 13–28. PubMed PMID: 23302803.
  16. Калашникова Л. А., Чайковская Р. П., Гулевская Т. С., Добрынина Л. А., Губанова М. В., Древал М. В., Максимова М. Ю. Разрыв интимы при дисплазии стенки средней мозговой артерии, осложнившийся тромбозом и развитием тяжелого ишемического инсульта (клинико-морфологическое наблюдение). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2018; 118 (3): 9–14. PubMed PMID: 29798974.
  17. Gomik HL, Persu A, Adlam D, Aparicio LS, Azizi M, Boulanger M, et al. First International Consensus on the diagnosis and management of fibromuscular dysplasia. *Vascular Medicine*. 2019; 24 (2): 164–89. PubMed PMID: 306448921.
  18. De Giuli V, Grassi M, Lodigiani C, Patella R, Zedde M, Gandolfo C, et al. Association between migraine and cervical artery dissection: the Italian project on stroke in young adults. *JAMA Neurol*. 2017; 74 (5) 512–18. PubMed PMID: 28264095.
  19. Schievink WI, Mokri B, Piepgras DG, Kuiper JD. Recurrent spontaneous artery dissections. Risk in familial versus nonfamilial disease. *Stroke*. 1996; 27 (4): 622–4. PubMed PMID: 8614918.
  20. Kiando SR, Tucker NR, Castro-Vega LJ, Katz A, D'Escamard V, Tréard C, et al. PHACTR1 is a genetic susceptibility locus for fibromuscular dysplasia supporting its complex genetic pattern of inheritance. *PLOS Genet*. 2016; 12 (10): e1006367. PubMed PMID: 27792790.
  21. DeBette S, Kamatani Y, Metso TM, Kloss M, Chauhan G, Engelter ST, et al. Common variation in PHACTR1 is associated with susceptibility to cervical artery dissection. *Nat Genet*. 2015; 47 (1): 78–83. PubMed PMID: 25420145.
  22. Губанова М. В., Калашникова Л. А., Добрынина Л. А., Шамтиева К. В., Бердалин А. Б. Маркеры дисплазии соединительной ткани при диссекции магистральных артерий головы и провоцирующие факторы диссекции. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2017; 11 (4): 19–28. DOI: 10.18454/ACEN.2017.4.2.
  23. Hausser I, Muller U, Engelter S, Lyrer P, Pezzini A, Padovani A, et al. Different types of connective tissue alterations associated with cervical artery dissections. *Acta Neuropathol*. 2004; 107 (6): 509–14. PubMed PMID: 15067552.
  24. Сахарова А. В., Калашникова Л. А., Чайковская Р. П., Добрынина Л. А., Мир-Касимов М. Ф. Назарова М. А. и др. Морфологические и ультраструктурные признаки митохондриальной цитопатии в скелетных мышцах и микрососудах мышц и кожи при диссекции церебральных артерий, ассоциированной с мутацией A3243G в митохондриальной ДНК. *Архив патологии*. 2012; 74 (2): 51–6.
  25. Ganesh SK, Morissette R, Xu Z, Schoenhoff F, Griswold BF, Yang J, et al. Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- $\beta$  expression and connective tissue features. *FASEB J*. 2014; 28 (8): 3313–24. PubMed PMID: 24732132.
  26. Grond-Ginsbach C, Giossi A, Aksay SS, Engelter ST, Lyrer PA, Metso TM, et al. Elevated peripheral leukocyte counts in acute cervical artery dissection. *Eur J Neurol*. 2013; 20 (10):1405–10. PubMed PMID: 23879551.
  27. Guillon B, Berthet K, Benslamia L, Bertrand M, Bousser MG, Tzourio C. Infection and the risk of spontaneous cervical artery dissection: a case-control study. *Stroke*. 2003; 34 (7): 79–81. PubMed PMID: 12805497.
  28. Schievink WI, Wijdicks EF, Kuiper JD. Seasonal pattern of spontaneous cervical artery dissection. *J Neurosurg*. 1998; 89 (1): 101–3. PubMed PMID: 9647179.
  29. Kloss M, Metso A, Pezzini A, Leys D, Giroud M, Metso TM, et al. Towards understanding seasonal variability in cervical artery dissection (CeAD). *J Neurol*. 2012; 259 (8):1662–7. PubMed PMID: 22286657.
  30. Schievink WI, Mokri B, O'Fallon WM. Recurrent spontaneous cervical-artery dissection. *N Engl J Med*. 1994; 330 (6): 393–7. PubMed PMID: 8284004.

## References

1. Kalashnikova LA, Dobrynina LA. Dissekciya arterij golovnog mozga: ishemicheskij insul't i drugie klinicheskie proyavleniya. M.: Izd-vo «Vako», 2013; 208 s. Russian.
2. Robertson JJ, Koyfman A. Cervical artery dissection: a review. *J Emerg Med*. 2016; 51 (5): 508–18. PubMed PMID: 27634674.
3. Hakimi R, Sivakumar S. Imaging of Carotid Dissection. *Curr Pain Headache Rep*. 2019; 23 (1): 2. PubMed PMID: 30661121.
4. Kalashnikova LA, Dobrynina LA, Dreval MV, Doronina EV, Nazarova MA. Shejnaya i golovnaya bol' kak edinstvennoe proyavlenie dissekci vnutrennej sonnoj i pozvonochnoj arterij. *Zhurnal neurologii i psichiatrii im. Korsakova*. 2015; (3): 9–16. PubMed PMID: 24300790. Russian.
5. Débette S. Pathophysiology and risk factors for cervical artery dissection: what have we learned from large hospital-based cohorts? *Curr Opin Neurol*. 2014; (1): 20–8. PubMed PMID: 24300790.
6. von Babo M, De Marchis GM, Sarikaya H, Stapf C, Buffon F, Fischer U, et al. Differences and similarities between spontaneous dissections of the internal carotid artery and the vertebral artery. *Stroke*. 2013; 44 (6): 1537–42. PubMed PMID: 23632978.
7. DeBette S, Grond-Ginsbach C, Bodenart M, Kloss M, Engelter S, Metso, et al. Differential features of carotid and vertebral artery dissections: the CADISP study. *Neurology*. 2011; 77 (12): 1174–81. PubMed PMID: 21900632.
8. Brandt T, Hausser I, Orberk E, Grau A, Hartschuh W, Anton-Lamprecht I, et al. Ultrastructural connective tissue abnormalities in patients with spontaneous cervicocerebral artery dissections. *Ann Neurol*. 1998; (44): 281–285. PubMed PMID: 9708556.

9. Giossi A, Ritelli M, Costa P, Morotti A, Poli L, Del Zotto E, et al. Connective tissue anomalies in patients with spontaneous cervical artery dissection. *Neurology*. 2014; 83 (22): 2032–7. PubMed PMID: 25355826.
10. Grond-Ginsbach C, Thomas-Feles C, Werner I, Weber R, Wigger F, Hausser I, et al. Mutations in the tropoelastin gene (ELN) were not found in patients with spontaneous cervical artery dissections. *Stroke*. 2000; 31 (8): 1935–8. PubMed PMID: 10926960.
11. Grond-Ginsbach C, Weber R, Haas J, Orberk E, Kunz S., Busse O, et al. Mutations in the COL5A1 coding sequence are not common in patients with spontaneous cervical artery dissections. *Stroke*. 1999; 30 (9):1887–90. PubMed PMID: 10471441.
12. Lehtonen JM, Forsström S, Bottani E, Viscomi C, Baris OR, Isoniemi H, et al. FGF 21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology*. 2016; 87 (22): 2290–9. PubMed PMID: 27794108.
13. Kalashnikova LA, Gulevskaya TS, Anufriev PL, Gnedovskaja EV, Kononov RN, Piradov MA. Ischemic stroke in young age due to dissection of intracranial carotid artery and its branches (clinical and morphological study). *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2009; 3 (1): 18–24. Russian.
14. Anderson RM, Schechter MM. A case of spontaneous dissecting aneurysm of the internal carotid artery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1959; (22): 195–201. PMID: 13793447.
15. Southerland AM, Meschia JF, Worrall BB. Shared associations of nonatherosclerotic, large-vessel, cerebrovascular arteriopathies: considering intracranial aneurysms, cervical artery dissection, moyamoya disease and fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Neurol*. 2013; (26): 13–28. PubMed PMID: 23302803.
16. Kalashnikova LA, Chaykovskaya RP, Gulevskaya TS, Dobrynina LA, Gubanov MV, Dreval MV, et al. Intimal rupture of the displastic middle cerebral artery wall complicated by thrombosis and fatal ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2018; 118 (3): 9–14. PubMed PMID: 29798974. Russian.
17. Gornik HL, Persu A, Adlam D, Aparicio LS, Azizi M, Boulanger M, et al. First International Consensus on the diagnosis and management of fibromuscular dysplasia. *Vascular Medicine*. 2019; 24 (2): 164–89. PubMed PMID: 306448921.
18. De Giuli V, Grassi M, Lodigiani C, Patella R, Zedde M, Gandolfo C, et al. Association between migraine and cervical artery dissection: the Italian project on stroke in young adults. *JAMA Neurol*. 2017; 74 (5) 512–18. PubMed PMID: 28264095.
19. Schievink WI, Mokri B, Piepgras DG, Kuiper JD. Recurrent spontaneous artery dissections. Risk in familial versus nonfamilial disease. *Stroke*. 1996; 27 (4): 622–4. PubMed PMID: 8614918.
20. Kiando SR, Tucker NR, Castro-Vega LJ, Katz A, D'Escamard V, Tréard C, et al. PHACTR1 is a genetic susceptibility locus for fibromuscular dysplasia supporting its complex genetic pattern of inheritance. *PLOS Genet*. 2016; 12 (10): e1006367. PubMed PMID: 27792790.
21. Debette S, Kamatani Y, Metso TM, Kloss M, Chauhan G, Engelter ST, et al. Common variation in PHACTR1 is associated with susceptibility to cervical artery dissection. *Nat Genet*. 2015; 47 (1): 78–83. PubMed PMID: 25420145.
22. Gubanov MV, Kalashnikova LA, Dobrynina LA, Shamtieva KV, Berdalin AB. Markery displazii soedinitel'noj tkani pri dissekcii magistral'nyh arterij golovy i provocirovushhie faktory dissekcii. *Annaly klinicheskoy i jeksperimental'noj nevrologii*. 2017; 11 (4): 19–28. DOI: 10.18454/ACEN.2017.4.2. Russian.
23. Hausser I, Muller U, Engelter S, Lyrer P, Pezzini A, Padovani A, et al. Different types of connective tissue alterations associated with cervical artery dissections. *Acta Neuropathol*. 2004; 107 (6): 509–14. PubMed PMID: 15067552.
24. Sakharova AV, Kalashnikova LA, Dobrynina LA, Chaykovskaya RP, Mir-Kasimov MF, Nazarova MA, et al. Morphological signs of mitochondrial cytopathy in skeletal muscles and micro-vessels in a patient with cerebral artery dissection associated with MELAS syndrome. *Arkhiv patologii*. 2010; 74 (2): 51–6. Russian.
25. Ganesh SK, Morissette R, Xu Z, Schoenhoff F, Griswold BF, Yang J, et al. Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- $\beta$  expression and connective tissue features. *FASEB J*. 2014; 28 (8): 3313–24. PubMed PMID: 24732132.
26. Grond-Ginsbach C, Giossi A, Aksay SS, Engelter ST, Lyrer PA, Metso TM, et al. Elevated peripheral leukocyte counts in acute cervical artery dissection. *Eur J Neurol*. 2013; 20 (10):1405–10. PubMed PMID: 23879551.
27. Guillon B, Berthet K, Benslamia L, Bertrand M, Bousser MG, Tzourio C. Infection and the risk of spontaneous cervical artery dissection: a case-control study. *Stroke*. 2003; 34 (7): 79–81. PubMed PMID: 12805497.
28. Schievink WI, Wijdicks EF, Kuiper JD. Seasonal pattern of spontaneous cervical artery dissection. *J Neurosurg*. 1998; 89 (1): 101–3. PubMed PMID: 9647179.
29. Kloss M, Metso A, Pezzini A, Leys D, Giroud M, Metso TM, et al. Towards understanding seasonal variability in cervical artery dissection (CeAD). *J Neurol*. 2012; 259 (8):1662–7. PubMed PMID: 22286657.
30. Schievink WI, Mokri B, O'Fallon WM. Recurrent spontaneous cervical-artery dissection. *N Engl J Med*. 1994; 330 (6): 393–7. PubMed PMID: 8284004.

## ПРОТРОМБОГЕННЫЕ ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ФОЛАТНОГО ОБМЕНА ПРИ АСЕПТИЧЕСКОМ ТРОМБОЗЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ВЕНОЗНЫХ СИНУСОВ

М. Ю. Максимова , Ю. И. Дубовицкая, М. В. Кротенкова, А. А. Шабалина

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Тромбоз церебральных венозных синусов (ТЦВС) составляет менее 1% всех случаев инсульта. В 20–30% случаев причина тромбоза остается неясной и его расценивают как идиопатический. Врожденные гиперкоагуляционные состояния значительно увеличивают риск развития ТЦВС. Целью исследования было оценить частоту аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза и метионин-гомоцистеинового обмена при асептическом ТЦВС. Обследован 51 пациент с асептическим ТЦВС в возрасте от 18 до 75 лет. Контрольную группу составили 36 здоровых добровольцев. Нейровизуализационные методы включали МРТ головного мозга в стандартных режимах (T1, T2, T2 d-f (FLAIR), ДВИ) и МР-веносинусографию. Всем пациентам проводили исследование на носительство аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов системы гемостаза и фолатного обмена. Протромбогенные полиморфные варианты генов системы гемостаза были выявлены в 94% случаев, генов метионин-гомоцистеинового обмена — в 86% случаев. Получены достоверные различия при исследовании распределения аллелей и генотипов 5G6754G гена *PAI-1*, G103T гена *FXIII A1*, A66G гена *MTRR*, A2756G гена *MTR* в группе больных ТЦВС по сравнению с группой здоровых добровольцев. Аллель 4G, генотипы 4G/4G и 5G/4G полиморфизма 5G6754G гена *PAI-1*; аллель Т полиморфизма G103T гена *FXIII A1*; аллель G и генотип A/G полиморфизма A66G гена *MTRR*; аллель G и генотип A/G полиморфизма A2756G гена *MTR* связаны с развитием асептического ТЦВС. Сделан вывод, что носительство полиморфизма генов *PAI-1* (5G6754G), *FXIII A1* (G103T), *MTRR* (A66G) и *MTR* (A2756G) повышает риск развития асептического ТЦВС и не влияет на клинические проявления тромбоза.

**Ключевые слова:** асептический тромбоз церебральных венозных синусов, протромбогенные полиморфные варианты генов гемостаза и фолатного обмена

**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ НЦН.

**Информация о вкладе авторов:** М. Ю. Максимова — разработка концепции и организация исследования, обобщающий анализ клинических и лабораторных данных, статистическая обработка, написание статьи; Ю. И. Дубовицкая — проведение клинического обследования пациентов, сбор и первичный анализ полученных результатов; М. В. Кротенкова — проведение МРТ головного мозга, МР-веносинусографии и нейровизуализационной диагностики тромбоза церебральных венозных синусов; А. А. Шабалина — проведение лабораторного исследования протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза и фолатного обмена.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 12–8/16 от 14 декабря 2016 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Марина Юрьевна Максимова  
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367; ncnmaximova@mail.ru

**Статья получена:** 19.08.2019 **Статья принята к печати:** 06.10.2019 **Опубликована онлайн:** 16.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.065

## PROTHROMBOGENIC POLYMORPHIC VARIANTS OF HEMOSTATIC AND FOLATE METABOLISM GENES IN PATIENTS WITH ASEPTIC CEREBRAL VENOUS THROMBOSIS

Maksimova MYu , Dubovitskaya Yul, Krotchenkova MV, Shabalina AA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Cerebral venous sinus thrombosis (CVT) becomes the cause of stroke in less than 1% of patients. In 20–30% of patients, the cause of thrombosis remains unclear, and thrombosis is considered idiopathic. Inherited hypercoagulable conditions significantly increase the risk of CVT. The aim of the study was to evaluate the frequency of prothrombotic polymorphic variants of hemostatic and methionine-homocysteine metabolism genes alleles and genotypes in patients with aseptic CVT. Fifty one patients aged 18–75 with aseptic CVT were examined. The control group included 36 healthy volunteers. Neuroimaging methods included brain MRI in standard modes (T1, T2, T2 d-f (FLAIR), DWI) and MR venosinusography. All patients were surveyed to identify carriers of prothrombotic polymorphic variants of hemostatic and folate metabolism genes alleles and genotypes. Prothrombotic polymorphic variants of hemostatic genes were detected in 94% of patients, and the variants of the methionine-homocysteine metabolism genes were observed in 86% of patients. The differences between distributions of alleles and genotypes 5G6754G of the *PAI-1* gene, G103T of the *FXIII A1* gene, A66G of the *MTRR* gene, A2756G of the *MTR* gene in the group of patients with CVT and in the control group were significant. Allele 4G, genotypes 4G/4G and 5G/4G of 5G6754G polymorphism of the *PAI-1* gene; allele T of G103T polymorphism of the *FXIII A1* gene; allele G and genotype A/G of A66G polymorphism of the *MTRR* gene; allele G and genotype A/G of A2756G polymorphism of the *MTR* gene correlated with aseptic CVT. It was concluded that the gene polymorphisms 5G6754G (*PAI-1*), G103T (*FXIII A1*), A66G (*MTRR*) and A2756G (*MTR*) carriage increased the risk of aseptic CVT and did not affect the thrombosis clinical manifestations.

**Keywords:** aseptic cerebral venous sinus thrombosis, prothrombotic polymorphic variants of hemostatic and folate metabolism genes

**Funding:** the study was performed as a part of the public assignment of the Research Center of Neurology.

**Author contribution:** Maksimova MYu — concept development and study arrangement, clinical and laboratory data analysis, statistical analysis, manuscript writing; Dubovitskaya Yul — clinical examination of patients, data acquisition and primary analysis of the results; Krotchenkova MV — brain MRI, MR venography and neuroimaging diagnosis of cerebral venous sinus thrombosis; Shabalina AA — laboratory analysis of prothrombotic polymorphic variants of hemostatic and folate metabolism genes.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol № 12–8/16 dated December 14, 2016). All patients submitted the informed consent to participation in the study.

 **Correspondence should be addressed:** Marina Yu. Maximova  
Volokolamskoye Shosse, 80, Moscow, 125367; ncnmaximova@mail.ru

**Received:** 19.08.2019 **Accepted:** 06.10.2019 **Published online:** 16.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.065

Тромбоз церебральных венозных синусов (ТЦВС) составляет менее 1% всех случаев инсульта [1, 2]. В 20–30% случаев причина тромбоза остается неясной и его расценивают как идиопатический [3]. Врожденные гиперкоагуляционные состояния значительно увеличивают риск развития ТЦВС [4, 5].

Частота тромбоза церебральных венозных синусов (ТЦВС) составляет 1,3 случая на 100 000 взрослого населения в год. Заболевание возможно в любом возрасте, однако наиболее высокую заболеваемость отмечают у лиц 31–50 лет [6]. Среди пациентов преобладают женщины [7]. Летальность при ТЦВС, несмотря на улучшение методов диагностики и лечения, остается высокой и достигает 30% [8].

ТЦВС может иметь либо септический характер (в результате осложнения гнойного отита, мастоидита, синусита), либо асептический (возникает как осложнение многочисленных заболеваний, усиливающих склонность к образованию тромба).

В развитии асептического ТЦВС участвуют многие факторы — тяжелая дегидратация, заболевания сердца (врожденные пороки сердца, сердечная недостаточность, искусственный водитель ритма), злокачественные новообразования, беременность, сахарный диабет, использование гормональных средств (контрацептивов, заместительной гормональной терапии), нефротический синдром, полицитемия, эссенциальный тромбоцитоз, антифосфолипидный синдром, заболевания соединительной ткани и васкулиты (системная красная волчанка, гранулематоз Вегенера, височный артериит, болезнь Бехчета), воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, язвенный колит), черепно-мозговая травма, приобретенные и наследственные нарушения гемостаза [9–12].

Наследственные тромбофилии — значимый фактор риска развития асептического ТЦВС. Наиболее изучены среди них полиморфные варианты генов фактора V (Лейдена) и протромбина [13]. Так, была установлена связь риска развития ТЦВС с полиморфизмами генов фактора свертывания крови V (ОШ 4,3; 95% ДИ — 1,5–12,3) и протромбина (ОШ 3,6; 95% ДИ — 1,0–13,1) [14]. В другом исследовании полиморфизм гена протромбина (замена А на G в позиции 20210) обнаружен в 19% случаев ТЦВС [15]. Установлена связь носительства Лейденской мутации с 5-кратным повышением риска развития ТЦВС [13]. На основании анализа 26 исследований по типу случай–контроль было обнаружено, что возникновение полиморфизма гена фактора свертывания крови V (Leiden/G1691A) увеличивает риск развития ТЦВС в 2,4 раза (95% ДИ — 1,75–3,30;  $p < 0,00001$ ), а полиморфизма гена протромбина (G20210A) — в 5,48 раз (95% ДИ — 3,88–7,74;  $p < 0,00001$ ) [16].

Значительный полиморфизм клинических проявлений, отсутствие патогномичных симптомов, а также разнообразие вариантов начала, течения и локализаций тромбоза создают трудности для клинического распознавания ТЦВС. Существенно расширяют и дополняют возможность ранней диагностики ТЦВС методы нейровизуализации (КТ и МРТ) [2, 17, 18]. В настоящее время МР-веносинография относится к наиболее надежным и достоверным методам диагностики ТЦВС [19]. До 63% случаев ТЦВС осложнены развитием отека мозга и образованием очагов некроза с присоединением в 37,57% случаев геморрагического компонента [20]. В такой ситуации указанные очаги некроза не являются инфарктами, а возникают вследствие замедления венозного оттока, отека, гипоксии ткани мозга с

последующим диапедезом эритроцитов и лейкоцитов через некротизированные стенки капилляров и микрососудов. К факторам, предрасполагающим к возникновению очагов некроза и гематом при ТЦВС, относят женский пол, эпилептический припадок, нарушение сознания, быстро распространяющийся тромбоз с вовлечением двух и более венозных синусов [2, 8, 20].

Нередко ТЦВС протекает стерто и обнаруживается неожиданно для лечащего врача при проведении КТ или МРТ головного мозга. Для большинства случаев ТЦВС характерно несоответствие общего состояния пациента и нейровизуализационных проявлений заболевания [17, 21].

Ранняя диагностика и правильно организованное лечение асептического ТЦВС у подавляющего большинства пациентов может привести к клиническому выздоровлению. В дальнейшем снижение частоты повторного тромбоза зависит от своевременного выявления причины его развития. Почти все исследователи, изучавшие данную проблему, согласны с тем, что повторный ТЦВС протекает тяжелее, чем впервые диагностированный, и прогноз его значительно хуже.

Целью исследования было оценить частоту аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза и метионин-гомоцистеинового обмена при асептическом ТЦВС.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В течение 2016–2019 гг. в Научном центре неврологии был обследован 51 больной с асептическим ТЦВС (20 мужчин и 31 женщина, средний возраст пациентов составил  $42,2 \pm 13,1$  года). 28 больных были госпитализированы в остром периоде заболевания, у 23 больных давность тромбоза составляла от 1 до 10 месяцев. В контрольную группу вошли 36 здоровых добровольцев (14 мужчин и 22 женщины; средний возраст —  $44,7 \pm 10,4$ ). Исследуемые группы были сопоставимы по полу и возрасту. Критерии включения пациентов в исследование: 1) наличие острого асептического ТЦВС, подтвержденного данными нейровизуализации; 2) наличие перенесенного ранее асептического ТЦВС, подтвержденного данными нейровизуализации; 3) возраст пациентов от 18 лет до 75 лет. Критерии исключения пациентов из исследования: 1) септический характер ТЦВС; 2) тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбозомболия легочного ствола и легочных артерий; 3) атеротромбоз мозговых артерий, артерий нижних конечностей; 4) другие (несосудистые) заболевания нервной системы; 5) сопутствующие соматические заболевания в стадии декомпенсации.

У всех пациентов с ТЦВС проводили детальное изучение жалоб, данных общего и семейного анамнеза, клинической картины заболевания и медицинской документации, оценивали общесоматический и неврологический статусы.

Для диагностики ТЦВС каждому пациенту проводили МРТ головного мозга на аппаратах Magnetom Verio (Siemens; Германия), Magnetom Symphony (Siemens; Германия) с величиной магнитной индукции 3 и 1,5 Тесла соответственно. МРТ головного мозга выполняли в сагитальной, аксиальной и коронарной плоскостях в T1, T2, T2 d-f (FLAIR), ДВИ режимах с толщиной среза 1, 3 и 5 мм. Затем МРТ проводили в режиме веносинографии, с помощью которого были получены изображения мозговых вен и венозных синусов. Только после комплексной оценки и детального изучения соответствия результатов нейровизуализационных исследований в стандартных



режимах и МР-веносинографию диагноз ТЦВС считали подтвержденным. Стандартные режимы T2, T2-FLAIR проводили для оценки очаговых изменений ткани мозга и исключения другой возможной патологии. Изображения оценивали с помощью программы для работы с медицинскими изображениями eFilm Workstation (Merge Healthcare; США).

Исследование показателей гемостаза (уровней фибриногена, фибринолитической активности, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)) проводили на автоматическом коагулометре ACL-9000 (Instrumentation Laboratory; США).

Количественное определение Д-димеров осуществляли иммунохимическим методом, основанным на реакции специфического взаимодействия антиген-антитело, с использованием иммунотурбидиметрического латексного теста (Instrumentation Laboratory; США).

Уровень гомоцистеина в крови определяли иммуноферментным методом с помощью диагностических наборов (AXIS; Норвегия) на иммунохемилюминесцентном анализаторе Immulite 2000 (Siemens; США).

ДНК-диагностику протромботических полиморфных вариантов генов проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека использовали комплект реагентов компании «ДНК-технология» (Россия). Геномную ДНК пациента выделяли из цельной крови (пробирка с ЭДТА) с использованием реагентов для выделения ДНК (проба-НК) (ДНК-технология; Россия).

С образцом выделенной ДНК одновременно проводили две реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Для одновременной амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК применяли модификацию ПЦР в режиме «реального времени» (амплификатор Real-time ДТ-Лайт; ДНК-технология; Россия). Результаты анализа были представлены тремя типами заключений: а) гомозигота по аллели 1; б) гетерозигота; в) гомозигота по аллели 2.

Перечень исследованных протромбогенных полиморфных вариантов генов системы гемостаза и фолатного обмена:

- ген протромбина — *FII* (с.G20210A);
- ген фактора свертывания крови V — *FV* (с.G1691A);
- ген фактора свертывания крови VII — *FVII* (с.G10976A);
- ген активированного фактора XIII (фибриназа) *FXIII A1* (с.G103T);
- ген фибриногена бета — *FGB* (с.G455A);
- ген ингибитора активатора плазминогена — *PAI-1* (с.5G6754G);
- ген интегрин альфа (гликопротеина Gp1a) — *ITGA2* (с.C807T);
- ген тромбоцитарного рецептора фибриногена (гликопротеина Gp3a) — *ITGB3* (с.T1565C);
- ген метилентетрагидрофолатредуктазы — *MTHFR* (с.C677T);
- ген метилентетрагидрофолатредуктазы — *MTHFR* (с.A1298C);
- ген метионинсинтазы — *MTR* (с.A2756G);
- ген метионинсинтазы редуктазы — *MTRR* (с.A66G).

Статистический анализ проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics v.23 (IBM Corporation; Россия). Номинальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для анализа категориальных переменных использовали частотный

анализ с построением таблиц сопряженности. Уровень значимости принимали равным 0,05 во всех сравнениях.

Частоту вариантов аллелей и генотипов ( $f$ ) вычисляли по формуле:

$$f = \frac{n}{2N} \text{ — частота появления аллелей,}$$

$$f = \frac{n}{N} \text{ — частота появления генотипов,}$$

где  $n$  — встречаемость вариантов (аллеля или генотипа),  $N$  — объем выборки.

Достоверность различия частот появления аллелей и генотипов в исследуемых группах оценивали с использованием критерия  $\chi^2$ .

Для оценки величины относительного риска использовали расчет отношения шансов (ОШ) и его доверительный интервал (ДИ) при уровне доверия 95%.

$$ОШ = \frac{(a + d)}{(b + c)},$$

где  $a$  — частота появления исследуемого аллеля (генотипа) в основной группе;  $b$  — частота появления аллеля в группе контроля;  $c$  — сумма частот появления остальных аллелей (генотипов) в основной группе;  $d$  — сумма частот появления остальных аллелей (генотипов) в группе контроля.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изолированный ТЦВС выявлен в 14 случаях (27,5%). В остальных 37 случаях (72,5%) был обнаружен множественный тромбоз с вовлечением двух и более венозных синусов.

Тромбоз левого поперечного синуса был выявлен у 28 пациентов (54,9%), левого сигмовидного синуса — у 26 (51%), правого поперечного синуса — у 21 (41,2%), правого сигмовидного синуса — у 14 (27,5%), верхнего сагиттального синуса — у 11 (21,6%), нижнего сагиттального синуса — у 4 (7,8%), прямого синуса — у 3 (5,9%), левого кавернозного синуса — у 1 пациента.

Среди пациентов с тромбозом отдельных венозных синусов у 5 человек (35,7%) диагностирован тромбоз левого поперечного синуса, у 5 (35,7%) — тромбоз левого сигмовидного синуса, у 3 (21,4%) — тромбоз правого поперечного синуса, у 1 пациента — тромбоз верхнего сагиттального синуса.

У 4 женщин ТЦВС развился на фоне прерывания беременности, у 1 — через 9 дней после родов, у 7 (22,6%) — на фоне приема гормональных препаратов (контрацептивов). Воспалительные заболевания околоносовых пазух в анамнезе наблюдали у 3 женщин и 1 мужчины. Асептический характер ТЦВС был подтвержден отсутствием системных воспалительных реакций и воспалительных изменений лабораторных показателей крови.

Среди всех пациентов с ТЦВС у 14 (27,5%) наблюдали очаговые некротические изменения в ткани мозга, обусловленные развитием тромбоза.

Основной жалобой была диффузная головная боль — у 45 пациентов (88,2%). Весьма характерной особенностью головной боли оказалось ее усиление после пребывания в горизонтальном положении. Несистемное головокружение отмечено у 27,5% пациентов, оно было постоянным, не зависящим от положения тела.



Тошнота возникала у 23,5% пациентов. У 7 пациентов (13,7%) тромбоз начинался с нарушения сознания. Судорожные припадки наблюдались у 5 пациентов (9,8%): в 2 случаях — фокальные двигательные приступы, в 3 случаях — генерализованные тонико-клонические припадки. У 9,8% пациентов возникали менингеальные симптомы. Двигательные нарушения выявлены у 3 пациентов (5,9%): в одном случае — гемиплегия, в 2 случаях — легкое или умеренное снижение мышечной силы в конечностях. Речевые нарушения были представлены моторной афазией легкой степени выраженности у 4 (7,8%) пациентов.

При расчете коэффициентов корреляции обнаружена взаимосвязь между очаговыми изменениями ткани мозга и развитием судорожных припадков (коэффициент корреляции  $r = 0,4$ ;  $p < 0,01$ ), двигательных нарушений (коэффициент корреляции  $r = 0,5$ ;  $p < 0,01$ ), речевых нарушений (коэффициент корреляции  $r = 0,5$ ;  $p < 0,01$ ) и угнетением сознания (коэффициент корреляции  $r = 0,5$ ;  $p < 0,01$ ).

Статистический анализ выявил взаимосвязь тромбоза верхнего сагиттального синуса с развитием судорожного припадка (коэффициент корреляции  $r = 0,4$ ;  $p < 0,01$ ) и нарушением оттока венозной крови (коэффициент корреляции  $r = 0,5$ ;  $p < 0,01$ ), тромбоза прямого синуса с угнетением сознания (коэффициент корреляции  $r = 0,3$ ;  $p < 0,01$ ).

#### Показатели гемостаза

В группе больных с ТЦВС уровень фибриногена составил 3,7 г/л [2,2; 6,8] (в контрольной группе — 3,8 г/л [2,9; 5,0]); активированное частичное тромбопластиновое время — 29,5 с [22,5; 36,2] (в контрольной группе 28,7 с [26,5; 29,9]); уровень антитромбина III — 112 [98; 119] (в контрольной группе — 115 [107; 126]); уровень протеина С — 134% [125; 148] (в контрольной группе — 143% [125; 165]); D-димер не превышал 0,5 мкг/мл. Повышение фибриногена более 5,5 ммоль/л выявлено в одном случае ТЦВС. Показатели гемостаза при ТЦВС статистически значимо не отличались от показателей контрольной группы.

Уровень гомоцистеина в плазме крови при ТЦВС составил 16,2 мкмоль/л [14,6; 17,7] (в контрольной группе — 7,7 [5,6; 10,9];  $p < 0,05$ ).

#### Протромбогенные полиморфные варианты генов гемостаза и фолатного обмена

Проведено молекулярно-генетическое тестирование на выявление протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза (табл. 1) и метионин-гомоцистеинового обмена (табл. 2) у 51 больного с асептическим ТЦВС.

В гомозиготном состоянии (4G/4G) аллель 4G в –675 положении гена *PAI-1* обнаружили в 11 случаях (22,4%). Аллель 103T гена *FXIII A1* обнаружили в гомозиготном состоянии у 3 пациентов и аллель 807T гена *ITGA2* — у 3 пациентов. Гомозиготное носительство аллеля 455A гена *FGB* выявлено у 2 пациентов, аллеля 10976A гена *FVII* — у 1 пациента, аллеля 1565C гена *ITGB3* — у 1 пациента. Сочетание двух аллелей в гомозиготном состоянии обнаружено в 2 случаях. В одном случае наблюдали сочетание гомозиготного носительства аллеля 10976A гена *FVII* и аллеля 6754G гена ингибитора активатора плазминогена *PAI-1*, в другом — сочетание гомозиготного носительства аллеля 103T гена *FXIII A1* и аллеля 6754G гена

ингибитора активатора плазминогена *PAI-1*. Гомозиготное носительство аллеля 1691A гена *FV Leiden* и аллеля 20210A гена *FII* не выявлено ни в одном случае.

Аллель 4G в –675 положении гена *PAI-1* обнаружили в гетерозиготном варианте у 28 (57,1%) пациентов. Изолированный полиморфный вариант гена *PAI-1* (с. 5G6754G) в гетерозиготном состоянии наблюдали у 9 (19%) пациентов. Гетерозиготное носительство аллеля 455A гена *FGB* выявлено в 17 (34,7%) случаях; аллелей 10976A гена *FVII*, 103T гена *FXIII A1*, 1565C гена *ITGB3* — в 13 (26,5%) случаях соответственно. Полиморфный вариант 807T гена *ITGA2* в гетерозиготном состоянии установлен в 9 (18,4%) случаях. Полиморфный вариант 1691A гена *FV Leiden* в гетерозиготном состоянии был обнаружен у 3 (5,9%) пациентов. Гетерозиготное носительство аллеля 20210A гена *FII* встречалось в 2 (4%) случаях.

Распределение частот аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза представлено в табл. 1.

Частота аллелей 5G и 4G гена *PAI-1* составила 48 (49%) и 50 (51%) — среди пациентов основной группы и 59 (82%) и 13 (18%) — среди пациентов контрольной группы. Согласно рассчитанному коэффициенту отношения шансов, аллель 4G увеличивает риск развития ТЦВС более чем в 4 раза ( $\chi^2 = 19,337$ ;  $p < 0,001$ ; ОШ = 4,728; 95% ДИ — 2,303–9,706). Носительство гомозиготного полиморфизма 4G/4G повышает риск развития ТЦВС в 10,1 раз ( $\chi^2 = 6,623$ ;  $p = 0,011$ ; ОШ = 10,132 + 1,070; 95% ДИ — 1,243–82,573), гетерозиготного полиморфизма 5G/4G — в 3,03 раза ( $\chi^2 = 5,908$ ;  $p = 0,016$ ; ОШ = 3,030 + 0,463; 95% ДИ — 1,223–7,507).

При сравнительном анализе частот аллелей полиморфизма G103T гена *FXIII A1* у пациентов основной и контрольной групп были выявлены статистически значимые различия. Частота встречаемости аллелей G и T гена *FXIII A1* составила 79 (80,6%) и 19 (19,4%) — в группе больных ТЦВС и 67 (93%) и 5 (7%) — в контрольной группе. Таким образом, частота аллеля 103T гена *FXIII A1* у больных с ТЦВС достоверно превышает таковую в группе здоровых лиц ( $\chi^2 = 5,3$ ;  $p = 0,022$ ). Согласно рассчитанному коэффициенту отношения шансов, возникновение аллеля T гена *FXIII A1* увеличивает риск развития ТЦВС более чем в 3 раза (ОШ = 3,223; 95% ДИ — 1,142–9,095).

Различий в распределении частот аллелей и генотипов генов *FII* (с.G20210A), *FV* (с.G1691A), *FVII* (с.G10976A), *FGB* (с.G455A), *ITGA2* (с.C807T), *ITGB3* (с.T1565C), *MTHFR* (с.C677T), *MTHFR* (с.A1298C) у больных с ТЦВС и здоровых добровольцев выявлено не было.

Среди пациентов с полиморфными вариантами генов метионин-гомоцистеинового обмена аллель 66G гена *MTRR* в гомозиготном состоянии выявили в 5 (10,9%) случаях. Гомозиготное носительство аллеля 677T гена *MTHFR* обнаружено в 3 (6,8%) случаях, аллеля 1298C гена *MTHFR* — в 2 (4,2%) случаях. В одном случае наблюдали сочетание гомозиготного носительства аллеля 1298C гена *MTHFR* и аллеля 66G гена *MTRR*. Гомозиготное носительство аллеля 2756G гена *MTR* не выявлено ни в одном случае.

Гетерозиготный вариант носительства аллеля 677T гена *MTHFR* выявлен у 16 (36,4%) пациентов, аллеля 66G гена *MTRR* — у 19 (41,3%), аллеля 2756G гена *MTR* у 18 (39,1%), аллеля 1298C *MTHFR* — у 9 (18,8%) пациентов.

Изолированный полиморфный вариант гена *MTRR* (с.A66G) в гетерозиготном состоянии наблюдали у 7 (17%) пациентов.

У 3 (7%) пациентов был обнаружен изолированный полиморфный вариант гена *MTR* (с.А2756G) в гетерозиготном состоянии.

Среди 19 пациентов с гетерозиготным носительством аллеля 66G гена *MTRR* у 9 (47%) пациентов также выявлен гетерозиготный вариант аллеля 1298C гена *MTHFR*.

В табл. 2 представлены показатели частот для отдельных полиморфных вариантов генов метионин-гомоцистеинового обмена.

Согласно полученным данным, частота аллелей А и G гена *MTRR* (с.А66G) в основной группе соответствовала 63 (68,5%) и 29 (31,5%). Частота этих аллелей в контрольной

Таблица 1. Частота аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов гемостаза

| Ген протромбина <i>FII</i> (с. G20210A)                                 |          |                |            |                  |            |          |
|---|----------|----------------|------------|------------------|------------|----------|
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | G              | A          | G/G              | G/A        | A/A      |
| Пациенты с ТЦВС   | 50       | 98 (98%)       | 2 (2%)     | 48 (96%)         | 2 (4%)     | 0 (0%)   |
| Контрольная группа  | 36       | 71 (99%)       | 1 (1%)     | 35 (97,2%)       | 1 (2,8%)   | 0 (0%)   |
| Ген фактора свертывания крови V — <i>FV</i> (с. G1691A)                 |          |                |            |                  |            |          |
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | G              | A          | G/G              | G/A        | A/A      |
| Пациенты с ТЦВС   | 51       | 99 (97,1%)     | 3 (2,9%)   | 48 (94,1%)       | 3 (5,9%)   | 0 (0%)   |
| Контрольная группа  | 36       | 72 (100%)      | 0 (0%)     | 36 (100%)        | 0 (0%)     | 0 (0%)   |
| Ген фактора свертывания крови VII — <i>FVII</i> (с. G10976A)            |          |                |            |                  |            |          |
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | G              | A          | G/G              | G/A        | A/A      |
| Пациенты с ТЦВС   | 49       | 83 (84,7%)     | 15 (15,3%) | 35 (71,4%)       | 13 (26,5%) | 1 (2%)   |
| Контрольная группа  | 36       | 66 (92%)       | 6 (8%)     | 30 (83,3%)       | 6 (16,7%)  | 0 (0%)   |
| Ген активированного фактора XIII (фибриназы) <i>FXIII A1</i> (с. G103T) |          |                |            |                  |            |          |
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | G*             | T**        | G/G              | G/T        | T/T      |
| Пациенты с ТЦВС   | 49       | 79 (80,6%)     | 19 (19,4%) | 33 (67,3%)       | 13 (26,5%) | 3 (6,1%) |
| Контрольная группа  | 36       | 67 (93%)       | 5 (7%)     | 31 (86,1%)       | 5 (13,9%)  | 0 (0%)   |

Примечание: \* —  $\chi^2 = 5,3$ ;  $p = 0,022$ ; ОШ = 0,310; 95% ДИ 0,110–0,876;

\*\* —  $\chi^2 = 5,3$ ;  $p = 0,022$ ; ОШ = 3,223 + 0,529; 95% ДИ 1,142–9,095.

| Ген ингибитора активатора плазминогена — <i>PAI-1</i> (с. 5G6754G) |          |                |          |                  |            |            |
|--|----------|----------------|----------|------------------|------------|------------|
|  | <i>n</i> | Частота аллеля |          | Частота генотипа |            |            |
|  |          | 5G*            | 4G**     | 5G/5G***         | 5G/4G****  | 4G/4G***** |
| Пациенты с ТЦВС  | 49       | 48 (49%)       | 50 (51%) | 10 (20,4%)       | 28 (57,1%) | 11 (22,4%) |
| Контрольная группа   | 36       | 59 (82%)       | 13 (18%) | 24 (66,7%)       | 11 (30,6%) | 1 (2,8%)   |

Примечание: \* —  $\chi^2 = 19,337$ ;  $p < 0,001$ ; ОШ = 0,212; 95% ДИ 0,103–0,434;

\*\* —  $\chi^2 = 19,337$ ;  $p < 0,001$ ; ОШ = 4,728 + 0,367; 95% ДИ 2,303–9,706;

\*\*\* —  $\chi^2 = 18,503$ ;  $p < 0,001$ ; ОШ = 0,128; 95% ДИ 0,048–0,302;

\*\*\*\* —  $\chi^2 = 5,908$ ;  $p = 0,016$ ; ОШ = 3,030 + 0,463; 95% ДИ 1,223–7,507;

\*\*\*\*\* —  $\chi^2 = 6,623$ ;  $p = 0,011$ ; ОШ = 10,132 + 1,070; 95% ДИ 1,243–82,573.

| Ген фибриногена бета — <i>FGB</i> (с. G455A)  |          |                |            |                  |            |          |
|---|----------|----------------|------------|------------------|------------|----------|
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | G              | A          | G/G              | G/A        | A/A      |
| Пациенты с ТЦВС   | 49       | 77 (78,6%)     | 21 (21,4%) | 30 (61,2%)       | 17 (34,7%) | 2 (4,1%) |
| Контрольная группа  | 36       | 62 (86%)       | 10 (14%)   | 26 (72,2%)       | 10 (27,8%) | 0 (0%)   |
| Ген интегрин альфа (гликопротеина Gp1a) — <i>ITGA2</i> (с. C807T)                         |          |                |            |                  |            |          |
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | C              | T          | C/C              | C/T        | T/T      |
| Пациенты с ТЦВС   | 49       | 83 (84,7%)     | 15 (15,3%) | 37 (75,5%)       | 9 (18,4%)  | 3 (6,1%) |
| Контрольная группа  | 36       | 61 (85%)       | 11 (15%)   | 26 (72,2%)       | 9 (25%)    | 1 (2,8%) |
| Ген тромбоцитарного рецептора фибриногена (гликопротеина Gp3a) — <i>ITGB3</i> (с. T1565C) |          |                |            |                  |            |          |
|   | <i>n</i> | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |          |
|   |          | T              | C          | T/T              | T/C        | C/C      |
| Пациенты с ТЦВС   | 49       | 83 (84,7%)     | 15 (15,3%) | 35 (71,4%)       | 13 (26,5%) | 1 (2%)   |
| Контрольная группа  | 36       | 67 (93%)       | 5 (7%)     | 31 (86,1%)       | 5 (13,9%)  | 0 (0%)   |

группе составила 64 (89%) и 8 (11%) соответственно. Различия по частоте встречаемости аллеля G в группах больных с ТЦВС и здоровых лиц были статистически достоверными ( $\chi^2 = 9,631$ ;  $p = 0,002$ ; ОШ = 3,683; 95% ДИ — 1,564–8,672). Аллель G увеличивает риск развития ТЦВС в 3,68 раза ( $\chi^2 = 9,631$ ;  $p = 0,002$ ; ОШ = 3,683 + 0,437; 95% ДИ — 1,564–8,672). Носительство полиморфизма A/G повышает риск развития ТЦВС в 3,5 раза ( $\chi^2 = 5,784$ ;  $p = 0,017$ ; ОШ = 3,519 + 0,538; 95% ДИ — 1,225–10,104).

Частота аллеля G полиморфизма A2756G гена *MTR* в группе больных ТЦВС была достоверно выше, чем в контрольной группе (18 (19,6%) против 6 (8%);  $\chi^2 = 4,079$ ;  $p = 0,044$ ), а частота аллеля А — достоверно ниже (74 (80,4%) против 66 (92%);  $\chi^2 = 4,079$ ;  $p = 0,044$ ). Расчет ОШ показал, что аллель G полиморфизма A2756G связан с развитием ТЦВС (ОШ = 2,676 + 0,501; 95% ДИ — 1,002–7,142). У пациентов с ТЦВС частота гетерозиготного генотипа A/G в группе пациентов с ТЦВС также была достоверно выше, чем в контрольной группе ( $\chi^2 = 4,923$ ;  $p = 0,027$ ; ОШ = 3,214 + 0,540; 95% ДИ — 1,116–9,257).

При проведении клинко-молекулярного анализа статистически значимых ассоциаций клинических особенностей ТЦВС с выявленными протромбогенными полиморфными вариантами генов отмечено не было.

Изолированный ТЦВС у пациентов без полиморфизмов гена *PAI-1* (с.5G6754G) диагностирован в 1 случае, а при наличии полиморфизмов гена *PAI-1* в гомозиготном или гетерозиготном состоянии — в 13 (33%) случаях; множественный ТЦВС у пациентов с отсутствием полиморфизмов гена *PAI-1* отмечен в 9 (90%) случаях и

полиморфными вариантами гена *PAI-1* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии — в 26 (67%) случаях ( $p = 0,244$ ).

Изолированный ТЦВС при полиморфных вариантах гена *FXIII A1* (с.Г103Т) в гомозиготном или гетерозиготном состоянии наблюдали у 5 (31%) пациентов, при отсутствии полиморфизмов гена *FXIII A1* — у 9 (27%) пациентов; множественный ТЦВС выявлен у 11 (69%) пациентов с полиморфными вариантами гена *FXIII A1* (с.Г103Т) в гомозиготном или гетерозиготном состоянии и в 24 (73%) случаях при отсутствии полиморфизмов гена *FXIII A1* ( $p = 1,000$ ).

У пациентов с полиморфным вариантом гена *MTR* 2756 в гетерозиготном состоянии изолированный ТЦВС встречался в 10 (56%) случаях, а множественный тромбоз — в 8 (44%) случаях. При отсутствии полиморфизмов гена *MTR* (с.А2756G) изолированный ТЦВС диагностирован в 7 (25%) случаях, а множественный — в 21 (75%) случае ( $p = 0,06$ ).

При гомозиготном или гетерозиготном варианте носительства аллеля 677Т гена *MTRR* изолированный ТЦВС выявлен у 5 (21%) пациентов, а множественный — у 19 (79%) пациентов. Среди пациентов без полиморфизма гена *MTRR* изолированный ТЦВС диагностирован в 8 (38%) случаях, а множественный — в 13 (62%) случаях ( $p = 0,323$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании у 24 пациентов (47,1%) ТЦВС был диагностирован в возрасте до 40 лет. Соотношение

Таблица 2. Частота аллелей и генотипов протромбогенных полиморфных вариантов генов фолатного обмена

| Ген метилентетрагидрофолатредуктазы — <i>MTHFR</i> (с.С677Т)  |    |                |            |                  |            |           |
|---|----|----------------|------------|------------------|------------|-----------|
|   | n  | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |           |
|   |    | С              | Т          | С/С              | С/Т        | Т/Т       |
| Пациенты с ТЦВС   | 44 | 66 (75%)       | 22 (25%)   | 25 (56,8%)       | 16 (36,4%) | 3 (6,8%)  |
| Контрольная группа  | 36 | 60 (83%)       | 12 (17%)   | 26 (72,2%)       | 8 (22,2%)  | 2 (5,6%)  |
| Ген метилентетрагидрофолатредуктазы — <i>MTHFR</i> (с.А1298С) |    |                |            |                  |            |           |
|   | n  | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |           |
|   |    | А              | С          | А/А              | А/С        | С/С       |
| Пациенты с ТЦВС   | 48 | 83 (86,5%)     | 13 (13,5%) | 37 (77,1%)       | 9 (18,8%)  | 2 (4,2%)  |
| Контрольная группа  | 36 | 64 (89%)       | 8 (11%)    | 29 (80,6%)       | 6 (16,7%)  | 1 (2,8%)  |
| Ген метионинсинтазы редуктазы — <i>MTRR</i> (с.А66G)          |    |                |            |                  |            |           |
|   | n  | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |           |
|   |    | А*             | Г**        | А/А***           | А/Г****    | Г/Г       |
| Пациенты с ТЦВС   | 46 | 63 (68,5%)     | 29 (31,5%) | 22 (47,8%)       | 19 (41,3%) | 5 (10,9%) |
| Контрольная группа  | 36 | 64 (89%)       | 8 (11%)    | 29 (80,6%)       | 6 (16,7%)  | 1 (2,8%)  |

Примечание: \* —  $\chi^2 = 9,631$ ;  $p = 0,002$ ; ОШ = 0,272; 95% ДИ 0,115–0,640;

\*\* —  $\chi^2 = 9,631$ ;  $p = 0,002$ ; ОШ = 3,683 + 0,437; 95% ДИ 1,564–8,672;

\*\*\* —  $\chi^2 = 9,201$ ;  $p = 0,003$ ; ОШ = 0,221; 95% ДИ 0,081–0,606;

\*\*\*\* —  $\chi^2 = 5,784$ ;  $p = 0,017$ ; ОШ = 3,519 + 0,538; 95% ДИ 1,225–10,104.

| Ген метионинсинтазы — <i>MTR</i> (с.А2756G) |    |                |            |                  |            |        |
|---|----|----------------|------------|------------------|------------|--------|
|   | n  | Частота аллеля |            | Частота генотипа |            |        |
|   |    | А*             | Г**        | А/А***           | А/Г****    | Г/Г    |
| Пациенты с ТЦВС                             | 46 | 74 (80,4%)     | 18 (19,6%) | 28 (69,9%)       | 18 (39,1%) | 0 (0%) |
| Контрольная группа                          | 36 | 66 (92%)       | 6 (8%)     | 30 (83,3%)       | 6 (16,7%)  | 0 (0%) |

Примечание: \* —  $\chi^2 = 4,079$ ;  $p = 0,044$ ; ОШ = 0,374; 95% ДИ 0,140–0,998;

\*\* —  $\chi^2 = 4,079$ ;  $p = 0,044$ ; ОШ = 2,676 + 0,501; 95% ДИ 1,002–7,142;

\*\*\* —  $\chi^2 = 4,923$ ;  $p = 0,027$ ; ОШ = 0,311; 95% ДИ 0,108–0,896;

\*\*\*\* —  $\chi^2 = 4,923$ ;  $p = 0,027$ ; ОШ = 3,214 + 0,540; 95% ДИ 1,116–9,257.

мужчин и женщин составило 1 : 1,2. Незначительное превалирование распространенности тромбоза среди женщин детородного возраста объясняется такими факторами риска, как беременность, использование контрацептивов и заместительной гормональной терапии [22].

Протромбогенные полиморфные варианты генов гемостаза были диагностированы в 94% случаев. Чаще всего наблюдали полиморфные варианты гена *PAI-1* (с.5G6754G), белок которого участвует в регуляции фибринолиза. Наличие полиморфного варианта этого гена приводит к повышению функциональной активности белка ингибитора активатора плазминогена, что в свою очередь способствует повышению риска развития тромбоза [23]. Частота встречаемости гетерозиготного состояния аллеля 4G в –675 положении гена *PAI-1* в популяции составляет 50%, гомозиготного состояния — 26% [24]. В нашей работе аллель 4G в –675 положении гена *PAI-1* выявлен в гетерозиготном состоянии (5G/4G) в 57,1% случаев, в гомозиготном состоянии (4G/4G) — в 22,4% случаев.

Для гена *PAI-1* статистически значимые различия между группой больных ТЦВС и группой здоровых лиц наблюдали в распределении как аллелей, так и генотипов. У пациентов, имеющих генотип 4G/4G, риск развития ТЦВС увеличивается в 10,1 раз (ОШ = 10,132; 95% ДИ — 1,243–82,573), и имеющих генотип 5G/4G — в 3,03 раза (ОШ = 3,030; 95% ДИ — 1,223–7,507).

Влияние фактора *FXIII A1* на развитие ТЦВС остается не ясным [25]. Возможно, что полиморфизм G103T гена *FXIII A1* сопровождается изменениями в структуре фибрина. При низкой концентрации фибриногена

плотность тромба при полиморфизме G103T высокая, тогда как при повышении уровня фибриногена плотность тромба, и, следовательно, его устойчивость снижаются. При наличии полиморфизма 4G/4G гена *PAI-1* протективный эффект полиморфизма G103T гена *FXIII A1* резко снижается [26].

Некоторые авторы отмечают взаимосвязь между полиморфизмом C677T гена *MTHFR* и риском развития ТЦВС [27, 28]. В проведенном исследовании протромбогенные полиморфные варианты генов метионин-гомоцистеинового обмена были диагностированы у 86% пациентов. Чаще всего встречались полиморфные варианты генов *MTRR* (с.А66G) и *MTR* (A2756G). Частота аллеля 66G гена *MTRR* в европейской популяции, по данным литературы, достигает 54%, в проведенном исследовании частота его составила — 31,5%. Аллель G полиморфизма A66G гена *MTRR* увеличивают риск развития ТЦВС в 3,68 раза (ОШ = 3,683; 95% ДИ — 1,564–8,672), аллель G полиморфизма A2756G гена *MTR* — в 2,676 раза (ОШ = 2,676; 95% ДИ — 1,002–7,142). Носительство полиморфизма A/G гена *MTRR* повышает риск развития ТЦВС в 3,5 раза (ОШ = 3,519; 95% ДИ — 1,225–10,104), полиморфизма A/G гена *MTR* в 3,2 раза (ОШ = 3,214; 95% ДИ — 1,116–9,257).

## ВЫВОДЫ

Носительство полиморфизма генов *PAI-1* (5G6754G), *FXIII A1* (G103T), *MTRR* (A66G) и *MTR* (A2756G) повышает риск развития асептического ТЦВС и не влияет на клинические проявления тромбоза.

## Литература

- Behrouzi R, Punter M. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis. Clin Med (Lond). 2018; 18 (1): 75–9. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-1-75.
- Maali L, Khan S, Qeadan F, Ismail M, Ramaswamy D, Hedna VS. Cerebral venous thrombosis: continental disparities. Neurol Sci. 2017; 38 (11): 1963–8. PubMed PMID: 28808795. DOI: 10.1007/s10072-017-3082-7.
- Lee DJ, Ahmadpour A, Binyamin T, Dahlin BC, Shahlaie K, Waldau B. Management and outcome of spontaneous cerebral venous sinus thrombosis in a 5-year consecutive single-institution cohort. J Neurointerv Surg. 2017; 9 (1): 34–8. DOI: 10.1136/neurintsurg-2015-012237.
- Agrawal K, Burger K, Rothrock JF. Cerebral sinus thrombosis. Headache. 2016; 56 (8): 1380–9. DOI: 10.1111/head.12873.
- Capecchi M, Abbattista M, Martinelli I. Cerebral venous sinus thrombosis. J Thromb Haemost. 2018; 16 (10): 1918–31. DOI: 10.1111/jth.14210.
- Coutinho JM, Zuurbier SM, Aramideh M, Stam J. The incidence of cerebral venous thrombosis: a cross-sectional study. Stroke. 2012; 43 (12): 3375–7. PubMed PMID: 22996960. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.671453.
- Janghorbani M, Zare M, Saadatnia M, Mousavi SA, Mojarad M, Asgari E. Cerebral vein and dural sinus thrombosis in adults in Isfahan, Iran: frequency and seasonal variation. Acta Neurol Scand. 2008; 117 (2): 117–21. PubMed PMID: 18184347. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2007.00915.x.
- Coutinho JM, Zuurbier SM, Stam J. Declining mortality in cerebral venous thrombosis: a systematic review. Stroke. 2014; 45 (5): 1338–41. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004666.
- de Freitas GR, Bogousslavsky J. Risk factors of cerebral vein and sinus thrombosis. Front Neurol Neurosci. 2008; (23): 23–54.
- Kashkoush AI, Ma H, Agarwal N, Panczykowski D, Tonetti D, Weiner GM, et al. Cerebral venous sinus thrombosis in pregnancy and puerperium: A pooled, systematic review. J Clin Neurosci. 2017; (39): 9–15. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.02.046.
- Bushnell C, McCullough LD, Awad IA, Chireau MV, Fedder WN, Furie KL, et al. Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2014; 45 (5): 1545–88. DOI: 10.1161/01.str.0000442009.06663.48.
- Ilyas A, Chen CJ, Raper DM, Ding D, Buell T, Mastorakos P, et al. Endovascular mechanical thrombectomy for cerebral venous sinus thrombosis: a systematic review. J Neurointerv Surg. 2017; 9 (11): 1086–92. DOI: 10.1136/neurintsurg-2016-012938.
- McBane RD, Tafur A, Wysokinski WE. Acquired and congenital risk factors associated with cerebral venous sinus thrombosis. Thromb Res. 2010; 126 (2): 81–7. DOI: 10.1016/j.thromres.2010.04.015.
- Martinelli I, Cattaneo M, Taioli E, De Stefano V, Chiusolo P, Mannucci PM. Genetic risk factors for superficial vein thrombosis. Thromb Haemost. 1999; 82 (4): 1215–7. PMID: 10544900.
- Bushnell C, Saposnik G. Evaluation and management of cerebral venous thrombosis. Continuum (Minneapolis). 2014; 20 (2 Cerebrovascular Disease): 335–51. DOI: 10.1212/01.CON.0000446105.67173.a8.
- Marjot T, Yadav S, Hasan N, Bentley P, Sharma P. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. Stroke. 2011; 42 (4): 913–8. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.602672.
- Ferro JM, Boussier MG, Canhão P, Coutinho JM, Crassard I, Dentali F, et al. European Stroke Organization guideline for the diagnosis and treatment of cerebral venous thrombosis — Endorsed by the European Academy of Neurology. Eur Stroke J. 2017; 2 (3): 195–221. DOI: 10.1177/2396987317719364.
- Alshoabi SA. Cerebral venous sinus thrombosis: a diagnostic challenge in a rare presentation. Brain Circ. 2017; 3 (4): 227–230.



DOI: 10.4103/bc.bc\_27\_17.

19. Gao L, Xu W, Li T, Yu X, Cao S, Xu H, et al. Accuracy of magnetic resonance venography in diagnosing cerebral venous sinus thrombosis. *Thromb Res.* 2018; (167): 64–73. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.05.012.
20. Goyal G, Charan A, Singh R. Clinical Presentation, Neuroimaging Findings, and Predictors of Brain Parenchymal Lesions in Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis: A Retrospective Study. *Ann Indian Acad Neurol.* 2018; 21 (3): 203–8. DOI: 10.4103/aian.AIAN\_470\_17.
21. Cai H, Ye X, Zheng W, Ma L, Hu X, Jin X. Pitfalls in the diagnosis and initial management of acute cerebral venous thrombosis. *Rev Cardiovasc Med.* 2018; 19 (4): 129–33. DOI: 10.31083/j.rcm.2018.04.4081.
22. Ferro JM, Canhã P, Aguiar de Sousa D. Cerebral Venous Thrombosis. *Presse Med.* 2016; 45 (12 Pt 2): e429–e450. PubMed PMID: 27816347. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.10.007.
23. Schneider S, Kapelushnik J, Kraus M, El Saied S, Levi I, Kaplan DM. The association between otogenic lateral sinus thrombosis and thrombophilia — A long-term follow-up. *Am J Otolaryngol.* 2018; 39 (3): 299–302. PubMed PMID: 29530427. DOI: 10.1016/j.amjoto.2018.03.013.
24. Lichy C, Dong-Si T, Reuner K, Genius J, Rickmann H, Hampe T, et al. Risk of cerebral venous thrombosis and novel gene polymorphisms of the coagulation and fibrinolytic systems. *J Neurol.* 2006; 253 (3): 316–20. PubMed PMID: 16155788. DOI: 10.1007/s00415-005-0988-4.
25. Li B, Heldner MR, Arnold M, Coutinho JM, Zuurbier SM, Meijers JCM, et al. Coagulation Factor XIII in Cerebral Venous Thrombosis. *TH Open.* 2019; 3 (3): e227–e229. DOI: 10.1055/s-0039-1693487.
26. Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: What does it look like? *J Thromb Haemost.* 2019; 17 (5): 714–6. DOI: 10.1111/jth.14431.
27. Ali Z, Troncoso JC, Fowler DR. Recurrent cerebral venous thrombosis associated with heterozygote methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and sickle cell trait without homocysteinemia: an autopsy case report and review of literature. *Forensic Sci Int.* 2014; (242): e52–e55. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.07.007.
28. Ghaznavi H, Soheili Z, Samiei S, Soltanpour MS. Association study of methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation with cerebral venous thrombosis in an Iranian population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015; 26 (8): 869–73. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000292.

## References

1. Behrouzi R, Punter M. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis. *Clin Med (Lond).* 2018; 18 (1): 75–9. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-1-75.
2. Maali L, Khan S, Qeadan F, Ismail M, Ramaswamy D, Hedna VS. Cerebral venous thrombosis: continental disparities. *Neurol Sci.* 2017; 38 (11): 1963–8. PubMed PMID: 28808795. DOI: 10.1007/s10072-017-3082-7.
3. Lee DJ, Ahmadpour A, Binyamin T, Dahlin BC, Shahlaie K, Walda B. Management and outcome of spontaneous cerebral venous sinus thrombosis in a 5-year consecutive single-institution cohort. *J Neurointerv Surg.* 2017; 9 (1): 34–8. DOI: 10.1136/neurintsurg-2015-012237.
4. Agrawal K, Burger K, Rothrock JF. Cerebral sinus thrombosis. *Headache.* 2016; 56 (8): 1380–9. DOI: 10.1111/head.12873.
5. Capecci M, Abbattista M, Martinelli I. Cerebral venous sinus thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2018; 16 (10): 1918–31. DOI: 10.1111/jth.14210.
6. Coutinho JM, Zuurbier SM, Aramideh M, Stam J. The incidence of cerebral venous thrombosis: a cross-sectional study. *Stroke.* 2012; 43 (12): 3375–7. PubMed PMID: 22996960. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.671453.
7. Janghorbani M, Zare M, Saadatnia M, Mousavi SA, Mojarad M, Asgari E. Cerebral vein and dural sinus thrombosis in adults in Isfahan, Iran: frequency and seasonal variation. *Acta Neurol Scand.* 2008; 117 (2): 117–21. PubMed PMID: 18184347. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2007.00915.x.
8. Coutinho JM, Zuurbier SM, Stam J. Declining mortality in cerebral venous thrombosis: a systematic review. *Stroke.* 2014; 45 (5): 1338–41. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004666.
9. de Freitas GR, Bogousslavsky J. Risk factors of cerebral vein and sinus thrombosis. *Front Neurol Neurosci.* 2008; (23): 23–54.
10. Kashkoush AI, Ma H, Agarwal N, Panczykowski D, Tonetti D, Weiner GM, et al. Cerebral venous sinus thrombosis in pregnancy and puerperium: A pooled, systematic review. *J Clin Neurosci.* 2017; (39): 9–15. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.02.046.
11. Bushnell C, McCullough LD, Awad IA, Chireau MV, Fedder WN, Furie KL, et al. Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014; 45 (5): 1545–88. DOI: 10.1161/01.str.0000442009.06663.48.
12. Ilyas A, Chen CJ, Raper DM, Ding D, Buell T, Mastorakos P, et al. Endovascular mechanical thrombectomy for cerebral venous sinus thrombosis: a systematic review. *J Neurointerv Surg.* 2017; 9 (11): 1086–92. DOI: 10.1136/neurintsurg-2016-012938.
13. McBane RD, Tafur A, Wysokinski WE. Acquired and congenital risk factors associated with cerebral venous sinus thrombosis. *Thromb Res.* 2010; 126 (2): 81–7. DOI: 10.1016/j.thromres.2010.04.015.
14. Martinelli I, Cattaneo M, Taioli E, De Stefano V, Chiusolo P, Mannucci PM. Genetic risk factors for superficial vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (4): 1215–7. PMID: 10544900.
15. Bushnell C, Saposnik G. Evaluation and management of cerebral venous thrombosis. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2014; 20 (2 Cerebrovascular Disease): 335–51. DOI: 10.1212/01.CON.0000446105.67173.a8.
16. Marjot T, Yadav S, Hasan N, Bentley P, Sharma P. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. *Stroke.* 2011; 42 (4): 913–8. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.602672.
17. Ferro JM, Boussier MG, Canhã P, Coutinho JM, Crassard I, Dentali F, et al. European Stroke Organization guideline for the diagnosis and treatment of cerebral venous thrombosis — Endorsed by the European Academy of Neurology. *Eur Stroke J.* 2017; 2 (3): 195–221. DOI: 10.1177/2396987317719364.
18. Alshoabi SA. Cerebral venous sinus thrombosis: a diagnostic challenge in a rare presentation. *Brain Circ.* 2017; 3 (4): 227–230. DOI: 10.4103/bc.bc\_27\_17.
19. Gao L, Xu W, Li T, Yu X, Cao S, Xu H, et al. Accuracy of magnetic resonance venography in diagnosing cerebral venous sinus thrombosis. *Thromb Res.* 2018; (167): 64–73. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.05.012.
20. Goyal G, Charan A, Singh R. Clinical Presentation, Neuroimaging Findings, and Predictors of Brain Parenchymal Lesions in Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis: A Retrospective Study. *Ann Indian Acad Neurol.* 2018; 21 (3): 203–8. DOI: 10.4103/aian.AIAN\_470\_17.
21. Cai H, Ye X, Zheng W, Ma L, Hu X, Jin X. Pitfalls in the diagnosis and initial management of acute cerebral venous thrombosis. *Rev Cardiovasc Med.* 2018; 19 (4): 129–33. DOI: 10.31083/j.rcm.2018.04.4081.
22. Ferro JM, Canhã P, Aguiar de Sousa D. Cerebral Venous Thrombosis. *Presse Med.* 2016; 45 (12 Pt 2): e429–e450. PubMed PMID: 27816347. DOI: 10.1016/j.lpm.2016.10.007.
23. Schneider S, Kapelushnik J, Kraus M, El Saied S, Levi I, Kaplan DM. The association between otogenic lateral sinus thrombosis and thrombophilia — A long-term follow-up. *Am J Otolaryngol.* 2018; 39 (3): 299–302. PubMed PMID: 29530427. DOI: 10.1016/j.amjoto.2018.03.013.
24. Lichy C, Dong-Si T, Reuner K, Genius J, Rickmann H, Hampe T, et al. Risk of cerebral venous thrombosis and novel gene polymorphisms of the coagulation and fibrinolytic systems. *J Neurol.* 2006; 253 (3): 316–20. PubMed PMID: 16155788. DOI: 10.1007/s00415-005-0988-4.
25. Li B, Heldner MR, Arnold M, Coutinho JM, Zuurbier SM, Meijers JCM, et al. Coagulation Factor XIII in Cerebral Venous Thrombosis. *TH Open.* 2019; 3 (3): e227–e229. DOI: 10.1055/s-0039-1693487.



26. Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: What does it look like? *J Thromb Haemost.* 2019; 17 (5): 714–6. DOI: 10.1111/jth.14431.
27. Ali Z, Troncoso JC, Fowler DR. Recurrent cerebral venous thrombosis associated with heterozygote methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and sickle cell trait without homocysteinemia: an autopsy case report and review of literature. *Forensic Sci Int.* 2014; (242): e52–e55. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.07.007.
28. Ghaznavi H, Soheili Z, Samiei S, Soltanpour MS. Association study of methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation with cerebral venous thrombosis in an Iranian population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015; 26 (8): 869–73. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000292.

## АНАЛИЗ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ IL4, IL10, IL13 С РАЗВИТИЕМ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И РЕМИССИЕЙ

Ю. В. Жорина<sup>1</sup>✉, О. С. Абрамовских<sup>1</sup>, Г. Л. Игнатова<sup>1</sup>, О. Г. Площанская<sup>2</sup><sup>1</sup> Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия<sup>2</sup> ООО «ДНК Клиника», Челябинск, Россия

Бронхиальная астма (БА) является многофакторным заболеванием, в основе которого лежит хроническое воспаление. Атопический фенотип предполагает наличие у пациентов сходных молекулярных механизмов патогенеза. Целью работы было провести анализ ассоциации полиморфных локусов генов IL4 (*rs2243250*; *C-589T*), IL10 (*rs1800896*; *G-1082A*; *rs1800872*; *C-592A*), IL13 (*rs20541*; *Arg130Gln*) с развитием атопической БА и ремиссией. С помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведено исследование полиморфных локусов генов больных БА ( $n = 53$ ) и группы сравнения ( $n = 30$ ), смешанной городской выборки, проживающих на Южном Урале. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов интерлейкинов с развитием БА показал, что генотип AA IL10 (*rs1800872*) встречается чаще в группе сравнения (23,3%), чем в группе атопической БА (5,7%) (OR = 0,197; 95% ДИ [0,047–0,832];  $p = 0,031$ ). Для остальных исследованных полиморфных локусов генов интерлейкинов отличий в частотах генотипов между больными атопической БА и группой сравнения не обнаружено. Не удалось показать влияние изученных полиморфных локусов на развитие ремиссии заболевания.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма у взрослых, атопия, ремиссия, полиморфизм генов, цитокины

**Информация о вкладе авторов:** Ю. В. Жорина — общая идея и методология исследования, сбор, обработка и интерпретация данных, статистический анализ, написание и оформление статьи; О. С. Абрамовских — методика и курирование исследования, анализ и интерпретация данных, написание и оформление статьи; Г. Л. Игнатова — анализ клинической части данных, курирование исследования, интерпретация данных, написание статьи; О. Г. Площанская — сбор данных, осуществление лабораторного этапа обследования, интерпретация данных, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ЮУГМУ Минздрава» (протокол № 10 от 17 ноября 2016 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Юлия Владимировна Жорина  
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092; juliamart24@mail.ru

**Статья получена:** 25.09.2019 **Статья принята к печати:** 11.10.2019 **Опубликована онлайн:** 21.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.067

## ANALYSIS OF ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISMS IN THE GENES CODING FOR IL4, IL10, IL13 WITH THE DEVELOPMENT OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA AND ITS REMISSION

Zhorina YuV<sup>1</sup>✉, Abramovskikh OS<sup>1</sup>, Ignatova GL<sup>1</sup>, Ploshchanskay OG<sup>2</sup><sup>1</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia<sup>2</sup> DNA Clinic LLC, Chelyabinsk, Russia

Bronchial asthma is a multifactorial disease underpinned by chronic inflammation. The atopic phenotype of BA implies the presence of similar molecular mechanisms of pathogenesis between the patients. The aim of this study was to analyze the associations between the development of atopic BA/its remission and the following polymorphisms of interleukin genes: IL4 (*rs2243250*; *C-589T*), IL10 (*rs1800896*; *G-1082A*; *rs1800872*; *C-592A*), and IL13 (*rs20541*; *Arg130Gln*). Using allele-specific polymerase chain reaction (PCR), we studied the listed SNPs in the mixed urban sample of patients with BA ( $n = 53$ ) and the controls ( $n = 30$ ) residing in South Ural. The analysis revealed that genotype AA of IL10 (*rs1800872*) occurred more frequently in the control group (23.3%) than in the patients with atopic BA (5.7%) (OR = 0.197; 95% CI [0.047–0.832];  $p = 0.031$ ). No differences in genotype frequencies were observed between the patients with atopic BA and the controls for other studied polymorphisms. Our study failed to demonstrate the association of the listed polymorphisms and BA remission.

**Keywords:** bronchial asthma in adults, atopy, remission, gene polymorphism, cytokines

**Author contribution:** Zhorina YuV — conceived and planned the study, collected, processed and interpreted the data, performed statistical analysis, participated in writing the manuscript; Abramovskikh OS — proposed the method and supervised the study, analyzed and interpreted the data, participated in writing the manuscript; Ignatova GL — analyzed the clinical data, supervised the study, interpreted the data, participated in writing the manuscript; Ploshchanskay OG — collected the data, conducted laboratory tests, interpreted the data and participated in writing the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of South Ural State Medical University (Protocol № 10 dated November 17, 2016). The patients gave informed consent to participate in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Yulia Yu. Zhorina  
Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092; juliamart24@mail.ru

**Received:** 25.09.2019 **Accepted:** 11.10.2019 **Published online:** 21.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.067

Бронхиальная астма (БА) — сложное заболевание, в патогенезе которого случайным образом сочетаются как аллергические, так и неаллергические факторы. Известно большое разнообразие фенотипов БА. По данным эпидемиологических исследований, частота атопического фенотипа БА у взрослых преобладает и колеблется от 40 до 80% в общей структуре заболевания. В российских исследованиях атопический вариант БА у взрослых диагностировали в 68–78% случаев [1].

Генетическая предрасположенность вносит значительный вклад в развитие астмы. Так, семейная агрегация астмы была продемонстрирована еще в первой половине прошлого столетия. Исследования близнецов, проведенные во второй половине XX в., показали широкий диапазон в оценках наследственности астмы (36–95%) [2]. В последние несколько лет особое внимание было уделено проведению генетических исследований БА с очень большими размерами выборки без учета конкретного

фенотипа заболевания [3]. Анализ генов-кандидатов в фенотипически гомогенных выборках позволяет выделять группы со сходной молекулярно-генетической основой заболевания. Однородные небольшого размера выборки могут быть достаточными для выявления генетического эффекта у исследуемого гена [4].

Атопические расстройства считают иммунным ответом (гиперчувствительность типа I), связанным и/или опосредованным молекулами иммуноглобулина Е к антигенам окружающей среды. Реакции, связанные с атопическими расстройствами, делят на несколько основных категорий, одни из которых участвуют в функции эпидермального барьера, другие — в регуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа, включая сенсибилизацию IgE [5].

В перечне генов, положительные ассоциации которых с аллергией и астмой доказаны различными исследователями, присутствовали гены-кандидаты, кодирующие цитокины IL4, IL10 и IL13, участвующие в регуляции персистирующего аллергического воспаления [6]. Ассоциация полиморфизмов генов перечисленных цитокинов с бронхиальной астмой определена и отечественными авторами [7, 8].

Большинство исследований по генетике БА посвящено определению предрасположенности к развитию заболевания [9]. Работ по изучению течения и прогрессирования заболевания недостаточно. Более того, имеются данные, что известные в настоящее время генетические факторы риска развития заболевания пока не позволяют точно прогнозировать возникновение и течение БА [10].

По данным зарубежных авторов, частота ремиссии астмы составляет от 5% у пациентов с поздно начавшейся астмой [11] до 65% у детей и подростков [12]. По нашим данным, частота ремиссии атопической БА у взрослых в Челябинске составляет 22,7%. Положительная связь с наступлением ремиссии отмечается у пациентов с нормальным индексом массы тела, проведением аллерген-специфичной терапии и элиминационных мероприятий. Другие клиничко-анамнестические факторы (пол, возраст начала появления симптомов, длительность заболевания, отягощенный семейный анамнез, сочетание с сезонным или круглогодичным ринитом, отношение к курению) не выявили существенных различий в группах пациентов с ремиссией и без ремиссии заболевания [13].

Целью исследования было проанализировать ассоциации полиморфных локусов генов IL4 (*rs2243250*; *C-589T*), IL10 (*rs1800896*; *G-1082A*; *rs1800872*; *C-592A*), IL13 (*rs20541*; *Arg130Gln*) с развитием атопической БА и ремиссией в смешанной городской выборке жителей г. Челябинска (Южный Урал).

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено телефонное анкетирование 181 пациента с атопической БА, наблюдавшихся в период с 1992 по 2018 г. на базе аллергологического кабинета МБУЗ «Городская клиническая поликлиника № 7» г. Челябинска. Диагноз заболевания устанавливал (подтверждал) врач аллерголог-иммунолог на основании данных клинического, лабораторного, инструментального методов исследования и кожных аллергических проб в соответствии с критериями программных документов по диагностике, лечению и профилактике бронхиальной астмы [14]. Медиана продолжительности наблюдения составила 8 лет [5; 15 лет].

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты обоих полов в возрасте 18–70 лет; наличие диагноза атопической БА легкой или средней степени тяжести; подтвержденная сенсибилизация к неинфекционным аллергенам; период наблюдения не менее 3 лет; согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: сочетание БА и хронической обструктивной болезни легких; силикоз, туберкулез, саркоидоз, бронхоэктатическая болезнь, операции на легких.

Комплексное обследование прошли 53 человека в возрасте 23–70 лет: клиническое (детализация жалоб и симптомов по основному и сопутствующим заболеваниям, сбор аллергологического анамнеза, оценка физикального статуса пациента, определение уровня контроля заболевания — балльная шкала симптомов, АСТ-тест); исследование полиморфизмов генов интерлейкинов методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции, ПЦР); инструментальное (спирометрия с пробой на обратимость бронхиальной обструкции).

Молекулярно-генетическое исследование проводили на базе лаборатории «ООО ДНК» (г. Челябинск). Геномную ДНК больных и участников группы сравнения выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ДНК-технология; Россия). Однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) генов IL4 (*rs2243250*; *C-589T*), IL10 (*rs1800896*; *G-1082A*; *rs1800872*; *C-592A*), IL13 (*rs20541*; *Arg130Gln*) идентифицировали с помощью тест-системы «SNP-экспресс» (НПФ Литех; Россия) методом аллель-специфичной ПЦР.

Спирометрические критерии нормальной функции легких: отсутствие бронхиальной обструкции, определяемой как отношение объема форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) к форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) менее 0,7 до применения бронхолитика. Бронходилатационный тест считали положительным, если прирост ОФВ1 составлял 12% и более после ингаляции четырех доз сальбутамола и абсолютный прирост был больше 200 мл [15].

В литературе предложены определения ремиссии астмы, основанные на ее продолжительности от 1 до 6 лет. Кроме того, существуют значительные различия в определении ремиссии в некоторых исследованиях, основанных на разрешении клинических симптомов, в то время как в других необходима объективная оценка нормальной функции легких [16].

Поскольку нет единого мнения относительно определения этого периода течения БА, клиническую ремиссию определяли как отсутствие в течение года симптомов (приступов кашля, одышки или удушья, свистящего дыхания), базисной терапии и применения  $\beta_2$ -агонистов короткого действия при нормальной функции легких и отрицательной пробе при спирометрии. На основании критериев включения и исключения были сформированы следующие группы: пациенты с ремиссией атопической БА — 17 человек (14 мужчин и 3 женщины), пациенты без ремиссии атопической БА — 36 человек (14 мужчин и 22 женщины). Группу сравнения составили 30 человек в возрасте 23–73 лет (11 мужчин и 19 женщин), прошедших анкетирование на отсутствие респираторных жалоб, без аллергических заболеваний, с неотягощенной наследственностью по аллергическим заболеваниям.

Данные обрабатывали с помощью компьютерной программы SPSS Statistics 17.0.1 (SPSS Inc; США). Анализ вариационных рядов проводили методами описательной статистики. Качественные переменные описывали абсолютными и относительными частотами. Анализ

вариационных рядов проводили методами описательной статистики: для количественных переменных определяли медиану (Me) и интерквартильный интервал [IQR, 25% : 75%]. Анализ вида распределения количественных данных проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборочных средних в независимых группах использовали критерий Манна–Уитни, при уровне значимости  $p$  менее 0,05.

Рассчитывали частоты аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов генов-кандидатов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга ( $\chi^2$  при уровне значимости  $p$  менее 0,05), при попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля использовали двусторонний точный метод Фишера. Для анализа ассоциации рассчитывали показатель отношения шансов (ОШ) и 95%-й доверительный интервал (ДИ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты с атопической БА ( $n = 53$ ) имели следующие клинические характеристики: наличие полисенситизации (к бытовым, эпидермальным, растительным аллергенам) у 68% ( $n = 36$ ); наследственная отягощенность — у 47% ( $n = 25$ ); начало заболевания до 18 лет — у 42% ( $n = 22$ ); сочетание с аллергическим ринитом — у 78% ( $n = 41$ ); тяжесть заболевания (на момент постановки диагноза) легкая — у 72% ( $n = 38$ ), средняя — у 28% ( $n = 15$ ). В группе пациентов с ремиссией атопической БА определена нормальная функция легких и не обнаружено статистически

значимых различий в результатах бронходилатационного теста относительно группы сравнения (табл. 1). У пациентов без ремиссии заболевания выявлены положительные результаты бронходилатационного теста, меньшие значения ОФВ1 % и ОФВ1/ФЖЕЛ % по отношению к группе сравнения.

Частоты генотипов рассчитаны для общей группы больных атопической БА по отношению к группе сравнения, а также для групп с ремиссией и без ремиссии заболевания. Для всех исследованных локусов определено неравновесие по сцеплению в группе сравнения и соответствие соотношению Харди–Вайнберга в группе пациентов с атопической БА.

Анализ ассоциации полиморфных локусов генов интерлейкинов с развитием БА (табл. 2) показал статистически значимое различие по частоте генотипов IL10 (*rs1800872*): генотип AA чаще встречается в группе сравнения (23,3%), чем в группе атопической БА (5,7%) (ОШ = 0,197; 95% ДИ [0,047–0,832];  $p = 0,031$ ), и, вероятно, имеет протективное значение. Для остальных исследованных ОНП различий в частотах генотипов между больными атопической БА и группой сравнения не обнаружено.

Межгрупповой сравнительный анализ показал различие по частоте генотипов IL10 (*rs1800872*) у пациентов без ремиссии атопической БА по отношению к группе сравнения: частота генотипа AA составила 2,8% против 23,3% (ОШ = 0,094; 95% ДИ [0,011–0,814];  $p = 0,019$ ). При совокупной оценке данных клинического и молекулярно-генетического обследований не выявлено статистически значимых ассоциаций с развитием ремиссии (табл. 3).

**Таблица 1.** Показатели спирометрии у пациентов в периоде ремиссии атопической бронхиальной астмы, без ремиссии и группы сравнения

| Показатель   | Пациенты с ремиссией БА, $n = 17$ (группа 1) | Пациенты с БА без ремиссии (контролируемое, частично контролируемое и неконтролируемое течение) (группа 2), $n = 36$ | Группа сравнения (группа 3), $n = 30$ | $p$ -величина (группы 1–3) | $p$ -величина (группы 1–2) |
|--|--|--|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| ОФВ1 %, Me [Q1; Q3]  | 99 [89,5; 107,8]                             | 84 [74; 97]  | 104 [95,5; 110]                       | 0,4                        | 0,001                      |
| Прирост ОФВ1 в мл после пробы с сальбутамолом (400 мкг), Me [Q1; Q3] | 155 [0; 247,5]                               | 240 [107,5; 445]   | 167,5 [82,25; 228,75]                 | 0,72                       | 0,013                      |
| ОФВ1/ФЖЕЛ %, Me [Q1; Q3]   | 81,5 [76,3; 88,5]                            | 74 [67; 79,75]   | 83 [80,5; 85,5]                       | 0,69                       | 0,001                      |

**Таблица 2.** Распределение частот генотипов полиморфных локусов генов интерлейкинов у больных атопической БА и в группе сравнения

| Генотип                   | Пациенты с атопической БА ( $n = 53$ ), % ( $n$ ) | Группа сравнения ( $n = 30$ ), % ( $n$ ) | ОШ (95% ДИ)         | $p$ -величина |
|---------------------------|---|--|---------------------|---------------|
| IL4 ( <i>rs2243250</i> )  |   |  |                     |               |
| CC                        | 52,8 (28)   | 53,3 (16)                                | 0,98 (0,39–2,4)     | 1,000         |
| CT                        | 43,3 (23)   | 46,6 (14)                                | 0,876 (0,35–2,15)   | 0,821         |
| TT                        | 3,8 (2)   | 0 (0)                                    | 0,63 (0,53–0,74)    | 0,533         |
| IL10 ( <i>rs1800896</i> ) |   |  |                     |               |
| GG                        | 37,7 (20)   | 43,3 (13)                                | 0,79 (0,31–1,97)    | 0,647         |
| GA                        | 45,3 (24)   | 30 (9)                                   | 1,93 (0,74–4,93)    | 0,243         |
| AA                        | 17 (9)  | 26,6 (8)                                 | 0,56 (0,19–1,65)    | 0,397         |
| IL10 ( <i>rs1800872</i> ) |   |  |                     |               |
| CC                        | 56,6 (30)   | 46,6 (14)                                | 1,49 (0,60–3,66)    | 0,493         |
| CA                        | 37,7 (20)   | 30 (9)                                   | 1,41 (0,54–3,68)    | 0,632         |
| AA                        | 5,7 (3)   | 23,3 (7)                                 | 0,197 (0,047–0,832) | 0,031         |
| IL13 ( <i>rs20541</i> )   |   |  |                     |               |
| GG                        | 55 (29)   | 56,6 (17)                                | 0,924 (0,37–2,27)   | 1,000         |
| GA                        | 34 (18)   | 30 (9)                                   | 1,2 (0,45–3,15)     | 0,810         |
| AA                        | 11 (6)  | 13,3 (4)                                 | 0,83 (0,21–3,21)    | 1,000         |

Таблица 3. Частота генотипов полиморфных локусов генов интерлейкинов у пациентов с atopической БА в зависимости от клинического течения

| Генотип                            | Пациенты с ремиссией БА (группа 1) <i>n</i> = 17, % ( <i>n</i> ) | Пациенты с БА без ремиссии (группа 2) <i>n</i> = 36, % ( <i>n</i> ) | Группа сравнения (группа 3) <i>n</i> = 30, % ( <i>n</i> ) | Группы сравнения, ОШ (95%ДИ)                        | <i>p</i> -величина         |
|------------------------------------|--|---|---|---|----------------------------|
| IL4 ( <i>rs2243250</i> )           |  |   |   |   |                            |
| CC                                 | 52,9 (9)   | 52,7 (19)   | 53,3 (16)   | 1-3 = 1,01 (0,30–3,34)<br>2-3 = 0,97 (0,37–2,58)    | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 1,000 |
| CT                                 | 47,1 (8)   | 41,7 (15)   | 46,6 (14)   | 1-3 = 0,98 (0,29–3,24)<br>2-3 = 0,81 (0,31–2,16)    | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 0,804 |
| TT                                 | 0 (0)  | 5,6 (2)   | 0 (0)   | 1-3 = –<br>2-3 = 0,53 (0,42–0,7)                    | 1-3 = –<br>2-3 = 0,497     |
| IL10 ( <i>rs1800896</i> )          |  |   |   |   |                            |
| GG                                 | 47,1(8)  | 33,3 (12)   | 43,3 (13)   | 1-3 = 0,86 (0,26–2,84)<br>2-3 = 0,65 (0,24–1,77)    | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 0,452 |
| GA                                 | 35,3 (6)   | 50 (18)   | 30 (9)  | 1-3 = 0,78 (0,22–2,78)<br>2-3 = 2,3 (0,84–6,45)     | 1-3 = 0,753<br>2-3 = 0,133 |
| AA                                 | 17,6 (3)   | 16,7 (6)  | 26,6 (8)  | 1-3 = 1,69 (0,38–7,5)<br>2-3 = 0,55 (0,16–1,8)      | 1-3 = 0,722<br>2-3 = 0,375 |
| IL10 ( <i>rs1800872</i> )          |  |   |   |   |                            |
| CC                                 | 47,1 (8)   | 61,1 (22)   | 46,6 (14)   | 1-3 = 0,98 (0,29–3,24)<br>2-3 = 1,79 (0,67–4,79)    | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 0,322 |
| CA                                 | 41,1 (7)   | 36,1 (13)   | 26,6 (8)  | 1-3 = 0,61 (0,17–2,12)<br>2-3 = 1,31 (0,46–3,71)    | 1-3 = 0,528<br>2-3 = 0,794 |
| AA                                 | 11,7 (2)   | 2,8 (1)   | 23,3 (7)  | 1-3 = 2,28 (0,41–12,5)<br>2-3 = 0,094 (0,011–0,814) | 1-3 = 0,455<br>2-3 = 0,019 |
| IL13 Arg130 Gln ( <i>rs20541</i> ) |  |   |   |   |                            |
| GG                                 | 52,9 (9)   | 55,6 (20)   | 56,6 (17)   | 1-3 = 1,16 (0,35–3,8)<br>2-3 = 0,95 (0,36–2,53)     | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 1,000 |
| GA                                 | 29,4 (5)   | 36,1 (13)   | 30 (9)  | 1-3 = 1,02 (0,28–3,28)<br>2-3 = 1,31 (0,47–3,7)     | 1-3 = 1,000<br>2-3 = 0,794 |
| AA                                 | 17,7 (3)   | 8,3 (3)   | 13,3 (4)  | 1-3 = 0,71 (0,14–3,6)<br>2-3 = 0,59 (0,12–2,87)     | 1-3 = 0,692<br>2-3 = 0,693 |

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты предыдущих исследований полиморфного локуса C-592A гена IL10 противоречивы, так в одних исследованиях показано, что нет связи с предрасположенностью к астме [17], в других выявлены значительные корреляции [18, 19]. Ранее проведенные метаанализы показали ассоциацию полиморфизма C-589T в гене IL4 с риском развития БА у индивидов европейского происхождения [20], полиморфизма Arg130Gln в гене IL13 — с увеличением риска развития БА у детей и взрослых [21–23]. По данным литературы, полиморфный вариант G-1082A гена IL10 предрасполагает к развитию астмы [24].

Предполагается, что факторы, способствующие развитию заболевания, могут отличаться от тех, которые влияют на его прогрессирование [25]. Возможно, что наличие изучаемых ОНП генов интерлейкинов не связано с прогнозом течения заболевания, для выяснения этого необходимо исследование на больших группах.

## ВЫВОДЫ

Впервые получены данные о распределении генотипов полиморфных локусов C-589T в гене IL4, G-1082A и C-592A в гене IL10, Arg130Gln в гене IL13 при atopической БА в смешанной городской выборке жителей Южного Урала. Учитывая, небольшое число пациентов, участвующих в исследовании, результаты следует интерпретировать с осторожностью. В настоящее время изучены многие генетические аспекты БА, которые вносят вклад в понимание патогенеза этого многофакторного заболевания. Дальнейшие исследования в этом направлении необходимы, в том числе с целью большей адаптации генетических методов диагностики в реальной клинической практике. Исследование полиморфных локусов генов интерлейкинов может стать дополнительным инструментом для определения прогноза заболевания при консультировании пациентов, что будет способствовать повышению их приверженности к лечению.

## Литература

- Ненашева Н. М. Атопическая бронхиальная астма: роль аллерген-специфической иммунотерапии. Российский аллергологический журнал. 2015; (6): 54–67.
- Mathias RA. Introduction to genetics and genomics in asthma: genetics of asthma. Adv Exp Med Biol. 2014; (795): 125–55. DOI: 10.1007/978-1-4614-8603-9\_9.
- Baye TM, Martin LJ, Khurana Hershey GK. Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders. J Allergy Clin Immunol. 2010; 126 (3): 425–36. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.05.025.
- Gupta J, Johansson E, Bernstein JA, Chakraborty R, Khurana Hershey GK, Rothenberg ME, et al. Resolving the etiology of atopic disorders by genetic analysis of racial ancestry. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138 (3): 676–99. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.02.045.
- Halapi E, Hakonarson H. Recent development in genomic and proteomic research for asthma. Curr Opin Pulm Med. 2004; 10 (1): 22–30. DOI: 10.1097/00063198-200401000-00005.
- Ober C, Hoffja S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. Genes Immun. 2006; 7 (2): 95–100.



- DOI:10.1038/sj.gene.6364284.
7. Смольникова М. В., Фрейдин М. Б., Смирнова С. В. Гены цитокинов как генетические маркеры atopической бронхиальной астмы с контролируемым и неконтролируемым течением. *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (5): 605–14. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614.
  8. Карунас А. С., Федорова Ю. Ю., Рамазанова Н. Н., Галимова Е. С., Гималова Г. Ф., Гурьева Л. Л. и др. Исследование роли полиморфных вариантов генов цитокинов в развитии бронхиальной астмы в Республике Башкортостан. *Пульмонология*. 2012; (5): 37–40.
  9. Marenholz I, Esparza-Gordillo J, Rüschendorf F, Bauerfeind A, Strachan DP, Spycher BD, et al. Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march. *Nat Commun*. 2015; (6): 8804. DOI: 10.1038/ncomms9804.
  10. Belsky DW, Sears MR, Hancox RJ, Harrington H, Houts R, Moffitt TE, et al. Polygenic risk and the development and course of asthma: Evidence from a 4-decade longitudinal study. *Lancet Respir Med*. 2013; 1 (6): 453–61. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70101-2.
  11. Tiomisto LE, Ilmarinen P, Kankaanranta H. Prognosis of new-onset asthma diagnosed in adult age. *Respir Med*. 2015; 109 (8): 944–54. DOI: 10.1016/j.rmed.2015.05.001.
  12. Javed A, Yoo KH, Agarwal K, Jacobson RM, Li X, Juhn YJ, et al. Characteristics of children with asthma who achieved remission of asthma. *J Asthma*. 2013; 50 (5): 472–9. DOI: 10.3109/02770903.2013.787625.
  13. Игнатова Г. Л., Жорина Ю. В., Абрамовских О. С., Жеребцова И. А. Особенности течения и частота ремиссии atopической бронхиальной астмы у взрослых пациентов в Челябинске. *Пульмонология*. 2019; 29 (3): 263–8. DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-3-263-268.
  14. Global Initiative for asthma — NHLBI/WHO Workshop Report/ National Heart Lung Blood Institute Updated 2016. <https://ginasthma.org/> (дата обращения: 19.09.2018).
  15. Чучалин А. Г., Айсанов З. Р., Чикина С. Ю., Черняк А. В., Калманова Е. Н. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по использованию метода спирометрии. *Пульмонология*. 2014; (6): 11–23.
  16. Koh YY, Kang H, Nah KM, Kim CK. Absence of association of peripheral blood eosinophilia or increased eosinophil cationic protein with bronchial hyperresponsiveness during asthma remission. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 91 (3): 297–302. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)63533-8.
  17. Karjalainen J, Hulkkonen J, Nieminen MM, Huhtala H, Aromaa A, Klaukka T, et al. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33 (1): 78–83. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2003.01577.x
  18. Huang ZY, Cheng BJ, Wan Y, Zhou C. Meta-analysis of the IL10 promoter polymorphisms and pediatric asthma susceptibility. *Genet Mol Res*. 2016; 15 (2): gmr.15028320 DOI: 10.4238/gmr.15028320.
  19. Nie W, Fang Z, Li B, Xiu QY. Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Cytokine*. 2012; 60 (3): 849–55. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.08.023.
  20. Tang L, Lin HG, Chen BF. Association of IL4 promoter polymorphisms with asthma: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2014; 13 (1): 1383–94.
  21. Heinzmann A, Mao X-Q, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics*. 2000; 9 (4): 549–59. DOI: 10.1093/hmg/9.4.549.
  22. Liu Z, Li P, Wang J, Fan Q, Yan P, Zhang X, et al. A meta-analysis of IL13 polymorphisms and pediatric asthma risk. *Med Sci Monit*. 2014; (20): 2617–23. DOI: 10.12659/MSM.891017.
  23. Mei Q, Qu J. Interleukin-13 +2044 G/A and +1923C/T polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96 (51): e9203. DOI: 10.1097/MD.00000000000009203.
  24. Zheng XY, Guan WJ, Mao C, Chen HF, Ding H, Zheng JP, et al. Interleukin-10 promoter 1082/2819/2592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopical asthma: a meta-analysis. *Lung*. 2014; 192 (1): 65–73.
  25. Guerra S. Clinical remission of asthma: what lies beyond? *Thorax*. 2005; 60 (1): 5–6. DOI: 10.1136/thx.2004.033480.

## References

1. Nenasheva NM. Atopicheskaya bronhial'naya astma: rol' allergen-spezificheskoy immunoterapii. *Rossiiskij allergologicheskij zhurnal*. 2015; (6): 54–67. Russian.
2. Mathias RA. Introduction to genetics and genomics in asthma: genetics of asthma. *Adv Exp Med Biol*. 2014; (795): 125–55. DOI: 10.1007/978-1-4614-8603-9\_9.
3. Baye TM, Martin LJ, Khurana Hershey GK. Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126 (3): 425–36. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.05.025.
4. Gupta J, Johansson E, Bernstein JA, Chakraborty R, Khurana Hershey GK, Rothenberg ME, et al. Resolving the etiology of atopic disorders by genetic analysis of racial ancestry. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138 (3): 676–99. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.02.045.
5. Halapi E, Hakonarson H. Recent development in genomic and proteomic research for asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2004; 10 (1): 22–30. DOI: 10.1097/00063198-200401000-00005.
6. Ober C, Hoffja S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006; 7 (2): 95–100. DOI:10.1038/sj.gene.6364284.
7. Smolnikova MV, Freidin MB, Smirnova SV. Cytokine genes as genetic markers of controlled and uncontrolled atopical bronchial asthma. *Medical Immunology (in Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*. 2017; 19 (5): 605–14. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614. Russian.
8. Karunas AS, Fedorova YY, Ramazanov NN, Galimova ES, Gimalova GF, Guryeva LL, et al. Evaluation of a role of cytokine gene polymorphisms in development of bronchial asthma in the Republic of Bashkortostan. *Russian Pulmonology*. 2012; (5): 37–40. Russian.
9. Marenholz I, Esparza-Gordillo J, Rüschendorf F, Bauerfeind A, Strachan DP, Spycher BD, et al. Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march. *Nat Commun*. 2015; (6): 8804. DOI: 10.1038/ncomms9804.
10. Belsky DW, Sears MR, Hancox RJ, Harrington H, Houts R, Moffitt TE, et al. Polygenic risk and the development and course of asthma: Evidence from a 4-decade longitudinal study. *Lancet Respir Med*. 2013; 1 (6): 453–61. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70101-2.
11. Tiomisto LE, Ilmarinen P, Kankaanranta H. Prognosis of new-onset asthma diagnosed in adult age. *Respir Med*. 2015; 109 (8): 944–54. DOI: 10.1016/j.rmed.2015.05.001.
12. Javed A, Yoo KH, Agarwal K, Jacobson RM, Li X, Juhn YJ, et al. Characteristics of children with asthma who achieved remission of asthma. *J Asthma*. 2013; 50 (5): 472–9. DOI: 10.3109/02770903.2013.787625.
13. Ignatova GL, Zhorina YV, Abramovskikh OS, Zherebtsova IA. Clinical course and remission rate in adult patients with atopical asthma in Chelyabinsk. *Russian Pulmonology*. 2019; 29 (3): 263–8. DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-3-263-268. Russian.
14. Global Initiative for asthma — NHLBI/WHO Workshop Report/ National Heart Lung Blood Institute Updated 2016. <https://ginasthma.org/> (дата обращения: 19.09.2018).
15. Chuchalin AG, Aysanov ZR, Chikina SY, Chernyak AV, Kalmanova EN. Federal guidelines of Russian Respiratory Society on spirometry. *Russian Pulmonology*. 2014; (6): 11–23. Russian.
16. Koh YY, Kang H, Nah KM, Kim CK. Absence of association of peripheral blood eosinophilia or increased eosinophil cationic protein with bronchial hyperresponsiveness during asthma remission. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 91 (3): 297–302. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)63533-8.
17. Karjalainen J, Hulkkonen J, Nieminen MM, Huhtala H, Aromaa A, Klaukka T, et al. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33 (1): 78–83. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2003.01577.x

18. Huang ZY, Cheng BJ, Wan Y, Zhou C. Meta-analysis of the IL10 promoter polymorphisms and pediatric asthma susceptibility. *Genet Mol Res.* 2016; 15 (2): gmr.15028320 DOI: 10.4238/gmr.15028320.
19. Nie W, Fang Z, Li B, Xiu QY. Interleukin-10 promoter polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Cytokine.* 2012; 60 (3): 849–55. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.08.023.
20. Tang L, Lin HG, Chen BF. Association of IL4 promoter polymorphisms with asthma: a meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2014; 13 (1): 1383–94.
21. Heinzmann A, Mao X-Q, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics.* 2000; 9 (4): 549–59. DOI: 10.1093/hmg/9.4.549.
22. Liu Z, Li P, Wang J, Fan Q, Yan P, Zhang X, et al. A meta-analysis of IL13 polymorphisms and pediatric asthma risk. *Med Sci Monit.* 2014; (20): 2617–23. DOI: 10.12659/MSM.891017.
23. Mei Q, Qu J. Interleukin-13 +2044 G/A and +1923C/T polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96 (51): e9203. DOI: 10.1097/MD.00000000000009203.
24. Zheng XY, Guan WJ, Mao C, Chen HF, Ding H, Zheng JP, et al. Interleukin-10 promoter 1082/2819/2592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung.* 2014; 192 (1): 65–73.
25. Guerra S. Clinical remission of asthma: what lies beyond? *Thorax.* 2005; 60 (1): 5–6. DOI: 10.1136/thx.2004.033480.

## ЦИКЛОДИАЛИЗ *AB EXTERNO* С ИМПЛАНТАЦИЕЙ КОЛЛАГЕНОВОГО ДРЕНАЖА В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ГЛАУКОМЫ

А. С. Шрадқа<sup>1</sup>✉, В. Кумар<sup>2</sup>, М. А. Фролов<sup>1</sup>, Г. Н. Душина<sup>2</sup>, А. И. Беззаботнов<sup>2,3</sup>, К. А. Абу Заалан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО Центр микрохирургии глаза «Про зрение», Химки, Московская область, Россия

<sup>3</sup> Офтальмологическое отделение ГБУЗ МО «Сходненская городская больница», Химки, Московская область, Россия

Глаукома является актуальнейшей проблемой офтальмологии. Будучи одной из главных причин необратимой слепоты на территории Российской Федерации, она занимает лидирующее место в нозологической структуре инвалидности по зрению среди трудоспособного населения. Хирургическое вмешательство зачастую является единственным методом лечения рефрактерной глаукомы. Целью данного исследования было оценить безопасность и эффективность гипотензивной операции (ГО) клапанного циклодиализа *ab externo* с имплантацией в супрацилиарное пространство нерассасывающегося коллагенового дренажа (НКД) у пациентов с продвинутыми стадиями развития первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Критериями оценки безопасности и эффективности были: динамика внутриглазного давления (ВГД), количество используемых гипотензивных средств, потребность в повторном хирургическом вмешательстве и наличие осложнений. В результате наблюдения за 26 пациентами (26 глаз) с продвинутыми стадиями ПОУГ через 12 месяцев после оперативного вмешательства было зарегистрировано снижение ВГД на 34% от исходного уровня (с  $29,5 \pm 6,8$  до  $18,8 \pm 4,3$  мм рт. ст.). Количество используемых гипотензивных средств сократилось с  $2,8 \pm 0,9$  до  $0,6 \pm 0,9$ . Успешность проведенной ГО оценивали согласно рекомендациям Всемирной глаукомной ассоциации: полный успех был достигнут в 73,1% случаев, а признанный — в 26,9% случаев. Неудачных исходов от оперативного лечения не наблюдали. Предложенное хирургическое лечение показало высокую эффективность и безопасность снижения ВГД, сокращение числа используемых гипотензивных средств и минимальное количество осложнений у пациентов с продвинутыми стадиями ПОУГ. Таким образом, метод клапанного циклодиализа *ab externo* с имплантацией в супрацилиарное пространство НКД можно рекомендовать в качестве терапии пациентов с ПОУГ в связи с его высокой эффективностью и безопасностью.

**Ключевые слова:** глаукома, хирургическое лечение, внутриглазное давление, циклодиализ *ab externo*, увеасклеральный отток внутриглазной жидкости

**Информация о вкладе авторов:** А. С. Шрадқа — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста статьи, оформление графиков и рисунков; В. Кумар — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание и редактирование текста статьи; М. А. Фролов — концепция и дизайн исследования, редактирование; Г. Н. Душина — концепция и дизайн исследования; сбор и обработка материала, редактирование текста статьи; А. И. Беззаботнов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; К. А. Абу Заалан — сбор и обработка материала.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом медицинского института Российского университета дружбы народов, (протокол № 16 от 17 ноября 2016 г.); все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Ахмад Салех Солиман Шрадқа  
проезд Шокальского, д. 13, корп. 1, г. Москва, 127221; sh1988moscow@gmail.com

Статья получена: 16.08.2019 Статья принята к печати: 08.10.2019 Опубликована онлайн: 23.10.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.068

## CYCLODIALYSIS *AB EXTERNO* WITH IMPLANTATION OF A COLLAGEN IMPLANT IN SURGICAL MANAGEMENT OF GLAUCOMA

Shradqa AS<sup>1</sup>✉, Kumar V<sup>2</sup>, Frolov MA<sup>1</sup>, Dushina GN<sup>2</sup>, Bezzabotnov AI<sup>2,3</sup>, Abu Zaalan KA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Eye microsurgery center «Pro zrenie», Moscow province, Russia

<sup>3</sup> Ophthalmic unit of Skhodnya City Hospital, Khimki, Moscow province, Russia

Glaucoma is one of the main causes of irreversible blindness in the Russian Federation and it is the leading cause of visual impairments among working age population. The primary goal of glaucoma therapy is to preserve the visual function, which is mainly achieved through persistent normalization of IOP by instillation of hypotensive drugs, laser therapy and/or surgery. In this clinical study safety and efficacy of a glaucoma surgical technique implying valve cycloodialysis *ab externo* with implantation of a non-absorbable collagen implant (NACI) (Xenoplast, Dubna-Biofarm, Russia) in the supraciliary space were evaluated. All patients exhibited moderate and severe primary open-angle glaucoma (POAG). The efficacy assessment criteria were intraocular pressure (IOP) dynamics, use of hypotensive medications, need for repeat surgical intervention and complications. A total of 26 patients (26 eyes) were operated upon and under observation. Twelve months after surgery, 34% IOP decrease from the baseline level was observed: from  $29.5 \pm 6.8$  to  $18.8 \pm 4.3$  mmHg. The amount of hypotensive medications used reduced from  $2.8 \pm 0.9$  to  $0.6 \pm 0.9$ . Applying the criteria recommended by the World Glaucoma Association, complete success was registered in 73.1% of patients and partial success — in 26.9% patients. No surgery ended in a failure through the follow-up period. Post-operatively, one patient developed hyphema, 2 patients had some blood elements in aqueous humor and 1 patient had shallow anterior chamber (AC). The suggested surgical technique proved to be an efficient and safe way to decrease IOP and reduce the number of hypotensive medications and had a minimal number of complications associated with the surgery, therefore it can be recommended as a method of choice in patients with advanced stage POAG.

**Keywords:** glaucoma, glaucoma surgery, intraocular pressure, cycloodialysis *ab externo*, uveoscleral outflow

**Author contribution:** Shradqa AS — study concept and design, data collection and processing, statistical processing, article authoring, design of graphs and drawings; Kumar V — study concept and design, data collection and processing, statistical processing, article authoring and editing, overall responsibility; Frolov MA — editing and overall responsibility; Dushina GN — study concept and design, data collection and processing, article editing; Bezzabotnov AI — study concept and design; data collection and processing; Abu Zaalan KA — data collection and processing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Peoples' Friendship University of Russia Medical University Ethics Committee (protocol №16 of November 17, 2016); the patients gave informed consent to participate in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Ahmad S. Shradqa  
proezd Shokalskogo, 13, bl. 1, Moscow, 127221; sh1988moscow@gmail.com

Received: 16.08.2019 Accepted: 08.10.2019 Published online: 23.10.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.068

Глаукома является актуальнейшей проблемой офтальмологии, будучи одной из главных причин необратимой слепоты на территории Российской Федерации (РФ). Она занимает лидирующее место в нозологической структуре инвалидности по зрению среди трудоспособного населения [1, 2]. В 2013 г. в РФ на диспансерном учете состояло 1 180 708 пациентов с данным диагнозом. Согласно сообщению Всемирной организации здравоохранения, число людей, страдающих глаукомой, в мире колеблется от 60,5 до 105 млн человек, и каждую минуту от нее слепнет 1 взрослый, каждые 10 мин — 1 ребенок [1].

Глаукома — многофакторное заболевание, и на сегодняшний день отсутствует единое мнение о ее этиологии и патогенезе. Основной целью лечения глаукомы является сохранение зрительных функций. Оно может быть достигнуто главным образом благодаря стойкой нормализации внутриглазного давления (ВГД) путем инстилляций гипотензивных препаратов или проведением лазерного и/или хирургического лечения [3, 4]. По некоторым данным, 62–82% пациентов с впервые выявленной глаукомой имеют уже продвинутые стадии развития патологического процесса, при которых отсутствует долгосрочная эффективность местных гипотензивных препаратов [5].

Наиболее перспективным направлением развития хирургии первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) представляется активация оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ) по естественным путям [6–9]. Существуют трабекулярный и увеасклеральный пути (УСП). УСП обладает огромным потенциалом в хирургическом лечении ПОУГ благодаря его анатомическим и физиологическим особенностям. По мнению некоторых офтальмологов, существует связь между УСП оттока и лимфатической системой глазного яблока и орбиты [10]. В основе существующих в настоящее время гипотензивных операций (ГО), направленных на активацию УСП, лежит проведение циклодиализа с имплантацией в супрацилиарное пространство различных видов дренажей. В РФ наиболее распространена имплантация полосок аутосклеры в супрацилиарное пространство [9]. В мире также применяют имплантирование таких дренажей, как: CyPass Micro-Stent (Transcend Medical; США); iStent Supra (Glaukos; США); Gold Shunt (SOLX; США); STARFlo (iSTAR Medical; Бельгия); Aquashunt (OPKO Health Inc.; США) [11–13].

Нами разработан хирургический способ активации УСП оттока ВГЖ путем проведения циклодиализа *ab externo* с имплантацией в супрацилиарное и супрахориоидальное пространства нерассасывающегося коллагенового дренажа (НКД) «Ксенопласт» (ООО «Дубна-Биофарм»; Россия), применяющегося для пролонгации гипотензивного эффекта при операции непроникающей глубокой склерэктомии.

Целью было оценить безопасность и эффективность снижения ВГД при операции клапанного циклодиализа *ab externo* с имплантацией в супрацилиарное пространство НКД «Ксенопласт» у пациентов с продвинутыми стадиями ПОУГ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 26 пациентов в возрасте от 54 до 87 лет (средний возраст составил  $73,0 \pm 8,3$  года) с продвинутыми стадиями ПОУГ. Из них: 12 мужчин и 14 женщин (26 глаз), 17 пациентов (65,4%) с далекозашедшей и 9 пациентов (34,6%) — с терминальной стадиями.

Критерии включения: ПОУГ; сочетанная патология (ПОУГ и катаракта); субкомпенсация ВГД на гипотензивном режиме; информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: узкоугольная глаукома, вторичная глаукома, острый приступ глаукомы, врожденная глаукома. Ранее проведенная экстракция катаракты, а также ранее проведенные ГО не являлись критериями исключения из исследования. Срок послеоперационного наблюдения составил 12 месяцев.

У 18 пациентов (69,2%) было проведено одномоментное хирургическое лечение сочетанной патологии. У 13 пациентов (50%) наблюдали псевдоэкссфолиативный синдром. Число пациентов с ранее оперированной глаукомой составило 11 (42,3%). Среднее количество ранее проведенных хирургических вмешательств по поводу глаукомы составило в среднем 1,6 операций.

Все пациенты до проведения хирургического лечения по поводу глаукомы применяли местную гипотензивную терапию в виде монотерапии или комбинации двух или более гипотензивных препаратов. Монотерапию получили 2 пациента (7,7%), комбинацию из двух гипотензивных препаратов — 5 пациентов (19,2%), комбинацию из трех гипотензивных препаратов — 15 пациентов (57,7%), комбинацию из четырех гипотензивных препаратов — 4 пациента (15,4%). Несмотря на проведение местного гипотензивного лечения, средний уровень ВГД до хирургического лечения составил  $29,5 \pm 6,8$  мм рт. ст.

Перед хирургическим лечением пациентам проводили стандартное офтальмологическое обследование: визометрию, тонометрию по Маклакову (10,0 г), биомикроскопию, офтальмоскопию, гониоскопию, ультразвуковую биомикроскопию (УБМ), В-сканирование и оптическую когерентную томографию (ОКТ). Состояние созданной циклодиализной щели (ЦЩ) оценивали с помощью однозеркальной гониолинзы, В-сканирования и УБМ (Marvel B-scanwith UBM, Appasamy medical equipments (P) Ltd; Индия), с частотой датчика 50 МГц и 30 МГц, мощностью до 30 Дб и ОКТ (Visante OCT, Zeiss; Германия).

Послеоперационное наблюдение проводили в сроки: 1 день, 1 неделя, 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев и 1 год. Гониоскопию, тонометрию, проверку остроты зрения проводили при каждом визите. Состояние угла передней камеры (УПК), ЦЩ и положение дренажа фиксировали методом фоторегистрации с помощью щелевой лампы «AIA 11» (Appasamy associates; Индия) и встроенного в нее цифрового фотоаппарата (Canon; КНР).

Основными критериями оценки безопасности и эффективности проведенного хирургического вмешательства служили динамика ВГД, количество используемых гипотензивных средств, частота интра- и послеоперационных осложнений, необходимость повторного хирургического вмешательства по поводу глаукомы. Результаты исследования обрабатывали методом описательной статистики с определением среднего значения, 95%-го доверительного интервала (ДИ) и стандартного отклонения с оценкой критерия достоверности (*p*) по Стьюденту. Для статистической обработки цифровых данных использовали программу SPSS Statistics (IBM) 22.0 (StatSoft; США) для Windows 10.

Для анализа данных тонометрическое ВГД переводили в истинное ВГД ( $P^0$ ), используя таблицу Нестерова–Вургафта–Киселева–Таняшиной [14].

Успешность ГО оценивали согласно рекомендациям Всемирной глаукомной ассоциации (World Glaucoma Association) [15]. Критериями оценки успеха были:



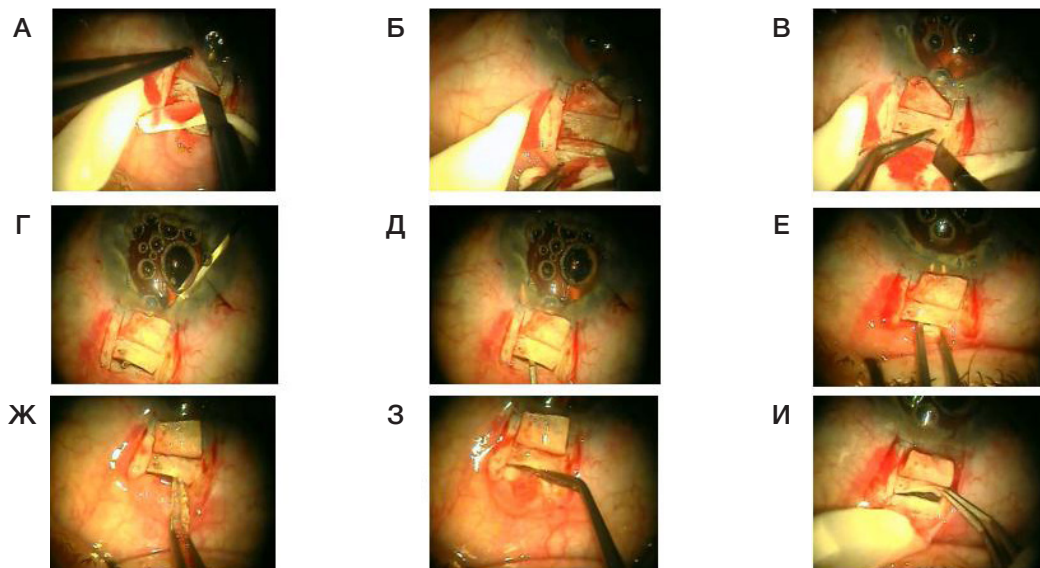
значения  $P^{\circ} \leq 15$  и  $\leq 12$  мм рт. ст. в зависимости от стадий развития глаукомы (III и IV соответственно) или снижение ВГД не менее чем на 30% от исходного, а также  $P^{\circ} > 6$  мм рт. ст.

Успех считали полным, если давление цели удавалось достигнуть без гипотензивных средств, признанным — на гипотензивной терапии. Неудачным считали случай, если давление цели не удалось достигнуть с помощью медикаментозной терапии, а также если было необходимо повторное хирургическое вмешательство.

### Техника операции

После двукратной обработки операционного поля 0,5% спиртовым раствором хлоргексидина (этанолом) и 5% водным раствором повидона-йода (Бетадин) (EGIS; Венгрия), местной топической анестезии раствором Алкаина (Alcon; США) накладывали фиксационный шов на роговицу (7–0 полипропилен) в области лимба, через нижний лимб на 6 часов. Выполняли парацентез на 7–8 часах или 4–5 часах, в зависимости от оперируемого глаза (правый или левый соответственно). В ПК вводили 0,2 мл раствора карбахола (0,01%) (медикаментозное сужение зрачка) и 0,3 мл раствора гиалуроновой кислоты (1,4%) (для поддержания глубины ПК глаза, профилактики послеоперационной гипотонии и гифемы). Производили конъюнктивотомию по лимбу от 10 до 13 часов. Отсепаровывали конъюнктивальный лоскут размером 5 мм. При необходимости производили экономную диатермокоагуляцию поверхностных сосудов склеры. Отступая 5 мм от лимба, с помощью остроконечного лезвия выкраивали поверхностный прямоугольный склеральный лоскут основанием к лимбу на  $\frac{1}{2}$  толщины склеры, размером  $3 \times 2$  мм (рис. 1А). Далее на оставшемся глубокоом слое склеры, отступая 4,0 мм от задней границы хирургического лимба, и параллельно лимбу производили

сквозной разрез до цилиарного тела (рис. 1Б). По краям созданного разреза перпендикулярно лимбу производили два сквозных вертикальных разреза склеры длиной 1 мм, создавая таким образом клапан (рис. 1В). Далее через парацентез в ПК вводили шпатель и под визуальным контролем проводили циклодиализ *ab interno* с выходом конца шпателя через разрез склеры (рис. 1Г). Затем извлекали шпатель из ПК и проводили циклодиализ *ab externo* через склеральный разрез с входом шпателя в ПК (рис. 1Д). Созданный циклодиализный тоннель (ЦТ) заполняли 0,1–0,2 мл когезивного вискоэластика (1,4% гиалуроновой кислоты). В тоннель через склеральный разрез вводили изогнутый пинцет с закрытыми браншами, пока его передний конец не визуализировался через роговицу в ПК. После этого разжимали бранши пинцета, создавая таким образом щель на всю ширину склерального разреза (рис. 1Е). Ширина ЦТ составляла 3 мм, длина — 4 мм, что обеспечивало прямое и надежное сообщение между ПК и супрацилиарным пространством. Далее с помощью введенного шпателя под задней губой склерального разреза в сторону супрахориоидального пространства проводили ее дилатацию. Затем изогнутым пинцетом захватывали НКД, заранее смоченный в сбалансированном солевом растворе, таким образом, чтобы весь дренаж находился между браншами, а его передний конец находился на 0,5 мм от переднего края браншей (рис. 1Ж). Пинцет с НКД вводили через склеральный разрез под визуальным контролем, пока не был виден передний конец пинцета и дренажа в углу ПК. После этого бранши разжимали и аккуратно извлекали пинцет. Задний конец дренажа заправляли под заднюю губу склерального разреза в супрахориоидальное пространство (рис. 1З) и проверяли положение НКД в тоннеле (рис. 1И). Поверхностный склеральный лоскут укладывали на место и фиксировали узловыми швами (нейлон 10–0). Конъюнктивальный лоскут ушивали к лимбу



**Рис. 1.** Техника проведения клапанного циклодиализа *ab externo* с имплантацией НКД «Ксенопласт». **А.** Этап формирования поверхностного склерального лоскута ( $3 \times 2$  мм) основанием к лимбу. **Б.** Этап выполнения сквозного горизонтального разреза глубоких слоев склеры до цилиарного тела. **В.** Этап формирования клапана путем выполнения двух вертикальных разрезов длиной 1,0 мм, по краям горизонтального склерального разреза; **Г.** Этап выполнения циклодиализа *ab interno*. С помощью шпателя, введенного через парацентез, отслаивали склеральную шпору от цилиарного тела с выходом конца шпателя через разрез склеры. **Д.** Этап выполнения циклодиализа *ab externo*. Вводили шпатель через склеральный разрез с входом в ПК и отслаивали цилиарное тело от склеры на всю длину разреза. **Е.** Этап расширения ЦТ. После визуализации переднего конца введенного изогнутого пинцета с закрытыми браншами в тоннель через роговицу разжимали бранши пинцета на всю ширину разреза. **Ж.** Этап имплантации НКД в супрацилиарное пространство. Захват ранее смоченного в сбалансированном солевом растворе НКД браншами пинцета. Вводили пинцет с НКД в тоннель через склеральный разрез до угла ПК. **З.** Этап имплантации НКД в супрахориоидальное пространство. Захват заднего конца дренажа пинцетом и заправление его под заднюю губу склерального разреза в супрахориоидальное пространство. **И.** Проверка положения НКД в ЦТ



узловыми швами. Проводили герметизацию роговичных разрезов гидратацией стромы роговицы. Операцию заканчивали введением под конъюнктиву раствора дексаметазона. С целью профилактики бактериальных осложнений в конъюнктивальную полость закладывали антибактериальную мазь, на глаз накладывали стерильную асептическую повязку. Швы с конъюнктивального лоскута снимали на 7-й день после операции.

Таким образом, в результате операции создавали достаточно широкий ЦТ, что обеспечило надежное сообщение ПК с супрацилиарным пространством, которое в свою очередь свободно сообщается с супрахориоидальным пространством, являющимся главным звеном в УСП оттока ВГЖ.

В данном исследовании применяли НКД «Ксенопласт» размерами  $6,0 \times 1,0 \times 0,5$  мм вместо стандартных размеров  $4,0 \times 1,0 \times 0,5$  мм, изготовленный по специальному заказу. Такая длина необходима для того, чтобы дренаж достиг супрахориоидального пространства, и при этом в углу ПК осталось около 1 мм дренажа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний уровень ВГД до оперативного лечения составил  $29,5 \pm 6,8$  мм рт. ст. (95% ДИ — 26,6–32,3). Спустя 12 месяцев после операции средний уровень ВГД составил  $18,8 \pm 4,3$  мм рт. ст. (95% ДИ — 16,9–20,6;  $p \leq 0,01$ ), что соответствует снижению среднего уровня ВГД на  $33,8 \pm 18,8\%$  от исходного. Динамика снижения уровня

ВГД в разные сроки послеоперационного наблюдения представлена на рис. 2.

В послеоперационном периоде было зарегистрировано достоверное снижение уровня ВГД, которое составило через 1, 3, 6 и 12 месяцев после операции  $37,6 \pm 16,4\%$ ,  $33,6 \pm 10,7\%$ ,  $32,1 \pm 13,0\%$  и  $33,8 \pm 18,8\%$  от исходного уровня соответственно.

Среднее число используемых до оперативного лечения гипотензивных средств составило  $2,8 \pm 0,9$  (95% ДИ — 2,5–3,2). Число используемых гипотензивных средств на сроке послеоперационного наблюдения 12 месяцев составило  $0,6 \pm 0,9$  (95% ДИ — 0,2–0,9;  $p \leq 0,01$ ), что соответствует снижению их количества более чем на 80% от исходного. На рис. 3 представлена динамика изменения количества используемых гипотензивных средств в разные сроки послеоперационного наблюдения.

Полный успех был достигнут в 84,6% случаев (22 пациента) на сроках послеоперационного наблюдения 1 и 3 месяца, в 80,8% случаев (21 пациент) — на сроке наблюдения 6 месяцев и в 73,1% случаев (19 пациентов) — на сроке наблюдения 12 месяцев. Признанный успех был достигнут на сроках послеоперационного наблюдения 1, 3, 6 и 12 месяцев в 15,4% случаев (4 пациента), 15,4% случаев (4 пациента), 19,2% случаев (5 пациентов) и 26,9% случаев (7 пациентов) соответственно. В данном клиническом исследовании неудачных исходов проведенного хирургического лечения не наблюдали — у всех пациентов в течение года после операции достигнута нормализация ВГД.

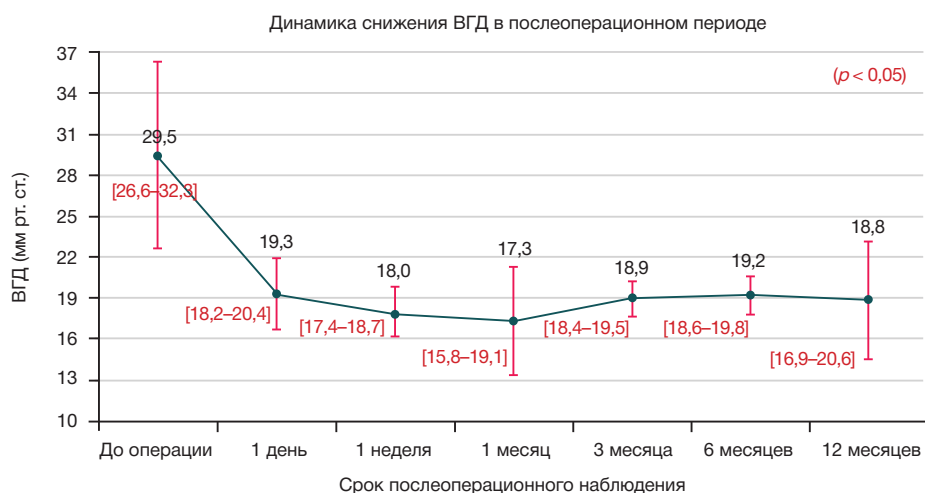


Рис. 2. Динамика снижения ВГД у пациентов после проведения циклодиализа *ab externo* в разные сроки послеоперационного наблюдения

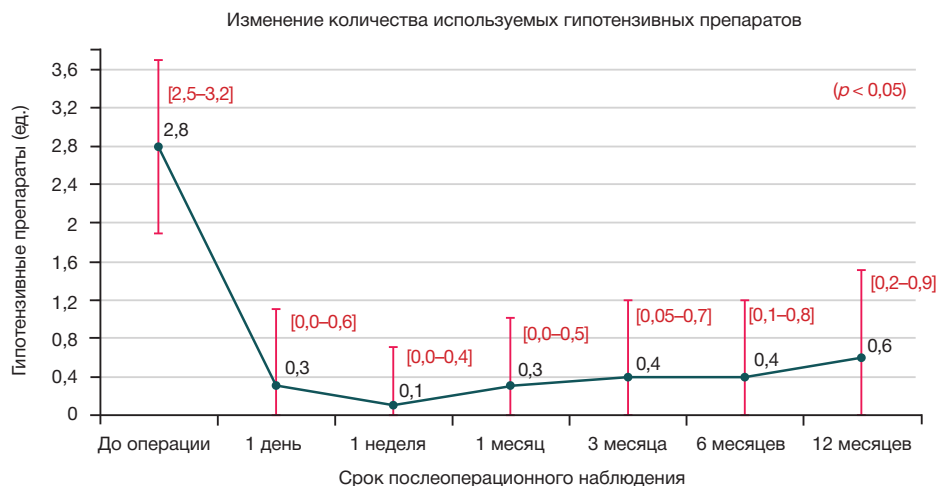


Рис. 3. Динамика изменения количества гипотензивных препаратов, применяемых пациентами с ПОУГ в разные сроки послеоперационного наблюдения

В тех случаях, где имел место признанный успех, была назначена инстилляционная гипотензивная терапия (1%-й и 2%-й пилокарпин, 0,5%-й тимолол, 0,005%-й латанопрост, 2%-й дорзоламид и их комбинация), на фоне которой ВГД снизилось до значений, не превышающих давления цели.

Во время операции в большинстве случаев имела место легкая геморрагия в зоне проведения циклодиализа, вызванная интраоперационными манипуляциями. В этих случаях перед герметизацией роговичных разрезов ПК промывали сбалансированным солевым раствором.

#### Наблюдение в послеоперационном периоде

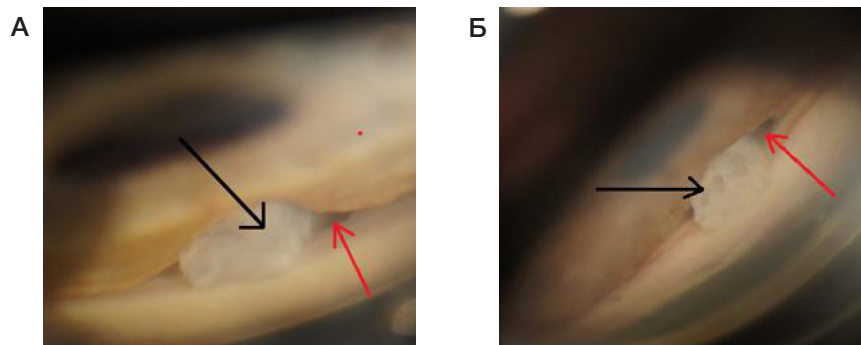
**Ранний послеоперационный период.** Фльтрационная подушка. Плоская фильтрационная подушка была отмечена у 7 пациентов (27%) на первые сутки после операции, у 4 пациентов (15%) — на первой неделе, и у одного пациента (4%) на сроке наблюдения 1 месяц. После 3 месяцев фильтрационной подушки не было ни в одном случае.

**Гифема.** За весь период послеоперационного наблюдения гифему наблюдали лишь в одном случае. Уровень гифемы составил меньше 1 мм с самостоятельной резорбцией через 3–5 дней после операции. Взвесь кровяных элементов во влаге ПК наблюдали в двух случаях на сроке наблюдения 1 день после операции и в одном случае на сроке наблюдения 1 неделя после операции, с самостоятельным разрешением.

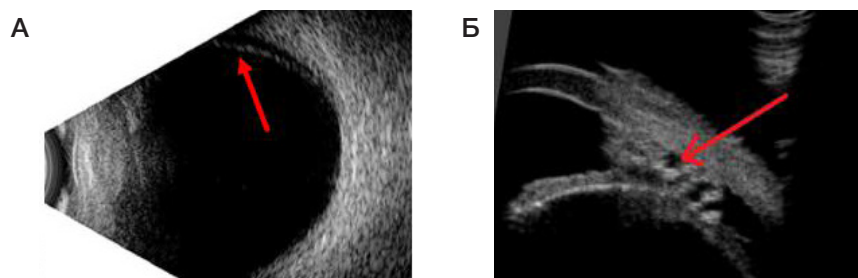
**Гипотония и мелкая ПК.** За гипотонию принимали уровень  $P^{\circ}$  меньше 6 мм рт. ст., что соответствует тонометрическому ВГД 14,5 мм рт. ст., измеренному по Маклакову грузиком 10,0 г. Минимальное значение ВГД в послеоперационном периоде составило 15 мм рт. ст., т. е. гипотонию не наблюдали ни в одном случае. Мелкая ПК была в одном случае, когда проводили одномоментное хирургическое лечение сочетанной патологии с имплантацией интраокулярной линзы ирис-кло (Appasamy associates; Индия). В том же случае имел место зрачковый блок, потребовалось проведение лазерной иридэктомии, в результате чего был ликвидирован зрачковый блок и обеспечено углубление ПК.

**Поздний послеоперационный период.** Осложнений не наблюдали. По данным гониоскопического обследования, НКД стабильно сохранял свое положение в созданном ЦТ: смещения или полной дислокации не было (рис. 4). Явных признаков воспалительного процесса так же не наблюдали.

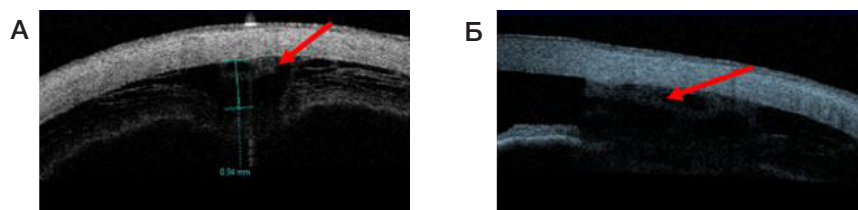
**Состояние сформированных путей оттока ВГЖ.** Для оценки состояния созданного ЦТ и положения дренажа в тоннеле проводили ультразвуковое В-сканирование и УБМ зоны проведенного оперативного вмешательства (рис. 5), а также ОКТ переднего отрезка глаза в продольном и поперечном срезе (рис. 6). С помощью этого подтверждали сохранность ЦТ через 12 месяцев после операции. НКД находился в супрацилиарном и супрахориоидальном пространствах, которые были расширены.



**Рис. 4.** Гониоскопическое изображение угла ПК. **А.** Один месяц после операции. **Б.** 12 месяцев после операции. НКД (черная стрелка) находится в созданном ЦТ, хорошо определяется приоткрытая ЦЩ (красная стрелка)



**Рис. 5.** Ультразвуковое исследование зоны оперативного вмешательства. Срок наблюдения 12 месяцев после операции. **А.** Ультразвуковое В-сканирование. Хорошо визуализируется созданный ЦТ. **Б.** Ультразвуковая биомикроскопия. НКД находится в созданном тоннеле. Дислокация дренажа отсутствует. Хорошо визуализируется пористая структура дренажа



**Рис. 6.** ОКТ переднего отрезка глаза. Срок наблюдения 12 месяцев после операции. **А.** Поперечный срез. **Б.** Продольный срез. Хорошо определяется НКД в супрацилиарном и супрахориоидальном пространствах. Пространства расширены

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день существует большое количество ГО, направленных на активацию оттока ВГЖ по естественным путям [6–9, 11, 13]. Наибольший интерес представляет хирургическое воздействие на увеосклеральный отток ВГЖ [6, 9, 11, 13]. Большинство существующих на данный момент операций, направленных на активацию УСП, включают в себя элементы циклодиализа [16–18]. С целью активации УСП оттока ВГЖ ряд авторов предложили использовать аутосклеру в качестве дренажа [19].

В результате двухлетнего наблюдения за 55 пациентами с рефрактерной глаукомой после проведения операции циклодиализа *ab externo* с имплантацией Gold Shunt было отмечено, что стабилизация уровня ВГД с применением гипотензивной терапии достигнута в 67,3% случаев. Всего у 3 пациентов (5,5%) удалось достичь компенсации уровня ВГД без инстилляций гипотензивных средств. В послеоперационном периоде имели место такие осложнения, как цилиохориоидальная отслойка, отек роговицы и чрезмерная фильтрация. Главным фактором, определившим недостаточную эффективность имплантации Gold Shunt, является формирование тонкой фиброзной мембраны, облитерирующей передний конец дренажного устройства [20].

В литературе имеется сообщение о неэффективности имплантации Gold Shunt у пациентов с далекозашедшей стадией глаукомы, так как в 77% случаев потребовалось повторное проведение гипотензивного хирургического вмешательства из-за декомпенсации уровня ВГД [21]. Проводили гистологическое исследование у эксплантированных Gold Shunt 5 пациентов после хирургического вмешательства и обнаружили, что причиной неудачных исходов являлась фиброзная ткань, препятствовавшая оттоку ВГЖ через просвет Gold Shunt и ЦЩ [22].

Хорошо известно устройство CyPass Micro-Stent для имплантации в супрацилиарное пространство доступом *ab interno* в хирургическом лечении сочетанной патологии, среднее ВГД при данной терапии через 12 месяцев снизилось всего лишь на 14% от исходного [23]. При этом наблюдали такие осложнения, как временная гипотония, транзиторное повышение ВГД и обструкция просвета микрошунта. Другие исследователи также сообщили о обструкции просвета CyPass Micro-Stent и облитерации ЦЩ как об основной причине декомпенсации ВГД [24]. Некоторые офтальмохирурги для реканализации просвета дренажа применяли YAG-лазер, в результате чего восстанавливали отток ВГЖ через просвет микрошунта и достигали нормального уровня ВГД [25]. Компания Alcon недавно сняла с продажи микрошунт CyPass в связи со значимой потерей эндотелиальных клеток через 5 лет после имплантации.

На сегодняшний день проведены единичные исследования с применением систем Aquashunt и iStent Supra в хирургическом лечении глаукомы [11, 26]. Следует отметить, что Aquashunt имплантируют в ЦЩ методом *ab externo*, а iStent Supra — методом *ab interno*.

Также описано влияние операции факэмульсификации на уровень ВГД в раннем и отдаленном послеоперационном периоде у пациентов с открытым углом ПК [27, 28]. Некоторые авторы отметили повышение уровня ВГД в раннем послеоперационном периоде (до двух недель) на 3–3,5 мм рт. ст. Затем к концу первого месяца после операции уровень ВГД возвращался к дооперационным

значениям. А через 3 месяца после операции уровень ВГД снижался на 3,1 мм рт. ст. от исходного уровня [27]. В другом исследовании сообщают о снижении уровня ВГД на  $1,7 \pm 3,1$  мм рт. ст. от исходного уровня спустя 12 месяцев после операции [28]. В нашей работе одномоментное хирургическое лечение сочетанной патологии проводили у 18 пациентов (69,2% случаев). Уровень ВГД снизился на  $11 \pm 7,3$  мм рт. ст. от исходного через 12 месяцев после операции. Достоверное снижение ВГД через 12 месяцев после операции доказывает преобладание гипотензивного эффекта проведенной нами ГО над гипотензивным эффектом факэмульсификации.

Предложенный метод хирургического лечения продвинутых (далекозашедшей и терминальной) стадий развития ПОУГ основан на проведении циклодиализа *ab externo* с имплантацией НКД «Ксенопласт». Имплантация дренажа в созданный ЦТ обеспечивает долгосрочное и эффективное сохранение тоннеля в приоткрытом состоянии, что приводит к активации УСП оттока ВГЖ на длительный срок и к достижению стойкого гипотензивного эффекта. Тщательная герметизация операционного доступа помогает избежать фильтрации ВГЖ под конъюнктиву, что является неестественным. Операция малотравматична, так как склерозектомия не производилась, а склеральные разрезы полностью герметизировали узловыми швами. Разрезы склеры производили между прямыми мышцами, так что подвижность глазного яблока сохранялась в полном объеме. Первым этапом циклодиализ производили *ab interno* с целью профилактики отслойки десцеметовой оболочки, которая часто встречается при использовании методики *ab externo*. После отслоения цилиарного тела от склеральной шпоры производили циклодиализ *ab externo*. Благодаря такой последовательности проведения циклодиализа не наблюдали ни отслойки десцеметовой оболочки, ни разрыва трабекулярного аппарата. Созданный в ходе данной операции клапан облегчает введение инструментов через склеральный разрез в супрацилиарное пространство, что уменьшает травматизацию цилиарного тела. Также данный клапан служит точкой фиксации глазного яблока, что облегчает выполнение манипуляции в супрацилиарном пространстве. Операция направлена на активацию УСП, так как в ходе операции формируется ЦТ, сообщающий ПК с супрацилиарным и супрахориоидальным пространствами.

Выбор НКД для имплантации в супрацилиарное и супрахориоидальное пространства был основан на высокой биосовместимости данного материала с тканями глаза и отсутствии выраженной воспалительной реакции после его имплантации, так как он не обладает токсичностью и иммуногенностью [29]. Дренаж производят в сухой форме, при намокании он набухает не более чем на 0,1%. Благодаря пористой структуре НКД (размер пор 200–700 мкм) ток ВГЖ осуществляется по всей структуре. Высокая эффективность применения данного дренажа в хирургическом лечении глаукомы продемонстрирована на большом клиническом материале, где была проведена непроникающая глубокая склерозектомия с имплантацией НКД в интрасклеральном пространстве. Авторы сообщали о стойком снижении ВГД через 1,5 года после проведения операции у пациентов с далекозашедшей глаукомой, где ВГД составляло  $13,0 \pm 0,5$  мм рт. ст. без гипотензивного режима [30].

За весь период послеоперационного наблюдения неудачных исходов проведенного хирургического вмешательства явных признаков воспалительной реакции,

гипотонии, реактивного синдрома, дислокации НКД не наблюдали, что подтверждает высокую безопасность предложенной операции. Гифему наблюдали лишь в одном случае, и она рассосалась в течение 5 дней.

Через 12 месяцев после проведения клапанного циклодиализа с имплантацией НКД среднее ВГД снизилось на  $33,8 \pm 8,8\%$  от исходного уровня и составило  $18,8 \pm 4,4$  мм рт. ст. ( $p \leq 0,01$ ), что доказывает высокую гипотензивную эффективность предложенной операции. Этим также подтверждается значимое снижение числа используемых гипотензивных средств на  $80,1\%$  (с  $2,8 \pm 0,9$  до  $0,6 \pm 0,9$ ;  $p \leq 0,01$ ) через 12 месяцев после операции, что позволило повысить качество жизни пациентов и существенно уменьшить денежные затраты на препараты. Следует отметить, что удачный исход был достигнут во всех случаях за весь период послеоперационного наблюдения (полный успех — в

73,1% случаев (19 пациентов), признанный — в 29,9% случаев (7 пациентов).

## ВЫВОДЫ

Клапанный циклодиализ *ab externo* с имплантацией в супрацилиарное пространство НКД «Ксенопласт» показал высокую эффективность и безопасность в снижении ВГД и сокращении числа используемых гипотензивных средств, вызывал минимальное количество осложнений у пациентов с продвинутыми стадиями развития ПОУГ.

Таким образом, можно рекомендовать использование предложенного клапанного циклодиализа *ab externo* с имплантацией НКД «Ксенопласт» в качестве высокоэффективного и безопасного хирургического метода лечения продвинутых (далекозашедшей и терминальной) стадий развития ПОУГ.

## Литература

- Егоров Е. А., Астахов Ю. С., Еричев В. П. Национальное руководство по глаукоме. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015; 457 с.
- Либман Е. С. Современные позиции клинко-социальной офтальмологии. Вестник офтальмологии. 2004; 120 (1): 10–2.
- Ловпаче Дж. Н., Аракелян М. А., Рамазанова К. А. Гипотензивная эффективность, переносимость и безопасность препаратов Тимолол 0,5%, Дорзопт 2%, комбинации Тимолол 0,5% и Дорзопт 2% в лечении пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Рос. офтальмол. журнал. 2011; (1): 40–5.
- Светозарский С. Н., Масленникова Ю. А., Аниеева М. В. Современные технологии хирургического лечения открытоугольной глаукомы. СТМ. 2014; 6 (1): 102–9.
- de Moraes CG, Liebmann JM, Medeiros FA, Weinreb RN. Management of advanced glaucoma: Characterization and monitoring. Surv Ophthalmol. 2016; 61 (5): 597–615.
- Кумар В., Фролов М. А., Душина Г. Н., Шрадка А. С., Беззаботнов А. И. Обратный меридиональный циклодиализ *ab interno* с введением в супрацилиарное пространство металлического имплантата при глаукоме различной этиологии. Вестник офтальмологии. 2019; 135 (3): 10–9.
- Johnson M, McLaren JW, Overby DR. Unconventional aqueous humor outflow: A review. Exp Eye Res. 2017; (158): 94–111.
- Carreon T, van der Merwe E, Fellman RL, Johnstone M, Bhattacharya SK. Aqueous outflow — A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. Prog Retin Eye Res. 2017; (57): 108–33.
- Фролов М. А., Фролов А. М., Казакова К. А. Комбинированные методы лечения при сочетании катаракты и глаукомы. Вестник офтальмологии. 2017; 133 (4): 42–6.
- Yucel Y, Gupta N. Lymphatic drainage from the eye: A new target for therapy. Prog Brain Res. 2015; 220: 185–98.
- Kammer JA, Mundy KM. Suprachoroidal Devices in Glaucoma Surgery. Middle East Afr Ophthalmol. 2015; 22 (1): 45–52.
- Tanito M, Chihara E. safety and effectiveness of gold glaucoma micro shunt for reducing intraocular pressure in Japanese patients with open angle glaucoma. Jpn J Ophthalmol. 2017; 61 (5): 388–94.
- Grisanti S, Grisanti S, Garcia-Feijoo J, Dick HB, Munoz-Negrete FJ, Arrondo E, et al. Supraciliary microstent implantation for open-angle glaucoma: multicentre 3-year outcomes. BMJ Open Ophthalmol. 2018; 22 (1): e000183.
- Краснов М. М. Микрохирургия глауком, 2-е издание. М.: Медицина; 1980; 248 с.
- Shaarawy TM, Grehn F, Sherwood MB, editors. Guidelines on design and reporting of glaucoma surgical trials. World Glaucoma Association. Amsterdam: Kugler publications, 2008; 2009.
- Колесникова Л. Н., Панцырева Л. П., Свиринов А. В. Дилатация супрахориоидального пространства в комбинации с циклодиализом. Вестник офтальмологии. 1976; 4: 18–20.
- Demeler U. Direct cyclohexy following operative and traumatic cyclodialysis. Fortschr Ophthalmol. 1984; 81: 466–8.
- Кумар В., Фролов М. А., Душина Г. Н., Шрадка А. С., Беззаботнов А. И. Обратный меридиональный циклодиализ *ab interno* в хирургическом лечении глаукомы различной этиологии: отдаленные результаты. Национальный журнал глаукома. 2018; 17 (4): 63–73.
- Фролов М. А., Рябей А. В., Фролов А. М., Аль Хатиб Н. С. Результаты модифицированной синустрабекулэктомии с базальной иридэктомией, дренированием передней камеры и супрахориоидального пространства аутосклерой при первичной открытоугольной глаукоме. Точка зрения. Восток — запад, научно-практический журнал. 2018; (3): 23–6.
- Figus M, Lazzeri S, Fogagnolo P, Laster M, Martinelli P, Nardi M. Supraciliary shunt in refractory glaucoma. Br J Ophthalmol. 2011; 95 (11): 1537–41.
- Hueber A, Roters S, Jordan JF, Konen W. Retrospective analysis of the success and safety of Gold Micro Shunt Implantation in glaucoma. BMC Ophthalmol. 2013; (13): 35.
- Agnifili L, Costagliola C, Figus M, Lezzi G, Piattelli A, Carpineto, et al. Histological findings of failed gold micro shunts in primary open-angle glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250 (1): 143–9.
- Hoeh H, Vold SD, Ahmed IK, Anton A, Rau M, Singh K, et al. Initial Clinical Experience with the CyPass Micro-Stent: Safety and Surgical Outcomes of a Novel Supraciliary Microstent. J Glaucoma. 2016; 25 (1): 106–12.
- Grisanti S, Margolina E, Hoeh H, Rau M, Erb C, Kersten-Gomez, et al. Supraciliary microstent for open-angle glaucoma: clinical results of a prospective multicenter study. Ophthalmologe. 2014; 111 (6): 548–52.
- Perez CI, Chansangpet S, Hsia YC, Lin SC. Use of Nd: YAG laser to recanalize occluded Cypass Micro-Stent in the early post-operative period. Am J Ophthalmol Case Rep. 2018; (10): 114–6.
- Gigon A, Shaarawy T. The Suprachoroidal Route in Glaucoma Surgery. J Curr Glaucoma Pract. 2016; 10 (1): 13–20.
- Рябцева А. А., Югай М. П. Изменение внутриглазного давления в ранние сроки после факэмульсификации катаракты. Точка зрения. Восток — запад, научно-практический журнал. 2014; (1): 84.
- DeVience E, Chaudhry S, Saeedi OJ. Effect of intraoperative factors on IOP reduction after phacoemulsification. Int Ophthalmol. 2017; 37 (1): 63–70.
- Анисимов С. И., Анисимова С. Ю., Дроздова Г. А., Ларионов Е. В., Рогачева И. В. Патофизиологические аспекты использования нового биологического материала ксенопласт в хирургическом



- лечении глаукомы. Национальный журнал глаукома. 2008; (2): 40–5.
30. Анисимова С. Ю., Анисимов С. И., Рогачева И. В.

хирургическое лечение рафрактерной глаукомы с использованием нового, стойкого к биодеструкции коллагенового дренажа. Национальный журнал глаукома. 2006; (2): 51–6.

## References

- Egorov EA, Astakhov YuS, Elichev VP. Natsional'noe rukovodstvo po glaukome. M.: GEOTAR-Media, 2015; 457 p.
- Liebman ES. Present-day positions of the clinical-and-social ophthalmology. Vestnik oftal'mologii. 2004; 120 (1): 10–2.
- Lovpache JN, Arakelyan MA, Ramazanova KA. Hypotensive effect, tolerance and safety of the preparations Timolol 0.5%, Dorzolamide and combination of these preparations in treatment of patients with primary open-angle glaucoma. Ros. oftal'mol. zhurnal. 2011; (1): 40–5.
- Svetozarskiy SN, Maslennikova YA, Anikeeva MV. Modern Technologies of Open-Angle Glaucoma Surgery. STM. 2014; 6 (1): 102–9.
- 5-de Moraes CG, Liebmann JM, Medeiros FA, Weinreb RN. Management of advanced glaucoma: Characterization and monitoring. Surv Ophthalmol. 2016; 61 (5): 597–615.
- Kumar V, Frolov MA, Dushina GN, Shradqa AS, Bezzabotnov AI. Reverse meridional cyclodialysis ab interno with implantation of metallic implant in patients with glaucoma of different etiology. Vestnik oftal'mologii. 2019; 135 (3): 10–9.
- Johnson M, McLaren JW, Overby DR. Unconventional aqueous humor outflow: A review. Exp Eye Res. 2017; (158): 94–111.
- Carreon T, van der Merwe E, Fellman RL, Johnstone M, Bhattacharya SK. Aqueous outflow — A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. Prog Retin Eye Res. 2017; (57): 108–33.
- Frolov MA, Frolov AM, Kazakova KA. Combination treatment for cataract and glaucoma. Vestnik oftal'mologii. 2017; 133 (4): 42–6.
- Yucel Y, Gupta N. Lymphatic drainage from the eye: A new target for therapy. Prog Brain Res. 2015; (220): 185–98.
- Kammer JA, Mundy KM. Suprachoroidal Devices in Glaucoma Surgery. Middle East Afr Ophthalmol. 2015; 22 (1): 45–52.
- Tanito M, Chihara E. safety and effectiveness of gold glaucoma micro shunt for reducing intraocular pressure in Japanese patients with open angle glaucoma. Jpn J Ophthalmol. 2017; 61 (5): 388–94.
- Grisanti S, Grisanti S, Garcia-Feijoo J, Dick HB, Munoz-Negrete FJ, Arrondo E., et al. Supraciliary microstent implantation for open-angle glaucoma: multicentre 3-year outcomes. BMJ Open Ophthalmol. 2018; 22 (1): e000183.
- Krasnov MM. Mikrokhirurgiya glaukom, 2-eizdanie. M.: Meditsina, 1980; 248 c.
- Shaarawy TM, Grehn F, Sherwood MB, editors. Guidelines on design and reporting of glaucoma surgical trials. World Glaucoma Association. Amsterdam: Kugler publications, 2008; 2009.
- Kolesnikova LH, Pantsireva LP, Svirin AB. Dilatation of suprachoroidal space in combination with cyclodialysis. Vestnik oftal'mologii. 1976; (4): 18–20.
- Demeler U. Direct cyclohexy following operative and traumatic cyclodialysis. Fortschr Ophthalmol. 1984; (81): 466–8.
- Kumar V, Frolov MA, Dushina GN, Shradqa AS, Bezzabotnov AI. Reverse meridional cyclodialysis ab interno in surgical management of different types of glaucoma: Long-term results. Natsional'nyy zhurnal glaukoma. 2018; 17 (4): 63–73.
- Frolov MA, Ryabey AV, Frolov AM, Al' Khatib NS. Rezul'taty modifitsirovannoy sinustrabekulektomii s bazal'noy iridektomiej, drenirovaniem peredney kamery i suprachoroidal'nogo prostanstva autoskleroy pri pervichnoy otkrytougol'noy glaukome. Tochka zreniya. Vostok — zapad, nauchno-prakticheskij zhurnal. 2018; (3): 23–6.
- Figus M, Lazzeri S, Fogagnolo P, Laster M, Martinelli P, Nardi M. Supraciliary shunt in refractory glaucoma. Br J Ophthalmol. 2011; 95 (11): 1537–41.
- Hueber A, Roters S, Jordan JF, Konen W. Retrospective analysis of the success and safety of Gold Micro Shunt Implantation in glaucoma. BMC Ophthalmol. 2013; (13): 35.
- Agnifili L, Costagliola C, Figus M, Lezzi G, Piattelli A, Carpineto, et al. Histological findings of failed gold micro shunts in primary open-angle glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250 (1): 143–9.
- Hoeh H, Vold SD, Ahmed IK, Anton A, Rau M, Singh K, et al. Initial Clinical Experience with the CyPass Micro-Stent: Safety and Surgical Outcomes of a Novel Supraciliary Microstent. J Glaucoma. 2016; 25 (1): 106–12.
- Grisanti S, Margolina E, Hoeh H, Rau M, Erb C, Kersten-Gomez, et al. Supraciliary microstent for open-angle glaucoma: clinical results of a prospective multicenter study. Ophthalmologe. 2014; 111 (6): 548–52.
- Perez CI, Chansangpet S, Hsia YC, Lin SC. Use of Nd:YAG laser to recanalize occluded Cypass Micro-Stent in the early post-operative period. Am J Ophthalmol Case Rep. 2018; (10): 114–6.
- Gigon A, Shaarawy T. The Suprachoroidal Route in Glaucoma Surgery. J Curr Glaucoma Pract. 2016; 10 (1): 13–20.
- Rjabceva AA, Jugaj MP. Izmenenie vnutriglaznogo davleniya v rannie sroki posle fakojemul'sifikacii katarakty. Tochka zreniya. Vostok — zapad, nauchno-prakticheskij zhurnal. 2014; (1): 84.
- DeVience E., Chaudhry S., Saeedi OJ. Effect of intraoperative factors on IOP reduction after phacoemulsification. Int Ophthalmol. 2017; 37 (1): 63–70.
- Anisimov SI, Anisimova SYu, Drozdova GA, Larionov EV, Rogacheva IV. Patofiziologicheskie aspekty ispol'zovaniya novogo biologicheskogo materiala ksenoplast v khirurgicheskom lechenii glaukomy. Natsional'nyy zhurnal glaukoma. 2008; (2): 40–5.
- Anisimova SYu, Anisimov SI, Rogacheva IV. khirurgicheskoe lechenie rafrakternoy glaukomy s ispol'zovaniem novogo, stoykogo k biodestruktsii kollagenovogo drenazha. Natsional'nyy zhurnal glaukoma. 2006; (2): 51–6.



## МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ: НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ — НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОЦЕСС СТАНОВЛЕНИЯ

Т. В. Припутневич<sup>1</sup>, Е. Л. Исаева<sup>1</sup>, В. В. Муравьева<sup>1</sup>, А. Б. Гордеев<sup>1</sup>✉, В. В. Зубков<sup>1</sup>, Л. А. Тимофеева<sup>1</sup>, М. К. Месян<sup>1</sup>, Е. Шубина<sup>1</sup>, В. В. Макаров<sup>2</sup>, С. М. Юдин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия

В настоящее время не существует критериев адекватной оценки качественного и количественного состава микробиоты кишечника новорожденных детей, что не дает возможности выявить на ранних сроках патологический процесс и скорректировать его. Целью исследования было изучить становление микробиоты кишечника у здоровых новорожденных в городе Москве, рожденных самопроизвольно и путем операции кесарева сечения, с помощью методов культивации, протеомики и молекулярно-генетических технологий. Обследовано 66 детей: 33 ребенка, рожденных самопроизвольно, и 33 — путем операции кесарева сечения. Образцы просветной микрофлоры собирали на первые, седьмые и 30-е сутки жизни. Выделено 136 видов микроорганизмов, относящихся к 40 родам. Показано, что кесарево сечение тормозит процесс нормального становления микрофлоры кишечника, и в течение изучаемого периода (первого месяца жизни) микробиоценоз кишечника у таких детей не достигает показателей у детей, рожденных самопроизвольно. Статистически достоверно в группе самопроизвольных родов преобладали бифидобактерии (частота их встречаемости в титре  $10^9$ – $10^{12}$  КОЕ/г составила 84% против 33% при титре  $10^5$ – $10^{12}$  КОЕ/г в группе кесарева сечения). В то же время у детей, рожденных самопроизвольно, по сравнению с детьми, рожденными путем кесарева сечения, отмечена статистически достоверно более низкая частота обнаружения клостридий (33,3 и 65,4% соответственно) и лактозоотрицательных штаммов *Escherichia coli* (2,4 и 19,4% соответственно).

**Ключевые слова:** микробиота, новорожденные, микробиота кишечника

**Информация о вкладе авторов:** Т. В. Припутневич — планирование исследования, организация микробиологических исследований, интерпретация данных; Е. Л. Исаева и В. В. Муравьева — проведение микробиологических исследований, подготовка черновика рукописи; А. Б. Гордеев — анализ и интерпретация данных; В. В. Зубков — планирование исследования, организация сбора проб фекалий; Л. А. Тимофеева и М. К. Месян — сбор проб фекалий; Е. Шубина — проведение секвенирования; В. В. Макаров и С. М. Юдин — планирование исследования.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол заседания № 4 от 12 апреля 2018 г.). Родители всех детей, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Борисович Гордеев  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gordeew@vega.protres.ru

**Статья получена:** 28.08.2019 **Статья принята к печати:** 11.09.2019 **Опубликована онлайн:** 28.09.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.063

## GUT MICROBIOTA OF HEALTHY NEWBORNS: NEW DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES — NEW OUTLOOK ON THE DEVELOPMENT PROCESS

Pripitnevich TV<sup>1</sup>, Isaeva EL<sup>1</sup>, Muravieva VV<sup>1</sup>, Gordeev AB<sup>1</sup>✉, Zubkov VV<sup>1</sup>, Timofeeva LA<sup>1</sup>, Mesyan MK<sup>1</sup>, Shubina E<sup>1</sup>, Makarov VV<sup>2</sup>, Yudin SM<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Moscow, Russia

Currently, there are no criteria allowing to adequately assess composition and volume of the newborns' gut microbiota, which prevents early detection of the pathological processes and appropriate intervention. This study aimed to apply the methods of culturomics, proteomics and molecular genetic technologies to investigate the development of gut microbiota in healthy newborns delivered in the city of Moscow both vaginally and through a cesarean section. We examined 66 children, 33 of them delivered vaginally and 33 by cesarean section. The luminal bacterial flora samples were collected on the 1st, 7th and 30th days of life. There were 136 species of microorganisms belonging to 40 genera identified. We established that cesarean section slows down normal development of the gut microflora: through the follow-up period (1 month of life), gut microbiocenosis in such children did not yield the results on par with those registered in children born vaginally. Bifidobacteria were significantly more common in the vaginal delivery group: 84% of  $10^9$ – $10^{12}$  CFU/g versus 33% of  $10^5$ – $10^{12}$  CFU/g in the cesarean section group. At the same time, the former group had significantly less clostridia (33.3% and 65.4%, respectively) and lactose-negative *Escherichia coli* strains (2.4 and 19.4%, respectively) than the latter group.

**Keywords:** microbiota, newborns, gut microbiota

**Author contribution:** Pripitnevich TV — study planning, organization of microbiological tests, data interpretation; Isaeva EL and Muravieva VV — conducting microbiological tests, draft authoring; Gordeev AB — data analysis and interpretation; Zubkov VV — study planning, feces samples collection organization; Timofeeva LA and Mesyan MK — feces collection; Shubina E — sequencing; Makarov VV and Yudin SM — study planning.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov (meeting minutes № 4 of April 12, 2018). Parents of all children included in the study signed the voluntary informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey B. Gordeev  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; gordeew@vega.protres.ru

**Received:** 28.08.2019 **Accepted:** 11.09.2019 **Published online:** 28.09.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.063

В современных условиях характер микробной колонизации кишечника, в том числе у новорожденных детей, претерпел существенные изменения в связи с увеличением контингента женщин с осложненным течением беременности, возрастанием стрессовых воздействий, экологическим

неблагополучием и бесконтрольным применением антибиотиков.

Углубленное изучение кишечной микробиоты с использованием возможностей культивации, высокотехнологичных методов идентификации выделенных

микроорганизмов (MALDI-TOF MS, секвенирования последовательностей гена 16S рПНК), а также современных технологий метагеномного анализа позволяет значительно расширить представление о ее видовом многообразии.

Принятые в настоящее время нормативы по качественному и количественному составу микробиоты кишечника [1–3] на этом фоне требуют корректировки. На сегодняшний день отсутствуют четко разработанные критерии оценки состояния микробиоты кишечника новорожденных, которые позволили бы своевременно корректировать выявленные нарушения и на ранних этапах влиять на патологический процесс, например развитие некротизирующего энтероколита у недоношенных детей. Существует крайне мало работ, в которых представлены статистически обработанные данные по качественному и количественному составу микробиоты кишечника новорожденных детей [4, 5].

Целью исследования было с помощью методов культивации, протеомики и молекулярно-генетических технологий оценить становление микробиоты кишечника у здоровых новорожденных в городе Москве, рожденных самопроизвольно и путем операции кесарева сечения.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование выполняли на когорте здоровых доношенных новорожденных. Рандомизацию проводили блочным методом, в результате которого были сформированы две группы детей:

- 1) группа I — 33 ребенка, родившихся самопроизвольно;
- 2) группа II — 33 ребенка, родившихся путем операции кесарева сечения.

Детей отбирали согласно следующим критериям включения в исследование: гестационный возраст — 38–40 недель; оценка по шкале Апгар на первой и пятой минутах жизни — 8–9 баллов; масса тела — более 2800 г. Всем новорожденным выполняли клинические анализы крови и мочи для исключения инфекционной патологии или других факторов, способных повлиять на формирование микробиоты кишечника. Все дети находились на грудном вскармливании, и в единичных случаях детей докармливали искусственными смесями. У всех матерей не было отмечено длительного безводного промежутка; антибиотиков во время беременности принимали три женщины; истмико-цервикальная недостаточность имела место у четырех женщин (6%). В случае оперативного родоразрешения женщины получали амоксилав в качестве антибиотикопрофилактики до и во время операции.

У новорожденных проводили трехкратный отбор проб фекалий: в первые сутки, конце первой недели и конце первого месяца жизни. Образцы мекония, полученного во время первой дефекации, или кала, собранные со стерильной пеленки в стерильный пластиковый контейнер, в течение 2 ч доставляли в лабораторию и незамедлительно приступали к посеву.

Изучение состава микробиоты кишечника новорожденных проводили с использованием расширенного спектра селективных и неселективных питательных сред и инкубированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях.

Посев мекония и кала проводили согласно принятым методикам [3, 6] на следующие питательные среды. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных микроорганизмов использовали колумбийский кровяной агар, хромогенную среду Brilliance, сальмонелла-шигелла-

агар, декстрозный агар Сабуро (Oxoid; Великобритания), маннит-солевой агар (Himedia; Индия), среду для выявления и дифференциации *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar; Франция), энтерококковый агар, агар Эндо (ФГУН «ГИЦПМ и Б»; Россия). Лактобациллы культивировали на среде лактобакагар (ФГУН «ГИЦПМ и Б»; Россия). Строгие анаэробы выделяли на агаре для бифидобактерий (Himedia; Индия), прередуцированном агаре Шедлера с необходимыми добавками, основном агаре для анаэробов, перфрингенс агаре, железосульфитном агаре, селективном агаре для *Clostridium difficile* (Oxoid; Великобритания). Для культивирования микроаэрофилов использовали CO<sub>2</sub>-инкубатор (Jouan; Франция) с концентрацией CO<sub>2</sub> 5%. Строгие анаэробы культивировали в анаэробном боксе (Jouan; Франция) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N<sub>2</sub> — 80%; CO<sub>2</sub> — 10%; H<sub>2</sub> — 10%). Для контроля стерильности использовали тиогликолевый бульон (Oxoid; Великобритания).

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра AutoFlex III с программным обеспечением Maldi BioTyper (Bruker Daltonics; Германия) версии 3.0. При получении значений SCORE > 2,0 культуру считали с высокой вероятностью идентифицированной до вида. При значениях SCORE в диапазоне 1,7–2,0 культуру считали идентифицированной до рода.

Для всех трудноидентифицируемых штаммов (при значении SCORE < 2,0) проводили секвенирование последовательностей гена 16S рПНК. ДНК культур выделяли с использованием набора реагентов для выделения ДНК «Проба-ЦиТо» («ДНК-технология»; Россия). Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: ампликон длиной ~440 п. н., соответствующий позициям 339–785 гена 16S рПНК, и ампликон длиной ~1340 п. н., соответствующий позициям 42–1380 гена 16S рПНК. Амплификацию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм («ДНК-технология»; Россия). Секвенирование осуществляли на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; США) согласно протоколу производителя. Для видовой идентификации использовали свободно доступный в Интернете программный пакет BLAST (National Center for Biotechnology Information; США).

При статистической обработке данных для определения различий в частоте встречаемости микроорганизмов в зависимости от способа родоразрешения использовали точный тест Фишера. В качестве описательной статистики для характеристики степени микробной обсемененности использовали медиану и интерквартильное расстояние (ИКР).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой временной точке обследовано 66 детей, по 33 ребенка из каждой группы. У каждого пятого ребенка меконий оказался стерильным, причем у детей II группы в 2 раза чаще по сравнению с I группой (9 и 4 соответственно;  $p > 0,05$ ). У детей с положительными результатами посевов мекония выделена разнообразная микрофлора (63 вида, средний показатель видового разнообразия составил 3,8 вида на одного ребенка). Наиболее часто (в 60% случаев в титре 10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup> КОЕ/г после самопроизвольных родов и в 70% случаев в титре 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> КОЕ/г — после операции) выделяли грамположительные факультативно-

анаэробные микроорганизмы, представленные 10 родами: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Rothia*; *Corynebacterium*, *Bacillus*. Обращает на себя внимание, что у 12,2% детей II группы и у 6,1% детей I группы обнаружен *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *Escherichia coli*, в норме составляющая значительную часть нормофлоры кишечника, при самопроизвольных родах выделена почти в 3 раза чаще (24,2 и 9,1%;  $p > 0,05$ ). Прочие энтеробактерии также чаще выделяли у детей I группы (27 и 15% соответственно;  $p > 0,05$ ). *Pseudomonas aeruginosa* обнаружена только у одного ребенка II группы.

Наиболее важную роль в становлении микробиоты кишечника новорожденного играют лактобациллы и бифидобактерии. Эти микроорганизмы обнаружены уже в первые сутки жизни. В группе I колонизация кишечника лактобациллами оказалась значительно выше (18 и 3% соответственно;  $p > 0,05$ ), и это были *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii*, относящиеся к числу доминирующих видов в вагинальной микробиоте здоровых женщин. Бифидобактерии также чаще выделяли у детей I группы (9 и 3% соответственно;  $p > 0,05$ ). Ими оказались *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*. Бактериоды в первые сутки жизни обнаружили лишь у одного ребенка I группы. Прочие анаэробы (вейлонеллы, превотеллы и кампилобактеры) выделяли практически только во II группе.

Ввиду отказа некоторых родителей от участия в исследовании или возникновения инфекционного заболевания часть детей выбыла из исследования в течение первой недели жизни, и во второй точке было обследовано 52 ребенка: 25 детей из I группы и 27 детей из II группы.

Средний показатель видового разнообразия возрос по сравнению с первой точкой почти в 3 раза и составил 9,4 вида на одного ребенка. Как и в первые сутки жизни, в обеих группах наиболее часто встречались грамположительные факультативно-анаэробные микроорганизмы (9 родов). Их титр заметно вырос: после естественных родов — до  $10^7$ – $10^{11}$ , после кесарева сечения — до  $10^7$ – $10^{12}$  КОЕ/г, а частота встречаемости составила 100% в обеих группах. Увеличилась частота выделения *S. aureus*: у 44% детей I группы и у 55,6% детей II группы. Расширилась представленность энтерококков с двух до шести видов: *Enterococcus faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. avium*, *E. gallinarum*. Доминирующую позицию, как и в первые сутки жизни, занимал *E. faecalis*, колонизировавший кишечник большей части новорожденных в обеих группах (80% — в I группе и 88,9% — во II группе).

Видовой спектр грамотрицательной факультативно-анаэробной микрофлоры расширился с 6 до 15 видов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. *E. coli* при самопроизвольных родах по-прежнему выделяли чаще (64% — в I группе и 44,4% — во II;  $p > 0,05$ ). Прочие энтеробактерии высевали примерно с одинаковой частотой в обеих группах.

Видовой состав лактобацилл обогатился новыми видами: *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*. Необходимо отметить, что виды лактобацилл, доминирующие в вагинальной микробиоте здоровых женщин (*L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*), обнаружены только в I группе.

Статистически достоверные различия наблюдали в представленности бифидобактерий. Если в группе I частота их встречаемости составила 84%, а титр

находился в диапазоне  $10^9$ – $10^{12}$  КОЕ/г, то во II группе бифидобактерии выделены только у 33% в титрах  $10^5$ – $10^{12}$  КОЕ/г ( $p < 0,05$ ). Видовой спектр бифидобактерий расширился с 3 до 7 видов: *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis*. Некоторые виды обнаружены только в одной из групп: *B. adolescentis* и *B. catenulatum* (только в I группе) и *B. dentium* и *B. animalis* (только во II группе).

К седьмым суткам жизни микробиота в значительной степени обогатилась за счет прочих облигатных анаэробов (11 родов): *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Eggerthella*, *Actinomyces*, *Collinsella*, *Propionibacterium*. При этом бактериоды, представленные *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, выделены только у детей, рожденных самопроизвольно. Существенной разницы в частоте обнаружения клостридий (*Clostridium perfringens*, *C. butyricum*, *C. innocuum*, *C. tertium*) не выявлено. У одного ребенка II группы выделен штамм *C. difficile*. В обеих группах возросла колонизация кишечника вейлонеллами.

Таким образом, к седьмым суткам жизни существенно увеличилось видовое разнообразие, касающееся различных групп микроорганизмов, как факультативно-анаэробного, так и облигатно-анаэробного происхождения. Бифидобактерии, лактобациллы и бактериоды преобладали в группе I.

В третьей точке обследовано 50 детей: 24 ребенка из группы I и 26 детей из группы II. Средний показатель видового разнообразия составил 10,1 вида на одного ребенка. Как и в более ранние периоды, наиболее представленной была группа грамположительных факультативно-анаэробных микроорганизмов (7 родов). Частота выделения *S. aureus* мало изменилась в сравнении с седьмыми сутками в I группе (58,3%) и значительно выросла во II группе (76,9%). Видовой состав энтерококков пополнился еще двумя видами: *E. casseliflavus* и *E. raffinosus*.

В составе грамотрицательной факультативно-анаэробной микрофлоры выявлено 11 видов из семейства *Enterobacteriaceae* и один вид неферментирующих бактерий — *Stenotrophomonas maltophilia*. *E. coli* при самопроизвольных родах по-прежнему выделялась чаще (75% в I группе и 61,5% — во II;  $p > 0,05$ ). Прочие энтеробактерии несколько чаще высевали у детей II группы (66,7 и 73% соответственно;  $p > 0,05$ ).

Видовой состав лактобацилл расширился до 15 видов за счет *L. reuteri*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, причем в I группе выделяли почти вдвое большее количество видов. Видовой спектр бифидобактерий увеличился на один вид *B. ruminantium*. Наиболее часто выделяли *B. longum* (58,3% в I группе и 26,9% — во II) и *B. bifidum* (33,3 и 34,6% соответственно).

Облигатные анаэробы пополнились родами *Sutterella* и *Peptoniphilus*. Бактериоды (6 видов), представленные *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. cellulosilyticus*, *Parabacteroides distasonis*, за исключением одного случая после кесарева сечения, выделены только у детей, рожденных путем самопроизвольных родов.

Наметилась статистически достоверная разница в частоте обнаружения клостридий (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. tertium*, *C. ramosum*, *C. paraputrificum*, *C. difficile*): у 33,3% детей в I группе и 65,4% — во II ( $p < 0,05$ ). Во II группе выделено в 2 раза больше видов клостридий. У одного ребенка II группы выделен *C. difficile*.

Дрожжевые грибы рода *Candida* обнаружены в обеих группах только на 30-е сутки жизни менее чем у 10% детей.



Таким образом, на 30-е сутки жизни микробиота кишечника вне зависимости от способа родоразрешения представлена поликомпонентными ассоциациями микроорганизмов, относящихся к факультативным и облигатным анаэробам. В то же время наметились определенные различия, касающиеся облигатной и транзитной составляющей микробиоты. Так, при самопроизвольном родоразрешении видовой состав лактобацилл был более разнообразным (почти вдвое большее количество видов), чаще выявляли виды, колонизирующие влагалище здоровых женщин. Бактероиды были преимущественно выделены у детей, рожденных самопроизвольно, а клостридии при большем видовом разнообразии, напротив, у детей, рожденных путем операции кесарева сечения. Условно-патогенные факультативные анаэробы (*S. aureus* и энтеробактерии, за исключением *E. coli*) чаще колонизировали детей, рожденных оперативным путем.

Гемолитические штаммы *Enterococcus sp.* и *E. coli* в обеих группах детей встречались с одинаковой частотой: *Enterococcus sp.* соответственно по 8,3% в каждой группе и *E. coli* — 9,5 и 9,7% соответственно. Лактозоотрицательные штаммы *E. coli* статистически достоверно чаще (в 8 раз) выделяли у детей II группы (19,4 и 2,4% соответственно;  $p < 0,05$ ).

Суммарно в процессе исследования было выделено и идентифицировано 136 видов микроорганизмов, относящихся к 40 родам: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Candida*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eggertella*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Collinsella*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Peptoniphilus*, *Sutterella*.

Для уточнения видовой принадлежности 36 изолятов бактерий (SCORE < 2,0) потребовалось секвенирование гена 16S рПНК. Для большинства изолятов результаты секвенирования гена 16S рПНК совпали с результатами MALDI-TOF масс-спектрометрии. Лишь для 5 изолятов достоверную идентификацию удалось получить только методом секвенирования гена 16S рПНК. В ряде случаев точную видовую принадлежность близкородственных микроорганизмов установить не удалось при использовании обоих методов. К таким видам относились: *Bifidobacterium kashiwanohense*/*Bifidobacterium pseudocatenulatum*/*Bifidobacterium catenulatum*, *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei*, *Actinomyces naeslundii*/*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces radingae*/*Actinomyces ihumii*. Расхождение идентификации касалось 11 изолятов: для 7 изолятов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не удалось правильно определить родовую принадлежность микроорганизмов и для 4 изолятов — видовую.

Обобщенные данные по частоте встречаемости и степени микробной обсемененности кишечника новорожденных в зависимости от способа родоразрешения, позволяющие в первом приближении охарактеризовать показатели микрофлоры здоровых детей, представлены в таблице.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До недавнего времени считалось, что желудочно-кишечный тракт новорожденного стерилен в течение

10–20 ч (асептическая фаза) [7], а первичная микробная колонизация при самопроизвольных родах осуществляется за счет микрофлоры влагалища матери, основу которой составляют лактобациллы [8–11]. Между тем появилась и другая точка зрения, основанная на результатах экспериментальных работ [12]. Из недавно опубликованных данных следует, что нормальная микрофлора кишечника у плода закладывается во второй половине беременности от матери при помощи феномена бактериальной транслокации, и утверждение о том, что плод находится в стерильных условиях, оспаривается рядом ученых [13–15]. В нашем исследовании меконий, полученный во время первого акта дефекации в первые часы жизни, был нестерильным у 53 из 66 новорожденных (80%), что не исключает внутриутробной колонизации.

По данным литературы, в первые часы и сутки жизни происходят активная колонизация и рост кишечной палочки, энтерококков (стадия «нарастающей колонизации»), что не зависит от степени зрелости, перинатальных условий развития плода и вида вскармливания [16–19]. Титр энтеробактерий в этот период достигает  $10^9$  КОЕ/г фекалий [20], тогда как анаэробы — бифидобактерии, лактобациллы, бактероиды — обычно отсутствуют [21]. Наши данные свидетельствуют, что в первые часы жизни кишечник колонизировали в основном грамположительные кокки (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*), причем в большей степени после операции кесарева сечения, чем после родов (частота встречаемости 70 и 60,6%, титры — до  $10^4$  и  $10^3$  КОЕ/г соответственно). Энтеробактерии и облигатно-анаэробные микроорганизмы в этот период времени выявляли редко и в низком титре. Вместе с тем, уже в первые часы жизни в составе микробиоты у детей, рожденных естественным путем, чаще, чем при кесаревом сечении, обнаружены бифидобактерии (9 и 3% соответственно) и лактобациллы (18 и 3% соответственно). Только у 3% детей, рожденных самопроизвольно, обнаружены бактероиды. Возможной причиной расхождения наших данных с результатами других авторов является то, что мы старались получить биоматериал непосредственно во время первого акта дефекации новорожденного.

В дальнейшем у здоровых младенцев идет активный рост анаэробной и факультативно-анаэробной составляющей микрофлоры в количествах  $10^5$ – $10^7$  КОЕ/г [15]. К шестым суткам устанавливается равновесие аэробной и анаэробной частей микрофлоры, далее происходит нарастание лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни она достигает значений  $10^9$ – $10^{10}$  КОЕ/г. По данным других авторов, с 3–5 дня наступает стадия «трансформации микрофлоры», в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов. В этот период бифидобактерии становятся основной (резидентной) микрофлорой кишечника [22–24]. Доминирующее положение бифидофлора начинает занимать к 5–20-му дню жизни [25]. Наши данные к 7-м суткам жизни имеют определенные отличия: общее количество микроорганизмов возрастает, достигая  $10^{10-12}$  КОЕ/г. Это свидетельствует о том, что равновесие факультативно-аэробной и облигатно-анаэробной составляющих микробиоты также наступает к первой неделе, но при более высокой степени микробной колонизации кишечника различными микроорганизмами. Обращает на себя внимание то, что при кесаревом сечении наблюдалось отставание колонизации кишечника

Таблица. Частота встречаемости, медиана и ИКР степени обсемененности фекалий микроорганизмами

| Характеристика  | 1-е сутки жизни ( $n = 66$ ) |                  | 7-е сутки жизни ( $n = 52$ ) |                    | 1-й месяц жизни ( $n = 50$ ) |                       |
|---|------------------------------|------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------|
|   | Роды                         | Кесарево сечение | Роды                         | Кесарево сечение   | Роды                         | Кесарево сечение      |
| <b><i>E. coli</i></b>   |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 24%                          | 9%               | 64%                          | 44,40%             | 70,80%                       | 61,50%                |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$           | $10^8$                       | $10^9$             | $10^9$                       | $10^9$                |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$ – $10^3$  | $10^8$ – $10^9$              | $10^8$ – $10^{10}$ | $10^8$ – $10^{10}$           | $10^8$ – $10^{10}$    |
| <b>Другие энтеробактерии</b>  |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 27%                          | 15%              | 68%                          | 66,70%             | 66,70%                       | 73%                   |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^3$                       | $10^3$           | $10^9$                       | $10^9$             | $10^9$                       | $10^9$                |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$ – $10^4$              | $10^2$ – $10^3$  | $10^8$ – $10^{10}$           | $10^9$ – $10^{10}$ | $10^8$ – $10^{10}$           | $10^9$ – $10^{10}$    |
| <b>Грамположительные факультативно-анаэробные и аэробные бактерии</b> |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 60,60%                       | 70%              | 100%                         | 100%               | 100%                         | 100%                  |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$           | $10^8$                       | $10^9$             | $10^8$                       | $10^9$                |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$ – $10^3$  | $10^8$ – $10^{10}$           | $10^8$ – $10^{10}$ | $10^7$ – $10^9$              | $10^7$ – $10^9$       |
| <b>Бифидобактерии</b>   |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 9%                           | 3%               | 84%                          | 33%                | 83,30%                       | 53,80%                |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$           | $10^{11}$                    | $10^{10}$          | $10^{11}$                    | $10^{10}$             |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$ – $10^3$              | $10^2$           | $10^9$ – $10^{11}$           | $10^8$ – $10^{11}$ | $10^{10}$ – $10^{12}$        | $10^{10}$ – $10^{11}$ |
| <b>Лактобациллы</b>   |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 18%                          | 3%               | 28%                          | 37%                | 58,30%                       | 69%                   |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$           | $10^8$                       | $10^8$             | $10^8$                       | $10^8$                |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$                       | $10^2$           | $10^6$ – $10^{10}$           | $10^6$ – $10^{10}$ | $10^5$ – $10^{10}$           | $10^7$ – $10^{10}$    |
| <b>Бактероиды</b>   |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 3%                           | 0                | 32%                          | 0                  | 25%                          | 3,80%                 |
| Медиана (КОЕ/г)   | $10^2$                       | 0                | $10^9$                       | 0                  | $10^{10}$                    | $10^9$                |
| ИКР (КОЕ/г)   | $10^2$                       | 0                | $10^9$ – $10^{11}$           | 0                  | $10^{10}$                    | $10^9$                |
| <b>Клостридии</b>   |                              |                  |                              |                    |                              |                       |
| Частота встречаемости   | 0                            | 0                | 32%                          | 40,70%             | 33,30%                       | 65,40%                |
| Медиана (КОЕ/г)   | 0                            | 0                | $10^7$                       | $10^9$             | $10^{10,5}$                  | $10^{9,5}$            |
| ИКР (КОЕ/г)   | 0                            | 0                | $10^6$ – $10^9$              | $10^6$ – $10^{10}$ | $10^6$ – $10^{11}$           | $10^8$ – $10^{10}$    |

бифидобактериями и преобладание прочих строгих анаэробов (в основном вейлонелл, клостридий).

К концу первого месяца жизни анаэробная часть микробиоты заняла лидирующее положение с доминированием бифидофлоры в обеих группах. Тем не менее после кесарева сечения бифидофлора была выявлена лишь у половины детей, тогда как после самопроизвольных родов этот показатель достиг 83%.

Характерные для детей первого года жизни *B. longum subsp. infantis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. breve*, *B. bifidum* обладают противовоспалительным действием и способствуют формированию Th1-иммунного ответа. Преобладающие штаммы бифидобактерий у взрослых — *B. longum subsp. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* — способствуют Th2-иммунному ответу и преобладают в микробиоте кишечника при ожирении [24]. Кроме того, *B. longum subsp. infantis* отличается наличием в геноме кластера, кодирующего синтез ферментов (сиалидазы, фукозидазы, N-ацетил-β-гексозаминидазы и β-галактозидазы), расщепляющих олигосахариды до моносахаридов [25]. Бифидофлора кишечника в течение всей жизни остается преобладающей и

является апатогенной, в то время как иные представители облигатной микрофлоры при определенных условиях могут стать причиной заболевания [13]. Полученные нами результаты показали, что после операции кесарева сечения у новорожденных доминируют не самые полезные виды бифидобактерий, в частности, не способные расщеплять лактозу (*B. animalis*, *B. dentium*, *B. ruminantium*).

## ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты подтверждают, что оперативное родоразрешение в определенной степени сдерживает процесс нормального становления микробиоты кишечника. В дальнейшем мы планируем продолжить накапливать информацию о состоянии микробиоты у данной категории детей и расширить исследование, включив в него недоношенных детей, с целью определения критериев нормы кишечной микробиоты здоровых доношенных новорожденных. Проведенное исследование позволило создать, а в перспективе пополнять коллекцию лактобацилл и бифидобактерий, выделенных у здоровых доношенных новорожденных для



выявления бактерий — претендентов в пробиотические штаммы. Своевременная адекватная оценка состава микробиоты новорожденных по показателям ключевых биомаркеров позволит проводить направленную

профилактику ближайших и отдаленных последствий перинатальной патологии у доношенных и недоношенных новорожденных путем ее коррекции с использованием адекватной композиции пробиотиков.

## Литература

1. ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утв. Приказом МЗ РФ № 231 от 09.06.2003. Москва, 2003; 173 с.
2. Методические рекомендации «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника». Минздрав РСФСР. 1977.
3. Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника». Москва, 2007.
4. Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2000; 83 (3): 186–92.
5. Леванова Л.А. Микроэкология кишечника жителей Западной Сибири, коррекция дисбиотических состояний [диссертация]. М., 2003.
6. Щербakov П. Л., Нижевич А. А., Логиновская В. В., Щербakova М. Ю., Кудрявцева Л. В., Митрохин С. Д. и др. Микроэкология кишечника у детей и ее нарушения. *Фарматека*. 2007; (14): 28–34.
7. Акоев Ю. С. Функциональные особенности недоношенных детей в раннем онтогенезе [диссертация]. М., 1999.
8. Копанев Ю. А., Соколов А. Л. Дисбактериоз кишечника: микробиологические, иммунологические и клинические аспекты микроэкологических нарушений у детей. М., 2002.
9. Степурина О. В. Первичное инфицирование ребенка. Инфекционные заболевания детей и экология человека. Ставрополь, 1999; 92–7.
10. Фролова Н. А. Особенности формирования микробиоценоза у детей раннего возраста в зависимости от микробного пейзажа кишечника матери [диссертация]. Смоленск, 2001.
11. Никитенко В. И., Ткаченко Е. И., Стадников А. А. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта — естественный защитный механизм. *Эксперимент. и клин. гастроэнтерол*. 2004; (1): 48.
12. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013; (11): e1001631.
13. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2010; 362: 529–35.
14. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: 51–2.
15. Соловьева И. В., Белова И. В., Точилина А. Г., Ефимов Е. И., Пожидаева А.С. Формирование микрофлоры толстой кишки у детей. *Микробиологический и эпидемиологический вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского*. 2012; (2–3): 93–9.
16. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta pediat*. 2003; 91 (441): 48–55.
17. Orrhag K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr*. 1999; 88 (430): 47–57.
18. Edwards CA, Parret AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr*. 2002; 88 (11): 11–8.
19. Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. *Interfaces and interactions. An evolutionary perspective*. *J Nutr*. 2000; 130 (2): 426–31.
20. Нетребенко О. К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора. *Педиатрия*. 2005; (3): 53–7.
21. Ткаченко Е. И., Суворова А. Н., редакторы. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. СПб. ИнформМед, 2009; 276 с.
22. Шабалов Н. П. Неонатология. М.: Медпресс-информ, 2004; с.128–29.
23. Нетребенко О. К. Питание и развитие иммунитета у детей на разных видах вскармливания. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2005; (6): 50–6.
24. Печуров Д. В., Турти Т. В., Беляева И. А., Тяжева А. А. Микробиота кишечника у детей: от профилактики нарушений становлению к предупреждению неинфекционных заболеваний. *Педиатрическая фармакология*. 2016; 13 (4): 377–83.
25. Суворов А. Н. Микробиота детей. *Природа*. 2011; (8): 14–21.

## References

1. OST 91500.11.0004-2003. Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishchnika. Utv. Prikazom MZ RF № 231 ot 09.06.2003. Moscow, 2003, 173 p.
2. Metodicheskiye rekomendatsii "Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishchnika" Minzdrav RSFSR. 1977.
3. Metodicheskiye rekomendatsii "Mikrobiologicheskaya diagnostika disbakterioza kishchnika". Moskva, 2007.
4. Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2000; 83 (3): 186–92.
5. Levanova LA. Mikroekologiya kishchnika zhitelej Zapadnoj Sibiri, korrekciya disbioticheskikh sostoyanij [dissertation]. M., 2003.
6. Shcherbakov PL, Nizhevich AA, Loginovskaya VV, Shcherbakova MYu, Kudriavtseva LV, Mitrokhin SD, et al. Mikroekologiya kishchnika u detey i yeye narusheniya. *Farmateka*. 2007; (14): 28–34.
7. Akoyev YuS. Funktsional'nyye osobennosti nedonoshennykh detey v rannem ontogeneze [dissertation]. M., 1999.
8. Kopanев YuA, Sokolov AL. Disbakterioz kishchnika: mikrobiologicheskiye, immunologicheskiye i klinicheskiye aspekty mikroekologicheskikh narusheniy u detey. M., 2002.
9. Stepurina OV. Pervichnoye infitsirovaniye rebenka. Infektsionnyye zabolevaniya detey i ekologiya cheloveka. Stavropol', 1999; 92–7.
10. Frolova NA. Osobennosti formirovaniya mikrobiotsenoza u detey rannego vozrasta v zavisimosti ot mikrobного пейзажа kishchnika materi [dissertation]. Smolensk, 2001.
11. Nikitenko VI, Tkachenko EI, Stadnikov AA. Translokatsiya bakteriy iz zheludochno-kishchnogo trakta — yestestvennyy zashchitnyy mekhanizm. *Eksp i klin gastroentorolog*. 2004; (1): 48.
12. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013; (11): e1001631.
13. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med*. 2010; 362: 529–35.
14. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: 51–2.
15. Solov'yeva IV, Belova IV, Tochilina AG, Efimov EI, Pozhidaeva AS. Formirovaniye mikroflory tolstoy kishki u detey. *Mikrobiologicheskij i epidemiologicheskij vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N. I. Lobachevskogo*. 2012; (2–3): 93–9.

16. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta pediat.* 2003; 91 (441): 48–55.
17. Orrhagt K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Pediatr.* 1999; 88 (430): 47–57.
18. Edwards CA, Parret AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr.* 2002; 88 (11): 11–8.
19. Goldman AS. Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J Nutr.* 2000; 130 (2): 426–31.
20. Netrebenko OK. Pitaniye grudnogo rebenka i kishechnaya mikroflora. *Pediatrics.* 2005; (3): 53–57.
21. Tkachenko EI, Suvorova AN, editors. *Disbioz kishechnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu.* SPb. InformMed, 2009; 276 p.
22. Shabalov NP. *Neonatologiya.* Moscow: Medpress-inform, 2004; p. 128–9.
23. Netrebenko OK. Pitaniye i razvitiye immuniteta u detey na raznykh vidakh vskarmlyvaniya. *Pediatrics. Zhurnal imeni G. N. Speranskogo.* 2005; (6): 50–6.
24. Pechkurov DV, Turti TV, Belyaeva IA, Tjazheva AA. Intestinal microflora in children: from formation disturbances prophylaxis to preventing non-infectious diseases. *Pediatric pharmacology.* 2016; 13 (4): 377–83.
25. Suvorov AN. *Mikrobiota detey. Priroda.* 2011; (8): 14–21.

## СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА У ДЕВОЧЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ СОГЛАСНО ШКАЛЕ ТАННЕРА

А. В. Казакова<sup>1</sup>✉, Е. В. Уварова<sup>2</sup>, Л. В. Лимарева<sup>1</sup>, А. А. Трупакова<sup>1</sup>, А. И. Мишина<sup>1</sup><sup>1</sup> Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия<sup>2</sup> Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

На современном этапе мало научных работ по всестороннему изучению факторов, приводящих к вульвовагиниту у девочек. Целью исследования было разработать программу прогнозирования риска вульвовагинита у девочек в детском и подростковом возрасте. В исследовании приняли участие 252 здоровые девочки, которых разделили на группы в зависимости от стадии полового развития по Таннеру. У всех было проведено определение состава микрофлоры влагалища методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. На основании полученных данных разработана рабочая модель по прогнозированию развития вульвовагинитов у девочек с учетом стадии полового развития. Благоприятными факторами для девочек на I стадии полового развития были преобладание облигатных анаэробов в микробиоте влагалища и гомозигота ТТ полиморфного варианта гена IL10 (C-819T). Чувствительность модели составила 80%, специфичность — 78%. Для девочек в препубертатном и пубертатном периодах — преобладание аэробов в микробиоте влагалища и гомозигота ТТ полиморфного варианта гена IL10 (C-3953T). Чувствительность модели составила 58,3%, специфичность — 94,1%. С позиции доказательной медицины обоснована необходимость профилактических мероприятий в группах риска по развитию вульвовагинитов в детском возрасте, позволяющая снизить частоту рецидивов бактериального вульвовагинита в 3 раза.

**Ключевые слова:** вульвовагинит, подростки, прогнозирование, профилактика, доказательная медицина

**Информация о вкладе авторов:** А. В. Казакова — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание и редактирование статьи; Е. В. Уварова — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи; Л. В. Лимарева — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи; А. А. Трупакова, А. И. Мишина — сбор и обработка материала, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (протокол № 5 от 20 апреля 2018 г.). Родители всех участников исследования подписали добровольное информированное согласие на анкетирование и медицинское вмешательство.

✉ Для корреспонденции: Анна Владимировна Казакова, ул. Лесная, д. 31, кв. 40, г. Самара, 443110; amigo14021980@yandex.ru

Статья получена: 27.09.2019 Статья принята к печати: 17.10.2019 Опубликовано онлайн: 29.10.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.070

## PREDICTION OF BACTERIAL VULVOVAGINITIS IN GIRLS AT DIFFERENT TANNER STAGES OF SEXUAL DEVELOPMENT

Kazakova AV<sup>1</sup>✉, Uvarova EV<sup>2</sup>, Limareva LV<sup>1</sup>, Trupakova AA<sup>1</sup>, Mishina AI<sup>1</sup><sup>1</sup> Samara State Medical University, Samara, Russia<sup>2</sup> Kulakov Federal Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow, Russia

At present, there is a paucity of research studies that comprehensively investigate the factors causing vulvovaginitis in young females. The aim of this work was to propose an algorithm for predicting the risk of vulvovaginitis in young girls and adolescents. The study recruited 252 healthy girls, who were stratified into a few groups depending on their sexual development on the Tanner scale. The composition of vaginal microbiota was determined in all the participants using real-time polymerase chain reaction (PCR); distribution of allele and genotype frequencies was assessed for the polymorphic variants of genes coding for pro- and anti-inflammatory cytokines. Based on the obtained data, we created a functional model for predicting the risk of vulvovaginitis in girls at different stages of sexual development. Favorable risk factors for Tanner I girls included predominance of obligate anaerobes in vaginal microbiota and the polymorphic IL10 variant (C-819T) homozygous for TT. The sensitivity of the model was 80%, its specificity was 78%. Favorable risk factors for prepubertal and pubertal girls included predominance of aerobes in the composition of vaginal microbiota and the presence of the TT allele in the polymorphic IL10 gene variant (C-3953T). The sensitivity of the model was 58.3%, whereas specificity, 94.1%. This study provides the rationale conforming with the principles of evidence-based medicine for using prevention measures in the groups at risk for vulvovaginitis at young age. The proposed measures allowed us to reduce the relapse rate of bacterial vulvovaginitis threefold.

**Keywords:** vulvovaginitis, teenagers, prediction, prevention, evidence-based medicine

**Author contribution:** Kazakova AV — study concept and design, data acquisition and analysis, manuscript draft; Uvarova EV — study concept and design, manuscript revision; Limareva LV — study concept and design, manuscript revision; Trupakova AA, Mishina AI — data acquisition and analysis, manuscript draft.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Samara State Medical University (Protocol № 5 dated April 20, 2018). Informed consent was obtained from the parents of the study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Anna V. Kazakova, Lesnaya, 31, kv. 40, Samara, 443110; amigo14021980@yandex.ru

Received: 27.09.2019 Accepted: 17.10.2019 Published online: 29.10.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.070

В последние годы происходит ухудшение показателей здоровья детей и подростков и рост числа нарушений репродуктивной системы и гинекологических заболеваний [1–4]. О значимости проблемы воспалительной патологии гениталий свидетельствует ее высокая распространенность у детей всех возрастов [5–7]. Известно, что вульвовагинит является основным видом

(84,2%) воспалительных заболеваний гениталий у девочек до 10 лет [8–10].

Основные факторы, способствующие развитию вульвовагинита в детском возрасте, — гормональный фон, особенности образа жизни, несоблюдение правил личной гигиены и генетические особенности иммунного реагирования [11–14]. Среди неблагоприятных факторов,

влияющих на репродуктивное здоровье и вызывающих нарушение микробиоценоза влагалища, выделяют раннее начало половой жизни [15]. Еще большую опасность представляют самолечение и несвоевременное обращение в медицинские учреждения при возникновении гинекологических заболеваний.

Особенности местного иммунитета несомненно влияют на микробиоценоз влагалища и играют ведущую роль в развитии воспалительного ответа [16], но механизмы поддержания иммунной толерантности остаются малоизученными [17, 18].

Гигиенические аспекты полового воспитания, несмотря на, казалось бы, достаточную научно-методическую проработанность, реализуются по-разному в различных регионах и социальных слоях. В отличие от генетических особенностей морфофункционального развития и иммунного реагирования, интимная гигиена и репродуктивное поведение являются модифицируемыми факторами, с помощью которых можно целенаправленно повлиять на состояние здоровья. Необходим поиск новых подходов к прогнозированию риска развития и обоснованному выбору профилактических мероприятий по предупреждению воспалительных заболеваний вульвы и влагалища в детском возрасте.

Целью исследования было разработать программу прогнозирования риска воспалительных заболеваний вульвы и влагалища в различные периоды полового созревания у девочек, для чего необходимо было определить социально-гигиенические, клинико-анамнестические, молекулярно-генетические маркеры, позволяющие прогнозировать развитие вульвовагинита; разработать систему принятия решения для прогнозирования у девочек развития вульвовагинита; оценить клиническую эффективность программы профилактики воспалительных заболеваний вульвы и влагалища у девочек в зависимости от стадии полового развития.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе детского поликлинического отделения № 1 Самарской городской поликлиники № 13 с февраля 2013 г. по август 2016 г. В исследовании приняли участие 252 здоровые девочки, проходившие профилактический осмотр на базе данного учреждения. Все участницы были разделены по группам в зависимости от возраста. Выбор возрастного интервала групп был обусловлен стадиями полового развития согласно шкале Таннера. Учитывая возрастные особенности, связанные с микробиоценозом влагалища, прогностические модели были созданы для групп девочек с разной стадией полового развития по Таннеру: первая группа — 74 девочки с I стадией полового развития, вторая группа — 178 девочек с II–V стадиями полового развития.

Критерии включения в исследование: возраст от 2 до 17 лет включительно; отсутствие субъективных жалоб; соматическое и гинекологическое здоровье; соответствие физического, полового и психического развития возрастным нормативам.

Критерии исключения: применение антибактериальных препаратов за месяц до обследования; наличие острых воспалительных заболеваний на момент осмотра и забора материала.

Все девочки и их матери были проанкетированы. В анкету входили вопросы о гигиенических навыках матерей и девочек, половом поведении подростков. Наряду с анкетированием провели клинико-лабораторное

исследование 452 образцов биологического материала: 226 соскобов отделяемого слизистой оболочки влагалища, 226 образцов мазка с внутренней поверхности щеки.

Перед исследованием проводили оценку жалоб, физического (рост, масса тела, индекс массы тела) и полового развития (половая формула по Таннеру, данные наружного гинекологического осмотра), выявляли особенности гигиены наружных половых путей.

Образцы материала отбирали со слизистой оболочки преддверия влагалища или из заднего свода влагалища через гименальные кольца с помощью универсального зонда. ДНК условно-патогенных микроорганизмов (УМП) выявляли с помощью наборов реагентов Фемофлор-17 (ДНК-технология; Россия), предназначенных для исследования состояния биоценоза урогенитального тракта с детекцией результатов в режиме реального времени. Спектр диагностируемых показателей включал: контроль взятия материала (КВМ); общую бактериальную массу (ОБМ); наличие микоплазм (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*), дрожжеподобных грибов (*Candida spp.*), бактерий (*Lactobacillus spp.*, *Enterobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*, *Lachnobacterium spp.* / *Clostridium spp.*, *Mobiluncus spp.* / *Corinebacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium vaginae*), а также идентификацию патогенов (*Mycoplasma genitalium*). Уровень КВМ был валиден во всех случаях, что подтверждает объективность последующего анализа полученных результатов.

Для выявления роли полиморфизма генов иммунного ответа в развитии и характере течения воспалительных заболеваний вульвы и влагалища и с учетом иммунного механизма развития данных патологий с помощью метода ПЦР были изучены особенности распределения у девочек частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов: IL1 $\beta$  (T-31C), IL1 $\beta$  (T-511C), IL1 $\beta$ (C-3953T), IL1 $\beta$  (G-1473C) в гене IL1 $\beta$ ; IL6 (C-174G) в гене IL6; TNF $\alpha$  (G-308A) в гене TNF $\alpha$ ; IL10 (G-1082A), IL10 (C-592A), IL10 (C-819T) в гене IL10; TGF $\beta$ 1 (Arg25Pro) в гене TGF $\beta$ 1.

Для построения деревьев решений использовали алгоритм CART (classification and regression tree — дерево классификации и регрессии). В алгоритме CART каждый узел дерева решений имеет двух потомков. На каждом шаге построения дерева формируемое в узле правило делило заданное множество наблюдений на две части — часть, в которой выполнялось правило, и часть, в которой правило не выполнялось. Компьютерный алгоритм решал задачу, по какому признаку делать разбиение и по какому значению провести разбиение; когда остановить построение дерева. Для выбора оптимального правила использовали функцию оценки качества разбиения, основанную на индексе Джини (Gini) [19].

Для построения деревьев решений использовали следующие группы признаков:

- данные о влагалищной микробиоте, полученные с помощью системы Фемофлор в грамм-эквивалентах и в процентном выражении относительно ОБМ;
- молекулярно-генетические исследования полиморфизмов генов цитокинов;
- особенности гигиены, полученные на основании анкетирования (интимная гигиена, прием душа, смена белья и др.).

Дополнительно рассчитывали процентное соотношение двух групп микроорганизмов:

- 1) лактобактерий (аэробов);
- 2) облигатных анаэробов.

### Апробация профилактических рекомендаций

Для апробации профилактических рекомендаций, сформированных на основании полученных данных, было проведено проспективное исследование с участием 167 девочек. Основная группа — 52 девочки, получавшие разработанные рекомендации, и 115 девочек группы контроля, получавшие общепринятые рекомендации детского гинеколога в обычном объеме. Наблюдательное исследование длилось в течение года, после чего был проведен статистический анализ с использованием методов доказательной медицины [20].

### Статистическая обработка полученных данных

Сбор и хранение данных осуществляли в пакете Microsoft Excel. Для статистического анализа использовали специализированное программное обеспечение: SPSS 21 (IBM SPSS Statistics; USA, лицензия № 20130626-3 лицензия № 20130626-3). В качестве описательных статистик применяли среднее арифметическое и его ошибку ( $M \pm m$ ) либо в случае скошенной формы распределения изучаемого признака — медиану и квартили. При анализе микроорганизмов в таблицах указывали, у скольких участниц выявлен данный вид, и его среднее содержание в виде десятичных логарифмов (lg). При этом средние значения вычисляли только по тем обследованным девочкам, у кого данные бактерии присутствовали. Для признаков, оцениваемых в номинальной шкале (заболевания в анамнезе, соблюдение гигиенических норм, генетические особенности), выполняли анализ таблиц сопряженности с расчетом критерия  $\chi^2$  Пирсона.

Качество классификации оценивали с помощью ROC-кривых (характеристических кривых) и показателей доказательной медицины: чувствительности и специфичности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учитывая возрастные особенности, связанные с микробиоценозом влагалища, построили прогностические модели развития вульвовагинита для групп девочек с разной стадией полового развития по Таннеру: первой группы (девочки с I стадией полового развития) и второй группы (девочки с II–V стадиями полового развития).

Прогностическая модель для девочек на I стадии полового развития представлена на рис. 1. Благоприятным фактором было наличие одновременно двух маркеров: преобладание облигатных анаэробов в микробиоте влагалища и гомозигота ТТ полиморфного варианта гена IL10 (C-819T). Нарушение хотя бы одного из этих условий, либо преобладание лактобацилл, либо присутствие хотя бы одного аллеля С в вышеуказанном гене приводило к повышенному риску возникновения вульвовагинита у девочек первой группы.

Качество прогнозирования оценивали, построив таблицу сопряженности наблюдаемых и предсказанных моделью исходов (табл. 1). Получено 9 ложноположительных прогнозов (предсказан моделью вульвовагинит, а девочка оказалась здоровой) и 3 — ложноотрицательных. Чувствительность метода для первой группы составила 80%, специфичность — 78%.

Согласно полученному дереву решений, прогнозирование осуществляли следующим способом.

1. Если процентное содержание аэробов было выше 34%, то вероятным считали развитие вульвовагинита. Если процентное содержание аэробов было 34% и менее, переходили к шагу 2.

2. Если в гене IL10 в локусе 819 выявляли гомозиготное состояние по аллелю ТТ, то вероятность развития вульвовагинита считали минимальной. Если в гене IL10

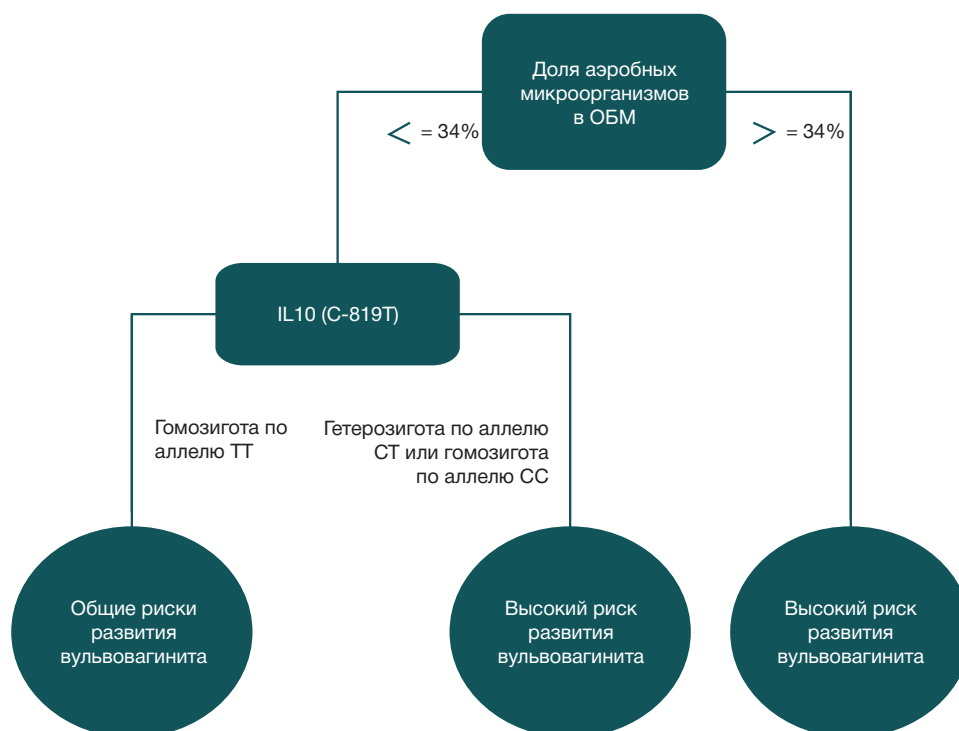


Рис. 1. Схема принятия решения по оценке риска бактериального вульвовагинита у девочек с I стадией полового развития по Таннеру



Таблица 1. Качество прогнозирования

| Фактически    | Предсказано моделью |               | Итого |
|---------------|---------------------|---------------|-------|
|               | Здорова             | Вульвовагинит |       |
| Здорова       | 32                  | 9             | 41    |
| Вульвовагинит | 3                   | 12            | 15    |
| Итого         | 35                  | 21            | 56    |

в локусе 819 выявляли гомозиготное состояние по аллелю С (генотип СС) или гетерозиготное (генотип СТ), то вероятность развития вульвовагинита оценивали как высокую.

Прогностическая модель развития вульвовагинита для девочек при II–V стадии полового развития представлена на рис. 2. Благоприятными факторами в группе девочек в препубертатном и пубертатном периодах были преобладание аэробов в микробиоте влагалища и наличие гомозиготы ТТ полиморфного варианта гена IL10 (С-3953Т). Нарушение хотя бы одного из этих условий (либо низкий уровень аэробов, либо присутствие хотя бы одного аллеля С в вышеназванном гене) приводило к повышенному риску развития вульвовагинита у девочек второй группы. Чувствительность полученных прогностических моделей составила 58,3%, специфичность — 94,1%.

Прогнозирование осуществляли следующим способом.

1. Если содержание аэробов в геном-эквивалентах оказывалось меньше или равно 6,15, переходили к шагу 2. Если содержание аэробов в геном-эквивалентах оказывалось больше 6,15, переходили к шагу 4.

2. Если в гене IL10 (полиморфизм С-592А) выявляли хотя бы один аллель А в гомо- или гетерозиготной форме, то вероятность развития вульвовагинита считали минимальной. Если в гене IL10 (полиморфизм С-592А) выявляли генотип СС, то переходили к шагу 3.

3. Если девочка ежедневно принимала душ, то вероятность развития вульвовагинита была минимальной.

Если девочка принимала душ нерегулярно, то вероятность развития вульвовагинита была высокой.

4. Если в гене IL1β (полиморфизм С-3953Т) выявляли генотип ТТ, то вероятность вульвовагинита была минимальной. Если в гене IL1β (полиморфизм С-3953Т) выявляли генотип СТ или СС, то переходили к шагу 3.

Известно, что замена аллеля Т в позиции -3953 гена IL1β на аллель С приводит к более низкой продукции данного провоспалительного цитокина и клинически ассоциирована с менее интенсивным иммунным ответом на антиген. В сочетании с недостаточным уровнем гигиены это может стать решающим фактором в формировании воспалительного процесса.

При замене аллеля А в позиции -592 гена IL10 на аллель С происходит повышение продукции цитокина. Поскольку IL10 — противовоспалительный цитокин, повышение его синтеза на этапах реализации иммунного ответа при развитии инфекции также может привести к снижению эффективности механизмов иммунной защиты. Несмотря на факт генетической детерминированности повышенной продукции IL10, из полученного дерева решения следует, что эта потенциальная возможность реализуется лишь при гигиенических погрешностях.

Итак, применение алгоритма деревьев решений позволило создать удобную рабочую схему для оценки риска и проанализировать различные комбинации аллелей в их взаимосвязи.

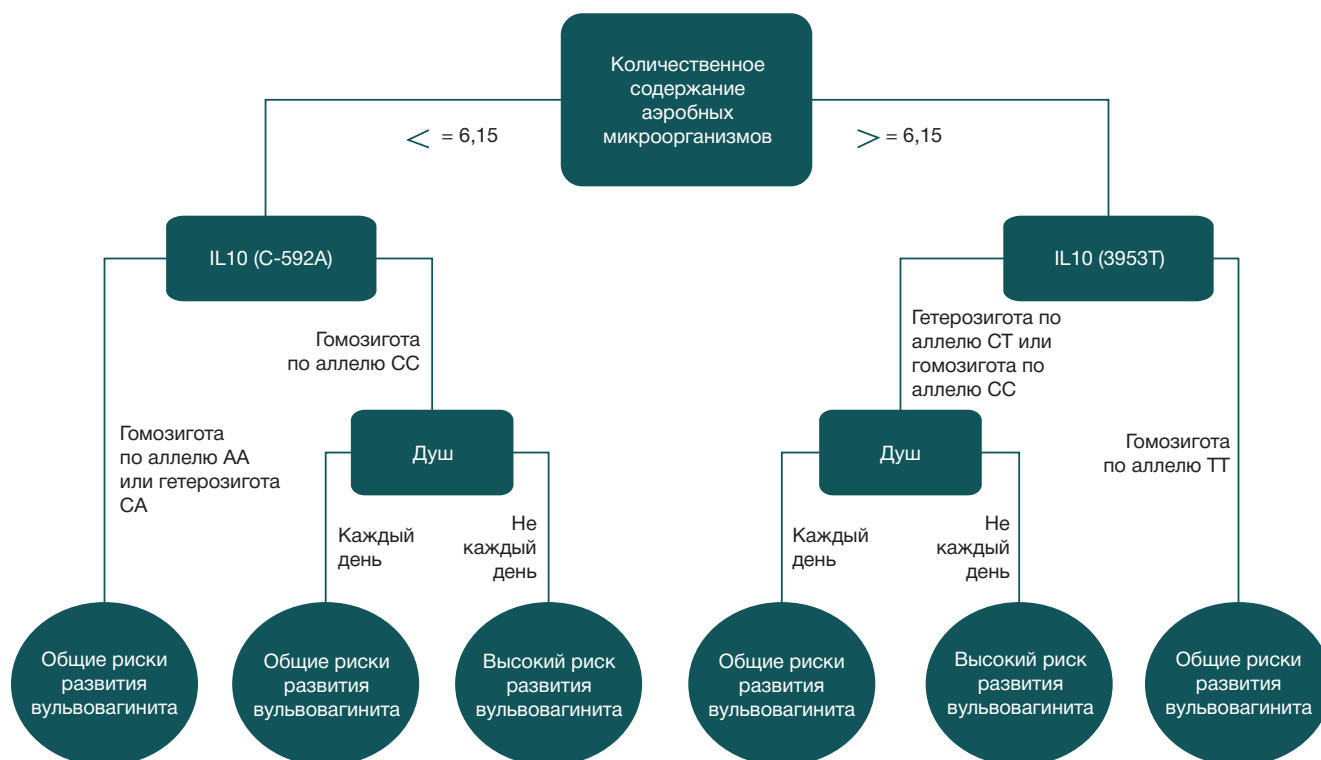


Рис. 2. Схема принятия решения по оценке риска неспецифических воспалительных заболеваний наружных половых путей у девочек со II–V стадиями полового развития по Таннеру

На основании достоверных факторов риска, полученных в регрессионной модели, нами предложены следующие рекомендации для родителей и девочек в возрасте 16 лет и старше по профилактике воспалительных заболеваний вульвы и влагалища в группе риска по развитию вульвовагинита.

Для девочек с I стадией полового развития: 1) своевременная санация очагов инфекции (инфекционные заболевания мочевыделительной системы и ЛОР-органов), проведение курсов реабилитационного лечения специалистами при выявленных соматических заболеваниях; 2) ежедневный душ и смена белья; 3) интимная гигиена 2 раза в день; 4) наблюдение у гинеколога раз в год.

Для девочек со II–V стадиями полового развития: 1) при наличии аллергических заболеваний — коррекция и наблюдение врача-аллерголога; 2) ежедневный душ и смена белья; 3) интимная гигиена 2 раза в день; 4) дебют половой жизни после 17 лет; 5) безопасное сексуальное поведение: использование надежных методов контрацепции, один половой партнер; 6) наблюдение у гинеколога раз в год.

Для оценки эффекта разработанной профилактической программы рассчитали ряд количественных показателей согласно рекомендациям Г. П. Котельникова, А. С. Шпигеля [20]. Предварительно составляли таблицу сопряженности применения дополнительных профилактических мероприятий и числа случаев с рецидивами (табл. 2).

Полученные в исследовании результаты представлены в табл. 3 и 4. Первые два базовых показателя, из которых осуществляли расчет эффективности вмешательства, — частота исходов (рецидивов) в группах лечения (ЧИЛ) и контроля (ЧИК):

$$\text{ЧИЛ} = a / (a + b);$$

$$\text{ЧИК} = c / (c + d).$$

95% ДИ для ЧИЛ и ЧИК рассчитаны по методу Уилсона. ЧИЛ составила 17,3% (95%ДИ: 9,4–29,7%), ЧИК — 34,8% (95%ДИ: 26,7–43,9%),  $p = 0,035$  по критерию  $\chi^2$ .

Насколько различаются частоты рецидива, оценивали на основании двух следующих показателей — снижении относительного и абсолютного риска (COP и CAP).

COP — относительное уменьшение частоты рецидива в группе лечения по сравнению с контрольной группой:

$$\text{COP} = (\text{ЧИК} - \text{ЧИЛ}) / \text{ЧИК}.$$

CAP — разность частот рецидива между группами контроля и лечения:

$$\text{CAP} = \text{ЧИК} - \text{ЧИЛ}.$$

Расчет 95% ДИ для COP выполняли по методу M. Gardner, D. Altman, для CAP — по L. Bjerre, J. LeLorier [21, 22].

В данном исследовании частоты рецидива при проведении дополнительных профилактических мероприятий (ЧИЛ) снизились на 17,5% (95% ДИ: 2,7–29,5%), т. е. вдвое:

$$\text{COP} = (34,8 - 17,3) / 34,8 \times 100\% = 50,2\%.$$

ОШ рецидива с ДИ, рассчитанным по J. Bland, D. Altman, составило 0,39 (95% ДИ: 0,17–0,89).

В последующем рассчитывали число больных, которых необходимо лечить новым методом (ЧБНЛ), чтобы предотвратить неблагоприятный исход у одного больного. ЧБНЛ численно равно обратной величине CAP (если

Таблица 2. Качество прогнозирования

| Группы  | Рецидив был  | Рецидива не было | Итого                |
|---|--------------|------------------|----------------------|
| Основная группа — реализация профилактической программы | <i>a</i>     | <i>b</i>         | <i>a + b</i>         |
| Контрольная группа — динамическое наблюдение            | <i>c</i>     | <i>d</i>         | <i>c + d</i>         |
| Итого   | <i>a + c</i> | <i>b + d</i>     | <i>a + b + c + d</i> |

Примечание: *a* — рецидив был, *b* — рецидива не было, *c* — рецидив был, *d* — рецидива не было.

Таблица 3. Результаты проведения профилактической программы

| Группы  | Эффект профилактической программы |                             | Итого |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|-------|
|   | Рецидив вульвовагинита            | Рецидива вульвовагинита нет |       |
| Основная группа — реализация профилактической программы | 9                                 | 43                          | 52    |
| Контрольная группа — динамическое наблюдение            | 40                                | 75                          | 115   |
| Итого   | 49                                | 118                         | 167   |

Таблица 4. Показатели, характеризующие эффект вмешательства

| Показатель                               | Сокращение | Вычисленные значения, % |
|--|------------|-------------------------|
| Частота исхода в группе лечения          | ЧИЛ        | 17,3 (9,4–29,7)         |
| Частота исхода в группе контроля         | ЧИК        | 34,8 (26,7–43,9)        |
| Снижение относительного риска            | COP        | 50,2 (5,1–73,9)         |
| Снижение абсолютного риска               | CAP        | 17,5 (2,7–29,5)         |
| Число больных, которых необходимо лечить | ЧБНЛ       | 6 (3–38)                |
| Относительный риск                       | ОР         | 0,5 (0,26–0,95)         |
| Отношение шансов                         | ОШ         | 0,39 (0,17–0,89)        |
| $\chi^2$ с поправкой Йетса               | $\chi^2$   | 4,47                    |
| <i>p</i>                                 | <i>p</i>   | 0,035                   |

CAP выражен в процентах, то 100% / CAP), а его ДИ: — величины, обратные границам 95% ДИ: CAP.

$$\text{ЧБНЛ} = 100\% / \text{CAP} = 100\% / 17,5\% = 6.$$

Это означает, что если шесть девочек из группы риска будут тщательно выполнять предложенные дополнительные более жесткие профилактические рекомендации, хотя бы одна из них гарантированно избежит развития вульвовагинита в течение ближайшего года. Следует отметить, что при данном объеме выборки ДИ: ЧБНЛ от 3 до 38 человек.

Сравнительный анализ частот рецидивов в группе, где проводили профилактические мероприятия, и статистических данных встречаемости вульвовагинитов в популяции также подтвердил эффективность предложенной профилактической программы. Из группы риска рецидивы развились в 17,4% случаев (95% ДИ по Клопперу–Пирсону составил 8,6–31,4%). У 6 девушек в течение года наблюдали клиническую картину неспецифического вульвовагинита, а у 3 — патологическую степень чистоты в мазке. Эти показатели с высокой значимостью ( $p < 0,001$ ) отличались от популяционных данных, согласно которым рецидивы воспалительных заболеваний нижних половых путей в данной возрастной группе развивались, в среднем, в 60% случаев [23, 24].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные согласуются с результатами другого исследования, авторы которого определили, что данное состояние, как правило, бывает вызвано неспецифическими факторами, и наиболее эффективным при профилактике бактериального вульвовагинита является соблюдение гигиенических мероприятий [25].

Важность выбора средств и соблюдение правил гигиены наружных половых органов подчеркивает еще одно исследование, показавшее, что 25% опрошенных используют спринцевание, 29% — женские спреи, и 19% — антисептические кремы в целях предотвращения ИППП, что увеличивает риск дисбиотических процессов во влагалище [26].

В кросссекционном исследовании, проведенном в Словакии, были определены наиболее частые нарушения интимной гигиены у девушек и молодых женщин 15–22 лет:

полное удаление волос в интимной области (95%), несоблюдение гигиенических процедур до и после полового акта (38%), отсутствие смены мокрого купальника на сухой (58,06%) и ношение непригодного нижнего белья. Респонденты более молодого возраста (15–18 лет), а также лица с более низким образовательным уровнем продемонстрировали худшие гигиенические навыки, которые могут быть связаны с более низкой осведомленностью [27].

Анализ литературы по проблеме нарушений микробиоценоза влагалища в детском возрасте показывает, что на современном этапе остается дискуссионным вопрос определения предикторов развития этой патологии.

Исследования, изучающие микрофлору влагалища в возрастном аспекте, разрознены и не всегда принимают во внимание индивидуальные возрастные «рамки» и не учитывают стадии становления репродуктивной системы.

Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании данной патологии мало изучена.

Остаются актуальными всестороннее изучение и определение роли эндогенных (микробиота влагалища и полиморфизм генов иммунного ответа, особенности соматического здоровья) и экзогенных факторов (включая поведенческие аспекты) в развитии воспалительных заболеваний вульвы и влагалища.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанные прогностические модели развития воспалительных заболеваний половых путей с учетом стадий полового развития по Таннеру целесообразно использовать для принятия решения по выбору лечебно-профилактических мероприятий у девочек в возрасте от 2 до 17 лет. 2. С позиции доказательной медицины обоснована необходимость профилактических мероприятий в группах риска по развитию воспалительных заболеваний вульвы и влагалища в детском возрасте, позволяющая снизить частоту рецидивов бактериального вульвовагинита в 3 раза. 3. Интерес представляет дальнейшее совершенствование алгоритма профилактики воспалительных заболеваний наружных половых путей в детском возрасте с применением современных компьютерных программ и выделением групп риска на основе персонализированного подхода.

## Литература

1. Alvarez-Olmos MI, et al. Vaginal lactobacilli in adolescent: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 2004; (31): 393–400.
2. Amjadi F, et al. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv Biomed Res*. 2014; (3): 1.
3. Attieh E, Maalouf S, Roumieh D, et al. Feminine hygiene practices among female patients and nurses in Lebanon. *Reproductive Health*. 2016; 13 (1): 59.
4. Beyiter I, Kavukcu S. Clinical presentation, diagnosis and treatment of vulvovaginitis in girls: a current approach and review of the literature. *World J Pediatr*. 2017; 13 (2): 101–5.
5. Казакова А. В. Программа профилактики бактериального вульвовагинита у девочек в зависимости от стадии полового развития [диссертация]. Самара, 2019.
6. Прилепская В. Н., Летуновская А. Б., Донников А. Е. Микробиоценоз влагалища и полиморфизм генов цитокинов как маркер здоровья женщины. *Гинекология*. 2015; (2): 4–13.
7. Altun I, Cinar ND, Dede C. Hygiene behaviour in university students in Turkey. *J Pak Med Assoc*. 2013; 63 (5): 585–9.
8. Гриневич Е. В. Характеристика микробиоценозов влагалища, кишечника и мочевыводящих путей при вульвовагинитах у девочек раннего возраста в зависимости от различных факторов риска [диссертация]. Смоленск, 2005.
9. Казакова А. В., Спиридонова Н. В., Уварова Е. В., Комарова М. В., Безрукова А. А. Многомерный анализ предикторов патологических выделений из половых путей в зависимости от образа жизни студенток. *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. 2016; (6): 90–7.
10. Чеботарева Ю. Ю., Костоева З. А., Григорян А. А. Анатомо-функциональные особенности репродуктивной системы при вульвовагинитах у часто болеющих детей. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2013; (1): 178–81.

11. Karlsson CL, Molin G, Cilio CM, et al. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at terma pilot study. *Pediatr Res.* 2011; (70): 282–6.
12. Kayserova J, et al. Serum immunoglobulin free light chains in severe forms of atopic dermatitis. *Clin Immunol.* 2010; (71): 312–6.
13. Kestřánek J, Jílek P, Matula V, et al. Jaký je aktuální stav diagnostiky vulvovaginálního dyskomfortu v České Republice? *Česká Gynekologie.* 2013; 78 (6): 522–7.
14. Mitchell C, Moreira C, Fredricks D, et al. Detection of fastidious vaginal bacteria in women with HIV infection and bacterial vaginosis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2009; (12) Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777244/>. (Date of access: 22.10.19).
15. Жижко Е. В., Чигановой С. Д. Молодая семья: проблемы и перспективы социальной поддержки. Красноярск: РУМЦ ЮО, 2011; 145 с.
16. Fischer GO. Chronic vulvitis in prepubertal girls. *Aust J Dermatology.* 2010; (51): 118–23.
17. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, et al. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J Biol Chem.* 2012; 287 (3): 2079–89.
18. Ott MA, Ofner S, Fortenberry JD. Beyond douching: use of feminine hygiene products and STI risk among young women. *J Sex Med.* 2009; (6): 1335–40.
19. Кохреидзе Н. А., Гуркин Ю. А., Кутушева Г. Ф. и др. Вульвовагинит в раннем детстве. СПб., 2017; 23 с.
20. Зиядуллаев У. Х. Состояние иммунитета при кандидозном вульвовагините у девочек подростков. *Проблемы репродукции.* 2014; (2): 32–4.
21. Gardner M J, Altman DG. *Statistics with confidence.* BMJ publications. Reprint. 1994: 51–52.
22. Bjerre LM, LeLorier J. Expressing the magnitude of adverse effects in case-control studies: “the number of patients needed to be treated for one additional patient to be harmed”. *BMJ.* 2000; (320): 503–6.
23. Здравоохранение в России. 2017: Статистический сб. Росстат. Москва, 2017; 170 с. Доступно по ссылке: [http://www.gks.ru/free\\_doc/doc\\_2017/zdrav17.pdf](http://www.gks.ru/free_doc/doc_2017/zdrav17.pdf).
24. Кириллова Е. Н., Павлюкова С. А., Акулич Н. С. Вульвовагинит у детей. *Медицинский журнал.* 2017; (2): 151–3.
25. Brabin L, Roberts SA, Fairbrother E, et al. Factors affecting vaginal pH levels among female adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2005; (81): 483–7.
26. Brotman RM, Erbeling EJ, Jamshidi RM, et al. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007; (20): 225–31.
27. Donders GG, et al. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2003; (189): 1433–8.

## References

1. Alvarez-Olmos MI, et al. Vaginal lactobacilli in adolescent: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 2004; (31): 393–400.
2. Amjadi F, et al. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv Biomed Res.* 2014; (3): 1.
3. Attieh E, Maalouf S, Roumieh D, et al. Feminine hygiene practices among female patients and nurses in Lebanon. *Reproductive Health.* 2016; 13 (1): 59.
4. Beyiter I, Kavukcu S. Clinical presentation, diagnosis and treatment of vulvovaginitis in girls: a current approach and review of the literature. *World J Pediatr.* 2017; 13 (2): 101–5.
5. Kazakova A. V. Programma profilaktiki bakterial'nogo vul'vovaginita u devochek v zavisimosti ot stadii polovogo razvitiya [dissertacija]. Samara, 2019. Russian.
6. Prilepskaya VN, Letunovskaya AB, Donnikov AE. Mikrobiocenoz vlagalishha i polimorfizm genov citokinov kak marker zdorov'ja zhenshhiny. *Ginekologija.* 2015; (2): 4–13. Russian.
7. Altun I, Cinar ND, Dede C. Hygiene behaviour in university students in Turkey. *J Pak Med Assoc.* 2013; 63 (5): 585–9.
8. Grinevich EV. Charakteristika mikrobiocenozov vlagalishha, kishechnika i mochevyvodjashhih putej pri vul'vovaginitah u devochek rannego vozrasta v zavisimosti ot razlichnyh faktorov riska [dissertacija]. Smolensk, 2005. Russian.
9. Kazakova AV, Spiridonova NV, Uvarova EV, Komarova MV, Bezrukova AA. Mnogomernyj analiz prediktorov patologicheskikh vydelenij iz polovyh putej v zavisimosti ot obraza zhizni studentok. *Reproduktivnoe zdorov'e detej i podrostkov.* 2016; (6): 90–7. Russian.
10. Chebotareva YuYu, Kostoeva ZA, Grigorjan AA. Anatomic-funkcional'nye osobennosti reproduktivnoj sistemy pri vul'vovaginitah u chasto bolejušchih detej. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik.* 2013; (1): 178–81. Russian.
11. Karlsson CL, Molin G, Cilio CM, et al. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at terma pilot study. *Pediatr Res.* 2011; (70): 282–6.
12. Kayserova J, et al. Serum immunoglobulin free light chains in severe forms of atopic dermatitis. *Clin Immunol.* 2010; (71): 312–6.
13. Kestřánek J, Jílek P, Matula V, et al. Jaký je aktuální stav diagnostiky vulvovaginálního dyskomfortu v České Republice? *Česká Gynekologie.* 2013; 78 (6): 522–7.
14. Mitchell C, Moreira C, Fredricks D, et al. Detection of fastidious vaginal bacteria in women with HIV infection and bacterial vaginosis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2009; (12) Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777244/>. (Date of access: 22.10.19).
15. Zhizhko EV, Chiganovoj SD. Molodaja sem'ja: problemy i perspektivy social'noj podderzhki. Krasnojarsk: RUMC JuO, 2011; 145 s. Russian.
16. Fischer GO. Chronic vulvitis in prepubertal girls. *Aust J Dermatology.* 2010; (51): 118–23.
17. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, et al. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J Biol Chem.* 2012; 287 (3): 2079–89.
18. Ott MA, Ofner S, Fortenberry JD. Beyond douching: use of feminine hygiene products and STI risk among young women. *J Sex Med.* 2009; (6): 1335–40.
19. Kohreidze NA, Gurkin YuA, Kutusheva GF, i dr. Vul'vovaginit v rannem detstve. SPb., 2017; 23 s. Russian.
20. Ziyadullaev UH. Sostojanie immuniteta pri kandidoznom vul'vovaginite u devochek podrostkov. *Problemy reprodukcii.* 2014; (2): 32–4. Russian.
21. Gardner MJ, Altman DG. *Statistics with confidence.* BMJ publications. Reprint. 1994: 51–52.
22. Bjerre LM, LeLorier J. Expressing the magnitude of adverse effects in case-control studies: “the number of patients needed to be treated for one additional patient to be harmed”. *BMJ.* 2000; (320): 503–6.
23. Zdravoochranenie v Rossii. 2017: Statisticheskij sb. Rosstat. Moskva, 2017; 170 s. Dostupno po ssylke: [http://www.gks.ru/free\\_doc/doc\\_2017/zdrav17.pdf](http://www.gks.ru/free_doc/doc_2017/zdrav17.pdf).
24. Kirillova EN, Pavlyukova SA, Akulich NS. Vul'vovaginit u detej. *Medicinskij zhurnal.* 2017; (2): 151–3. Russian.
25. Brabin L, Roberts SA, Fairbrother E, et al. Factors affecting vaginal pH levels among female adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2005; (81): 483–7.
26. Brotman RM, Erbeling EJ, Jamshidi RM, et al. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2007; (20): 225–31.
27. Donders GG, et al. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2003; (189): 1433–8.

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СПЕЦИАЛЬНУЮ ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Т. М. Брук<sup>1</sup>, П. А. Терехов<sup>1</sup>✉, Ф. Б. Литвин<sup>1</sup>, С. В. Верлин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Смоленская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Смоленск, Россия

<sup>2</sup> Медико-восстановительный центр Государственного училища олимпийского резерва, Бронницы, Московская область, Россия

В условиях ужесточения борьбы с допингом и ограничения использования синтетических фармпрепаратов ведется поиск эффективных средств для повышения физической работоспособности и ускорения восстановления спортсменов. Одним из таких средств является воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ). Целью настоящего исследования было изучение физиологического ответа функциональных систем высококвалифицированных гребцов-академистов (женщины) на курсовое воздействие НИЛИ. Для наблюдения за организмом спортсменок использовали лазерную доплеровскую флоуметрию (ЛДФ), математический анализ сердечного ритма, нейроэнергоскрининг, а также педагогическое тестирование с использованием тренажера Concept 2. После освещения шеи в области проекции сонных артерий импульсным инфракрасным НИЛИ наблюдали повышение показателя перфузии крови на 38% ( $p < 0,05$ ), показателя утилизации кислорода клетками на 48% ( $p < 0,05$ ), а также снижение показателя сатурации гемоглобина кислородом на 16% ( $p < 0,05$ ). В результате применения НИЛИ происходило повышение активности автономного механизма регуляции с ростом мощности спектра колебаний ритма сердца (TP) на 41% ( $p < 0,05$ ), мощности высокочастотных колебаний (HF) — на 73% ( $p < 0,05$ ), росло влияние центрального механизма со снижением амплитуды моды (АМо) на 71% ( $p < 0,05$ ), индекса напряжения (ИН) — на 175% ( $p < 0,05$ ). Воздействие НИЛИ способствовало повышению эффективности доставки кислорода в отдельные области коры больших полушарий с ростом уровня постоянных потенциалов (УПП). Благодаря воздействию НИЛИ на 3,32% ( $p > 0,05$ ) выросла скорость «прохождения» спортсменками дистанции 2000 м. Обнаруженные эффекты применения НИЛИ позволяют расширить спектр физиотерапевтических средств, способствующих повышению специальной физической работоспособности спортсменов и ускорению восстановления.

**Ключевые слова:** НИЛИ, вариабельность сердечного ритма, микроциркуляция, нейроэнергоскрининг, спортсмены, работоспособность

**Информация о вкладе авторов:** Т. М. Брук — анализ функционального состояния мозга (нейроэнергоскрининг), проведение лазерных процедур; П. А. Терехов — оценка специальной физической подготовленности, статистическая обработка результатов, подготовка рукописи; Ф. Б. Литвин — изучение процессов микрогемодинамики, вариабельности сердечного ритма, подготовка рукописи; С. В. Верлин — отбор участников исследования.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «СГАФКСТ» (протокол № 67 от 9 сентября 2018 г.). Все спортсменки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Александрович Терехов  
ул. Кирова, д. 42 А, кв. 11.04, г. Смоленск, 214018; terehov\_86@mail.ru

**Статья получена:** 30.09.2019 **Статья принята к печати:** 21.10.2019 **Опубликована онлайн:** 30.10.2019

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.071

## PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF THE LOW-INTENSITY LASER RADIATION IMPACT ON THE HIGHLY QUALIFIED ATHLETES' SPECIAL PHYSICAL PERFORMANCE

Bruck TM<sup>1</sup>, Terekhov PA<sup>1</sup>✉, Litvin FB<sup>1</sup>, Verlin SV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Smolensk State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism, Smolensk, Russia

<sup>2</sup> Rehabilitation Center of the State School of the Olympic reserve, Bronnitsy, Moscow region, Russia

In the context of strengthening the fight against doping and limiting the use of synthetic pharmaceuticals, the effective remedies to increase physical performance and accelerate the recovery of athletes are being sought. One of such remedies is exposure to low-level laser radiation (LLLR, LLLT). The study was aimed to investigate the physiological response of highly qualified female rowers' functional systems to the LLLR irradiation course. To monitor the body of athletes, we used laser Doppler flowmetry (LDF), mathematical analysis of heart rate, neuroenergy mapping, as well as pedagogical testing using the Concept 2 simulator. After irradiation of the neck in the projection of the carotid arteries with pulsed infrared LLLR, the blood perfusion rate increased by 38% ( $p < 0.05$ ) and cell oxygen utilization rate increased by 48% ( $p < 0.05$ ). The decrease in the hemoglobin oxygen saturation by 16% ( $p < 0.05$ ) was also observed. Due to LLLT, the activity of the autonomous regulation mechanism increased with an increase in the total power of the heart rate variability spectrum (TP) by 41% ( $p < 0.05$ ), and in high-frequency power (HF) by 73% ( $p < 0.05$ ). The influence of central mechanism decreased with a decrease in amplitude mode (АМо) by 71% ( $p < 0.05$ ), and in stress-index (SI) by 175% ( $p < 0.05$ ). Irradiation by LLLR promoted the efficiency of oxygen delivery to certain cerebral cortex areas with the increase of SPL. After LLLT, the speed of 2000 meters distance "passing" by athletes also increased by 3.32% ( $p > 0.05$ ). The discovered effects of LLLT allow one to expand the range of physiotherapeutic agents that enhance the special physical performance of athletes and accelerate recovery.

**Keywords:** LLLR (LLLT), heart rate variability, microcirculation, neuroenergy mapping, athletes, physical performance

**Author contribution:** Bruck TM — analysis of brain function (neuroenergy mapping), laser therapy; Terekhov PA — physical fitness assessment, statistical analysis of the results, manuscript writing; Litvin FB — study of microcirculation and heart rate variability, manuscript writing; Verlin SV — selection of study participants.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Local Ethics Committee of Smolensk State Academy of Physical Culture, Sport and Tourism (protocol № 67 dated September 9, 2018). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel A. Terekhov  
Kirova, 42 A, kv. 11.04, Smolensk, 214018; terehov\_86@mail.ru

**Received:** 30.09.2019 **Accepted:** 21.10.2019 **Published online:** 30.10.2019

**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.071

Часто для достижения рекордных показателей высококвалифицированные спортсмены работают на пределе функциональных возможностей организма, что нередко

сопровождается нарушением гомеостаза. Одним из путей сохранения гомеостаза является расширение адаптационных границ органов и систем, обеспечивающих ответную



реакцию организма на тренировочные и соревновательные физические нагрузки, что, в итоге, обеспечивает достижение приспособительного результата [1].

Согласно литературным данным, в результате поглощения энергии низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) происходит ее трансформация в биологические реакции на всех уровнях организации живого организма, которые запускают процессы саморегуляции и самовосстановления нарушенного гомеостаза [2–5]. В частности, под воздействием НИЛИ происходит активация ферментов антиоксидантной защиты, усиливается метаболизм клеток, стабилизируются биомембраны. Воздействие НИЛИ на эластичность мембран эритроцитов способствует их проникновению в капилляры микроциркуляторного русла, а стимуляция аэробной фазы энергетического обмена с включением в него недоокисленных метаболитов гликолиза и продуктов окисления липидов через опосредованный мембранный механизм приводит к насыщению кислородом венозной крови и улучшению микроциркуляции [6]. При этом недостаточно изученными остаются вопросы влияния НИЛИ на микроциркуляторно-тканевые отношения [7].

Лазерная терапия является важнейшей составляющей современного медико-биологического обеспечения спорта высших достижений практически на всех этапах подготовки спортсменов. Всестороннее системное наблюдение за спортсменами с использованием комплекса информативных и легко воспроизводимых в любых условиях способов и методов оперативной оценки состояния организма (в том числе биохимических и гематологических показателей, показателей лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), а также данных variability сердечного ритма (BCP), нейроэнергетического картирования (НЭК) и т. д.) позволяет своевременно и качественно осуществлять коррекцию гомеостаза для адекватного формирования не переходящих граней патологии процессов утомления и ускорения процессов восстановления.

Исследователями установлено потенцирующее воздействие НИЛИ на физическую работоспособность спортсменов различной квалификации, занимающихся разными видами спорта. При воздействии НИЛИ на биологически активные точки было выявлено повышение показателя аэробной работоспособности у 80% футболистов с последующим ростом объема произведенной механической работы [8]. Существенное увеличение абсолютных и относительных величин PWC170 после воздействия НИЛИ было получено у спортсменов циклических видов спорта. Непродолжительное воздействие НИЛИ не вызывало значимых изменений в биохимическом составе крови, но повышало активность парасимпатических влияний на сердечный ритм [9, 10]. Под влиянием НИЛИ изменялся гуморально-гормональный статус организма спортсменов. В частности, было показано увеличение концентрации бета-эндорфина, глюкокортикоидов, трийодтиронина, тироксина у спортсменов игровых видов спорта, лыжников-гонщиков [11, 12].

Описаны системные механизмы, обеспечивающие эффекты лазерной стимуляции в комплексной подготовке хоккеистов. Позитивные структурно-функциональные изменения организма хоккеистов и пловцов приводят к выраженному повышению его тренированности [13, 14].

Целью настоящего исследования было изучить физиологический ответ важнейших функциональных систем организма высококвалифицированных гребцов-академистов (женщины) на курсовое воздействие НИЛИ

в специально-подготовительном периоде годового цикла спортивной подготовки. Перед нами стояли следующие задачи: оценить влияние НИЛИ на систему микрогемодикуляции, выявить изменения в регуляции сердечного ритма, изучить влияние на метаболическую активность нейронов коры больших полушарий, а также оценить уровень физической работоспособности высококвалифицированных спортсменов.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено в октябре 2018 г., в нем приняли участие 24 высококвалифицированных гребца-академиста (женщины, учащиеся Государственного училища олимпийского резерва г. Бронницы Московской области). Исследование проходило на базе учебно-тренировочного центра.

Испытуемые были разделены на основную (ОГ) и контрольную (КГ) группы. Основную группу составили 12 спортсменок. Критерии включения: уровень квалификации — мастер спорта (МС); членство в сборной команде Московской области. Критерии исключения: низкая квалификация спортсменки, острый период заболевания. В контрольную группу вошли 12 спортсменок (МС), не прошедших квалификационный отбор в сборную команду. Представители обеих групп занимались по единой тренировочной программе.

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе изучали функциональное состояние отдельных систем организма и физическую подготовленность спортсменок ОГ и КГ до воздействия НИЛИ. Далее спортсменки обеих групп в недельном тренировочном цикле выполняли специальную тренировочную программу по подготовке к соревновательному сезону.

Спортсменок ОГ утром до начала тренировки в течение 7 дней подвергали воздействию НИЛИ, освещая шею симметрично с обеих сторон в области сонного треугольника с помощью двухканального лазерного терапевтического аппарата «Узор-А-2К» («Восход»; Россия). Длина волны излучения составляла  $0,89 \pm 0,02$  мкм; режим излучения импульсный, частота повторения импульсов — 1500 Гц, время экспозиции — 10 мин. Спортсменкам КГ проводили «мнимую» процедуру воздействия НИЛИ без включения излучающих головок аппарата «Узор-А-2К». После лазерной процедуры проводили повторную регистрацию изучаемых показателей.

Оценку variability сердечного ритма (BCP) атлетов проводили с помощью аппарата «Варикард 2.51» («ИВНМТ «РАМЕНА»; Россия). Запись кардиоинтервалограмм продолжительностью 5 мин проводили по общепринятой методике в положении сидя. Оценивали следующие количественные показатели BCP: ЧСС, показатели, характеризующие активность автономного (мощность спектра колебаний ритма сердца, TP; мощность высокочастотных колебаний, HF) и центрального механизмов регуляции (мощность низкочастотных колебаний, LF; мощность ультранизкочастотных колебаний, VLF; амплитуда моды, AMo), показатель преобладания центральных механизмов регуляции над автономным (индекс напряжения, ИН).

В качестве регистрирующей аппаратуры для изучения микрогемодикуляции применяли промышленный лазерный анализатор капиллярного кровотока ЛАКК-М (НПП «Лазма»; Россия), после чего анализировали параметр микроциркуляции (ПМ) в перфузионных единицах

(перф. ед.). Амплитудно-частотный анализ осцилляций кровотока выполняли с помощью программы вейвлет-анализа LDF3.0.2.384 (НПП «Лазма»; Россия).

Вклад активного механизма в формирование сосудистого тонуса оценивали по величине амплитуды нейрогенных (Ан), миогенных (Ам) и эндотелийзависимых (Аэ) колебаний (перф. ед.). Вклад пассивного механизма оценивали по величине амплитуды дыхательных (Ад) и пульсовых (Ап) колебаний (перф. ед.). Применяя указанный прибор, методом оптической тканевой оксиметрии оценивали уровень насыщения крови кислородом ( $SO_2$ , %) и величину удельного потребления кислорода (U, усл. ед.). По показателям уровня постоянных потенциалов (УПП) оценивали метаболическую активность ткани мозга в нижнелобной, центральной, затылочной, левой и правой височных областях.

Для топографического картирования электрической активности мозга применяли пятиканальный аппаратно-программный комплекс «НЕЙРО-КМ» (научно-медицинская фирма «СТАТОКИН»; Россия) по стандартной методике [15]. В качестве показателей специальной физической подготовленности учитывали время «прохождения» дистанции 2000 м на специальном гребном тренажере «Concept 2 Model D» (PM5; Китай). Тест выполняли в зале в условиях постоянной температуры и освещенности.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения IBM

SPSS Statistics 19 для Windows (StatSoft, Inc.; США). Для сравнения исследуемых показателей у спортсменок ОГ и КГ применяли U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения показателей в ОГ и КГ с минимальным эффектом НИЛИ, а также с показателями после лазерного воздействия использовали T-критерий Уилкоксона. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чрескожная лазерная стимуляция в условиях стандартных тренировочных нагрузок способствует расширению функциональных возможностей организма на разных уровнях организации, от клеточного до системного. Нами была изучена динамика процессов, происходивших в микрососудистом русле после курсового воздействия НИЛИ.

У спортсменок ОГ по сравнению с исходным уровнем на 38% достоверно повысился уровень перфузии ( $p < 0,05$ ), у спортсменок КГ показатель микроциркуляции за это время увеличился на 5% ( $p > 0,05$ ) (табл. 1). Веским доказательством биостимулирующего эффекта НИЛИ на обмен кислорода у спортсменок ОГ было снижение на 14%  $SO_2$  в микроциркуляторном русле ( $p < 0,05$ ) при наличии тенденции к увеличению  $SO_2$  в КГ на 2% ( $p > 0,05$ ). На диффузию кислорода из крови в ткани указывало достоверное повышение на 49% ( $p < 0,05$ )

**Таблица 1.** Показатели микроциркуляции крови у высококвалифицированных гребцов-академистов (женщины) на отдельных этапах исследования ( $M \pm m$ )

| № п/п | Показатели    | Группы | Этапы исследования |                  | $p < 0,05$ |
|-------|---------------|--------|--------------------|------------------|------------|
|       |               |        | I                  | II               |            |
| 1     | ПМ, перф. ед. | ОГ     | $12,92 \pm 1,61$   | $17,86 \pm 2,05$ | *          |
|       |               | КГ     | $11,50 \pm 1,34$   | $12,07 \pm 1,80$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |
| 2     | $SO_2$ , %    | ОГ     | $80,2 \pm 4,04$    | $69,1 \pm 3,72$  | *          |
|       |               | КГ     | $81,2 \pm 4,56$    | $82,9 \pm 5,17$  |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |
| 3     | U, усл. ед.   | ОГ     | $1,87 \pm 0,10$    | $2,79 \pm 0,16$  | *          |
|       |               | КГ     | $1,68 \pm 0,08$    | $1,70 \pm 0,12$  |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |
| 4     | Ап, перф. ед. | ОГ     | $13,25 \pm 1,84$   | $18,01 \pm 2,59$ | *          |
|       |               | КГ     | $15,38 \pm 2,34$   | $13,79 \pm 1,83$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $> 0,05$         |            |
| 5     | Ад, перф. ед. | ОГ     | $20,06 \pm 2,93$   | $22,57 \pm 3,12$ |            |
|       |               | КГ     | $17,84 \pm 2,50$   | $23,19 \pm 4,01$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $> 0,05$         |            |
| 6     | Ам, перф. ед. | ОГ     | $25,70 \pm 3,10$   | $39,41 \pm 4,80$ | *          |
|       |               | КГ     | $26,24 \pm 4,42$   | $27,11 \pm 3,86$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |
| 7     | Ан, перф. ед. | ОГ     | $31,93 \pm 2,72$   | $44,69 \pm 4,90$ | *          |
|       |               | КГ     | $29,13 \pm 3,15$   | $30,42 \pm 3,16$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |
| 8     | Аэ, перф. ед. | ОГ     | $35,78 \pm 4,96$   | $58,00 \pm 5,70$ | *          |
|       |               | КГ     | $30,85 \pm 3,75$   | $33,55 \pm 4,28$ |            |
|       |               | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$      |            |

**Примечание:** ПМ — параметр микроциркуляции;  $SO_2$  — насыщение крови кислородом в тканях кожи; U — потребление кислорода; Ап — пульсовые колебания значений ПМ; Ад — дыхательные колебания значений ПМ; Ам — миогенные колебания значений ПМ; Ан — нейрогенные колебания значений ПМ; Аэ — эндотелиальные колебания значений ПМ. \*\* — межгрупповые различия; \* — внутригрупповые различия при  $p < 0,05$ .

расчетного показателя утилизации кислорода тканями. У спортсменок КГ рост данного показателя фактически отсутствовал (1%,  $p > 0,05$ ).

В нашем исследовании у спортсменок ОГ тонус миоцитов снижался на 53% ( $p < 0,05$ ), тем самым увеличивая просвет сосудов микроциркуляторного русла. Кроме того, артериолы увеличивали свой просвет в результате снижения активности симпатических нервов вегетативной нервной системы, окончания которых иннервировали гладкомышечные клетки среднего слоя сосудов. По данным вейвлет-анализа, показатель нейрогенного тонуса снижался на 40% ( $p < 0,05$ ). Под влиянием НИЛИ повышалась пропускная способность обменного звена микроциркуляторного русла, обусловленная вазодилатацией микрососудов разного диаметра.

На уровне вегетативной нервной системы (ВНС) курсовое воздействие НИЛИ снижало активность симпатического отдела, одновременно усиливая влияние на сердце парасимпатического отдела ВНС, оказывающего трофотропный восстановительный эффект (табл. 2). В процессе исследования было установлено, что ИН снизился на 174%, АМо — на 48% ( $p < 0,05$ ), на 41% достоверно повысились показатели ТР и частных спектральных характеристик (на 121% LF-спектра и на 73% HF-спектра,  $p < 0,05$ ). Обращает на себя внимание рост на 75% спектрального показателя VLF, который характеризует работу корково-гуморальных центров.

В отсутствие физиотерапевтического воздействия у спортсменок КГ в ходе тренировочных нагрузок сохранялась высокая активность симпатических влияний с тенденцией на снижение влияния блуждающего нерва на

ритм сердца. Высокая активность симпато-адреналовой системы усиливала энергетическое состояние. Благодаря лазерным процедурам у спортсменок ОГ в период восстановления между тренировочными занятиями усиливался анаболизм в тканях, что обеспечивало высокую функциональную готовность организма к тренировочной деятельности. При этом у спортсменок КГ сохранялся повышенный катаболизм, что вызывало накопление утомления из-за недовосстановления организма после очередной тренировки.

Воздействие НИЛИ опосредованно стимулирует функциональные адаптационные изменения в нейронах коры больших полушарий. После курсового воздействия НИЛИ у высококвалифицированных спортсменок ОГ усиливалась метаболическая активность ткани мозга в исследуемых областях, о чем свидетельствует рост значений уровня постоянных потенциалов (УПП). По сравнению с исходным состоянием (табл. 3) наблюдалось увеличение показателя УПП на 94% в лобной области, на 109% в центральной, на 33% в затылочной и 29% в левой височной областях (во всех случаях  $p < 0,05$ ).

Распределение постоянного потенциала после лазерных процедур подчиняется принципу куполообразности (табл. 3). У спортсменок КГ максимальные значения УПП зарегистрированы в затылочной (Oz) и левой височной областях (Ts). Таким образом, нарушается «куполообразность» распределения энерготрат по отделам головного мозга, т. е. происходит некая деформация.

У гребцов-академистов КГ величина показателя УПП за время исследования тенденциозно нарастала, не достигая статистически значимого уровня различий.

**Таблица 2.** Показатели вариабельности сердечного ритма у высококвалифицированных гребцов-академистов (женщины) на отдельных этапах исследования ( $M \pm m$ )

| № п/п | Показатели           | Группы | Этапы исследования |                   | $p < 0,05$ |
|-------|----------------------|--------|--------------------|-------------------|------------|
|       |                      |        | I                  | II                |            |
| 1     | ЧСС, уд./мин         | ОГ     | 75,66 ± 3,20       | 66,94 ± 2,04      | *          |
|       |                      | КГ     | 77,17 ± 3,18       | 75,67 ± 3,25      |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |
| 2     | АМо, %               | ОГ     | 40,10 ± 3,55       | 26,52 ± 2,41      | *          |
|       |                      | КГ     | 37,92 ± 0,91       | 38,55 ± 0,88      |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |
| 3     | ИН, усл. ед.         | ОГ     | 167,02 ± 19,53     | 60,73 ± 6,38      | *          |
|       |                      | КГ     | 126,27 ± 13,87     | 123,94 ± 13,64    |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |
| 4     | ТР, мс <sup>2</sup>  | ОГ     | 3793,11 ± 522,24   | 5340,14 ± 701,02* | *          |
|       |                      | КГ     | 1564,17 ± 209,46   | 1598,62 ± 213,95  |            |
|       |                      | $p$    | **< 0,05           | **< 0,05          |            |
| 5     | HF, мс <sup>2</sup>  | ОГ     | 967,95 ± 130,74    | 1671,85 ± 175,12  | *          |
|       |                      | КГ     | 877,50 ± 120,29    | 581,31 ± 70,37    |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |
| 6     | LF, мс <sup>2</sup>  | ОГ     | 889,65 ± 153,29    | 1965,54 ± 233,56  | *          |
|       |                      | КГ     | 473,67 ± 50,07     | 477,00 ± 50,29    |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |
| 7     | VLF, мс <sup>2</sup> | ОГ     | 967,75 ± 150,62    | 1693,76 ± 195,17  | *          |
|       |                      | КГ     | 519,50 ± 79,60     | 426,57 ± 61,58    |            |
|       |                      | $p$    | > 0,05             | **< 0,05          |            |

**Примечание:** ЧСС — частота сердечных сокращений; АМо — амплитуда моды; ИН — индекс напряженности; ТР — мощность спектра колебаний ритма сердца; HF — мощность высокочастотных колебаний ритма сердца; LF — мощность низкочастотных колебаний ритма сердца; VLF — мощность ультранизкочастотных колебаний ритма сердца. \*\* — межгрупповые различия; \* — внутригрупповые различия при  $p < 0,05$ .

Таким образом, после курсового воздействия НИЛИ повышался энергетический метаболизм нейронов в изученных областях коры больших полушарий.

Корректную оценку эффективности применения НИЛИ в качестве средства восстановления целесообразно проводить по динамике уровня тренированности. В настоящем исследовании уровень тренированности оценивали с помощью специфического тестирования на гребном тренажере «Concept 2». Полученные нами показатели времени «прохождения» дистанции 2000 м высококвалифицированными гребцами-академистами представлены в табл. 4. На первом этапе (исходный уровень) не было выявлено достоверных различий между значениями времени «прохождения» дистанции спортсменками обеих групп. В частности, испытуемые КГ «преодолели» дистанцию за  $456,55 \pm 3,55$  с, а атлеты ОГ — за  $454,07 \pm 2,43$  с ( $p > 0,05$ ).

Курсовое воздействие НИЛИ оказывает стимулирующее влияние на организм спортсменок ОГ, обеспечивая повышение скорости «прохождения» дистанции 2000 м до  $435,63 \pm 2,34$  с, что на 3,32% меньше исходного показателя ( $p < 0,01$ ). У гребцов КГ время «прохождения» дистанции почти не меняется ( $453,02 \pm 3,34$  с) ( $p > 0,05$ ). Следовательно, в условиях стандартно построенного тренировочного процесса курсовое воздействие НИЛИ приводит к повышению специальной физической работоспособности женщин-гребцов на этапе специально-подготовительного периода годичного цикла спортивной тренировки.

**Таблица 3.** Уровень постоянных потенциалов (мВ) в различных областях коры головного мозга у высококвалифицированных гребцов-академистов (женщины) на отдельных этапах исследования ( $M \pm m$ )

| № п/п | Показатели                  | Группы | Этапы исследования |                    | $p < 0,05$ |
|-------|-----------------------------|--------|--------------------|--------------------|------------|
|       |                             |        | I                  | II                 |            |
| 1     | Нижнелобная область (Fz)    | ОГ     | $7,129 \pm 0,384$  | $13,851 \pm 0,531$ | *          |
|       |                             | КГ     | $5,214 \pm 0,312$  | $5,915 \pm 0,334$  |            |
|       |                             | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,05$        |            |
| 2     | Центральная область (Cz)    | ОГ     | $7,277 \pm 0,390$  | $15,239 \pm 0,745$ | *          |
|       |                             | КГ     | $7,315 \pm 0,411$  | $7,854 \pm 0,425$  |            |
|       |                             | $p$    | $** < 0,05$        | $> 0,05$           |            |
| 3     | Затылочная область (Oz)     | ОГ     | $9,724 \pm 0,404$  | $12,954 \pm 0,525$ | *          |
|       |                             | КГ     | $8,057 \pm 0,354$  | $8,948 \pm 0,477$  |            |
|       |                             | $p$    | $> 0,05$           | $> 0,05$           |            |
| 4     | Левая височная область (Ts) | ОГ     | $10,121 \pm 0,334$ | $13,063 \pm 0,526$ | *          |
|       |                             | КГ     | $10,289 \pm 0,351$ | $11,973 \pm 0,382$ |            |
|       |                             | $p$    | $> 0,05$           | $> 0,05$           |            |

**Примечание:** ОГ — основная группа; КГ — контрольная группа. \*\* — межгрупповые различия; \* — внутригрупповые различия при  $p < 0,05$ .

**Таблица 4.** Время «прохождения» дистанции 2000 м на тренажере «Concept 2» высококвалифицированными гребцами-академистами (женщины) на отдельных этапах исследования ( $M \pm m$ )

| № п/п | Показатели   | Группы | Этапы исследования |                   | $p < 0,05$ |
|-------|--|--------|--------------------|-------------------|------------|
|       |  |        | I                  | II                |            |
| 1     | Время «прохождения» дистанции 2000 м на тренажере «Concept 2», с | ОГ     | $454,07 \pm 2,43$  | $435,63 \pm 2,34$ | *          |
|       |  | КГ     | $456,55 \pm 3,55$  | $453,02 \pm 3,34$ |            |
|       |  | $p$    | $> 0,05$           | $** < 0,01$       |            |

**Примечание:** ОГ — основная группа; КГ — контрольная группа. \*\* — межгрупповые различия; \* — внутригрупповые различия при  $p < 0,05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных данных показал, что курсовое действие НИЛИ повышает функциональные возможности системы микрогемоциркуляции. Нами был зафиксирован достоверный рост перфузии, свидетельствующий о повышении метаболической активности на клеточном и тканевом уровнях. В основе повышения интенсивности микрокровотока лежит вазодилатация микрососудов, обусловленная работой внешних и внутренних механизмов регуляции [16–18].

Из внутренних механизмов наибольший вклад в повышение пропускной способности сосудов микроциркуляторного русла обеспечивает эндотелиальный компонент. С участием эндотелиоцитов формируется вазодилататорная реакция, при которой тонус микрососудов снижается на 62% ( $p < 0,05$ ). Пусковым стимулом, возникающим в ответ на воздействие лазерным излучением, является выделение  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми клетками эндотелия вазодилатора, оксида азота NO, предшественника эндотелиального фактора расслабления стенок сосудов (EDRF) [19]. Миогенный вазодилаторный эффект обусловлен снижением тонуса гладкомышечных клеток сосудистой стенки.

На уровне гладкомышечных клеток воздействие НИЛИ повышает уровень внутриклеточного цАМФ в цитозоле, что приводит к активации кальциевой АТФазы, снижению ионов кальция в цитоплазме и расслаблению гладкомышечных клеток сосудов [20].



Выраженный эффект лазерной гемифотостимуляции связан с влиянием низкоинтенсивного излучения на обмен веществ. Возрастает окисление энергетических материалов — глюкозы, пирувата, лактата, что ведет к улучшению микроциркуляции и утилизации кислорода в тканях [21]. Снижается показатель сатурации гемоглобина кислородом в смешанной крови микроциркуляторного русла, растет показатель удельного потребления кислорода тканями, что облегчает их метаболизм и обеспечивает энергообразование в форме АТФ в клетках [22]. Повышение функциональной активности клеток происходит, в первую очередь, вследствие кальций-зависимого повышения редокс-потенциала митохондрий, повышения их функциональной активности и синтеза АТФ [23–26]. В митохондриях под воздействием НИЛИ ускоряется перенос электронов по дыхательной цепи [26].

С позиции теории функциональных систем П. К. Анохина, для реализации организмом приспособительного эффекта привлекаются структурные и функциональные компоненты разного уровня и локализации. Локальное улучшение гомеостаза на микроциркуляторно-тканевом уровне является составной частью перестройки вегетативного баланса на системном уровне [27]. Под влиянием больших физических нагрузок нарушается оптимальное соотношение между симпатическим и парасимпатическим звеньями ВНС в пользу преобладания симпатикотонии, отражая дисбаланс реципрокных регуляторных влияний ВНС на кардиальную систему спортсмена. В таких условиях наблюдается выраженное напряжение компенсаторных механизмов сердечно-сосудистой системы, сопровождающееся дезадаптацией [28].

По результатам исследования установлено, что воздействие НИЛИ изменяет активность нервных центров, участвующих в регуляции сердечной деятельности. Исследователи отмечают, что воздействие НИЛИ активизирует работу кальций-зависимых механизмов [29]. Кальций является внутриклеточным посредником действия ряда гормонов, в первую очередь медиаторов ЦНС и ВНС [30], что предполагает участие лазер-индуцированных эффектов в нейрогуморальной регуляции. По окончании цикла процедур снижается активность симпатического отдела ВНС, повышается вклад парасимпатического отдела и снижается напряженность регуляторных процессов в целом. В целом воздействие НИЛИ способствует развертыванию трофотропных процессов, направленных на сохранение энергетических и пластических ресурсов.

Хорошо известно, что спортивная деятельность дает результаты только тогда, когда мастерство атлета отточено до автоматизма, когда минимально участие центральных регулирующих систем. Система с относительно автономными связями в силу независимости ее элементов отличается большей пластичностью, что облегчает ее приспособление к изменяющимся условиям среды, включая приспособление к условиям спортивной деятельности [31]. Увеличение числа «степеней свободы» синусового узла способствует достижению организмом функционального оптимума при выполнении нагрузки. В результате индекс напряженности (ИН) снижается на 174% ( $p < 0,05$ ). Динамика спектральных показателей свидетельствует о переходе на более высокий уровень адаптационных возможностей, обеспечивающих устойчивость организма спортсмена к тренировочным нагрузкам. Так, показатель роста активности автономного контура управления сердечным ритмом (НФ) повышается на 73%, центрального (LF) — на 121%. Одновременно на 75% усиливается вклад корково-гуморальных

центров управления (VLF) на фоне брадикардии. Такая спектрограмма может отражать высокие функциональные возможности организма спортсмена [32].

Повышение функционального резерва организма после курсового воздействия низкоинтенсивного магнито-лазерного излучения отмечали и ранее [33, 34]. Лазерный свет выполняет регулирующую функцию по восстановлению вегетативного баланса, оказывая сдерживающее влияние на активность симпатoadренальной системы [35]. Получены доказательства взаимосвязи между повышенной относительной мощностью спектра сердечного ритма в диапазоне VLF частоты с изменением частотных и временных параметров ритмической активности головного мозга [36]. Ритмическую активность головного мозга отмечали в фронтальной, теменной и затылочной областях мозга.

Некоторые исследователи отмечают, что основной характеристикой нормального энергообмена выступает принцип куполообразности, при котором максимальные значения потенциала регистрируются в центральном отведении (Cz) и плавно снижаются к периферии [37]. Очевидно, сдвиг УПП в затылочную и левую височную области может быть связан с усилением функциональной активности неспецифических ретикуло-лимбико-кортикальных нейронных связей [38].

Дисбаланс регуляторных влияний со стороны высшей нервной деятельности, зависящих от головного мозга и его коры, приводит к нарушению скорости условно-рефлекторных реакций, нарушению взаимодействия между первой и второй сигнальными системами, сопровождается психоэмоциональными и поведенческими отклонениями [39]. Однако механизмы адаптациогенеза корковых нейронов спортсменов под влиянием предельно высоких физических нагрузок остаются недостаточно исследованными. Результаты выполненного нами исследования по изучению метаболической активности нейронов в отдельных областях коры больших полушарий после курсового воздействия НИЛИ демонстрируют улучшение в 1,3–2 раза величины уровня постоянного потенциала.

Формирование структурно-функциональных адаптационных изменений в организме под влиянием НИЛИ способствует повышению физической работоспособности и тренированности высококвалифицированных гребцов-академистов. Взаимодействие низкоэнергетического лазерного излучения с организмом позволяет создать высокоэффективную методику использования лазерных терапевтических аппаратов в комплексе мероприятий по повышению специальной работоспособности, тренированности и спортивной результативности атлетов [40].

## Выводы

Проведенные нами исследования показали, что воздействие НИЛИ улучшает функциональное состояние организма спортсменов и повышает эффективность спортивной подготовки на тренировочном (подготовительном) этапе. Системный ответ на воздействие НИЛИ сопровождало увеличение перфузии обменного звена микроциркуляторного русла, облегчение диффузии кислорода из крови в ткани и рост эффективности использования кислорода в клетке. В значительной степени усиление микрокровотока было обеспечено дополнительным притоком крови из магистральных сосудов. После курсового воздействия НИЛИ повышалась метаболическая активность нейронов



отдельных областей коры больших полушарий. Таким образом, в результате лазерного воздействия возрастает адаптационная устойчивость организма, расширяются

его функциональные возможности, что способствует повышению специальной физической работоспособности спортсменов и ускорению восстановления.

## Литература

1. Анохин П. К. Принципиальные вопросы общей теории функциональных систем. Принципы системной организации функций. М.: Наука, 1973; с. 5–61.
2. Кузнецова Т. Н., Павлов С. Е. Методика применения физиотерапевтических средств (низкоэнергетических ИК-лазеров) в тренировочном процессе пловцов. Методическая разработка для преподавателей, аспирантов и студентов РГАФК. М.: РГАФК, 1997; 52 с.
3. Доровских В. А., Бородин Е. А., Бородин Г. П. и др. Влияние низкоэнергетических лазеров на свободнорадикальное окисление глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и каталазы эритроцитов. В сборнике: Материалы Международного конгресса «Лазер и здоровье–99»; Москва, 1999; 435–6.
4. Козель А. И., Попов Г. К. Механизм действия лазерного облучения на тканевом и клеточном уровне. Вестник РАМН. 2000; (2): 41–3.
5. Улащик В. С. Анализ механизмов первичного действия низкоинтенсивного лазерного излучения на организм. Здравоохранение (Минск). 2016; (6): 41–51.
6. Потемкин Л. А. Медико-биологическое обеспечение и квантовая медицина спорта высших достижений. М.: Изд-во ЗАО «МИЛТА-ПКП ГИТ», 2001; 135 с.
7. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. М.: ЛИБРОКОМ, 2014; 498 с.
8. Богослова Т. В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на физическую работоспособность студентов института физической культуры [диссертация]. Ярославль, 2004.
9. Осипова Н. В. Сравнительная характеристика влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на уровень физической работоспособности студентов различных специализаций спортивного вуза [диссертация]. СПб., 2008.
10. Прокопюк З. Н. Устойчивость организма спортсменов к гипоксии и ее коррекция низкоинтенсивным лазерным воздействием [диссертация]. Смоленск, 2010.
11. Лифке М. В. Динамика гормонального статуса спортсменов различной квалификации, выполняющих физическую нагрузку умеренной мощности на фоне лазерного воздействия [диссертация]. Курск, 2009.
12. Волкова А. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональное состояние организма лыжников-гонщиков [диссертация]. Смоленск, 2011.
13. Павлов С. Е., Разумов А. Н., Павлов А. С. Лазерная стимуляция в медико-биологическом обеспечении подготовки квалифицированных спортсменов. М.: Спорт, 2017; 536 с.
14. Павлов С. Е., Павлов А. С., Петров А. А. Особенности динамики среднегрупповых показателей дисперсионных характеристик функционирования миокарда хоккеистов, использовавших в предстартовой подготовке метод лазерной стимуляции спортивной работоспособности. В сборнике: Олимпийский бюллетень № 15, сост. Мельникова Н. Ю., Трескин А. В., Леонтьева Н. С., Никифорова А. Ю.; М.: Изд-во ЗАО «Олимпийская панорама», 2014; 247–51.
15. Фокин В. Ф., Пономарёва Н. В., Кунцевич Г. И. Электрофизиологические корреляты скорости движения крови по средней мозговой артерии здорового человека. Вестник РАМН. 2013; (10): 57–60.
16. Bollinger A. Is high-frequency flux motion due to respiration or to vasomotion activity? In: A. Bollinger, et al. Vasomotion and flow motion. Prog Appl Microcirculation Basel, Karger. 1993; (20): 52–58.
17. Fagrell B. Problems using laser Doppler on the skin in clinical practice. Laser Doppler.– London – Los Angeles – Nicosia: Med – Orion Publishing Company. 1994; 49–54.
18. Федорович А. А. ВЭБ-капилляроскопия — новые возможности мониторинга капиллярного кровотока в коже человека. В сборнике: Материалы XII международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология»; 01–03 июля 2019 г.; Ярославль: Канцлер 2019; 11.
19. Murrey RK et al. Harper's Biochemistry. Appleton & Lange, 1996; 700 p.
20. Daniolos A, Lerner AB, Lerner MR. Action of light on frog pigment cells in culture. Pigment Cell Res. 1990; 3 (1): 38–43.
21. Тамбовский А. Н., Сидоренко Т. А. Некоторые результаты применения внутренировочного средства в процессе подготовки гребцов. Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта. 2015; 5 (123): 182–85.
22. Кару Т. Й. Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии. В книге: Москвин С. В., Буйлин В. А., редакторы. Низкоинтенсивная лазерная терапия. М.: Техника, 2000; с. 71–94.
23. Мальцев А. П. Механизмы действия лазерного излучения на прокариотические клетки. Международный студенческий научный вестник. 2016; (6): 23.
24. Filippin L, Magalhães PJ, Di Benedetto G et al. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. J Biol Chem. 2003; 278 (40): 39224–34.
25. Schaffer M, Sroka R, Fuchs C et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1997; 40 (3): 253–57.
26. Елисеенко В. И. Механизмы взаимодействия низкоэнергетического лазерного излучения ИК-спектра с биологическими тканями В сборнике: Лазеры и аэроионы в медицине под ред. Евстигнеева А. Р., Каплана М. А; Калуга–Обнинск, 1997; 71–2.
27. Крупаткин А. И. Неинвазивная оценка тканевого дыхания у человека с использованием вейвлет-анализа колебаний сатурации крови кислородом и кровотока в микрососудах кожи. Физиология человека. 2012; 38 (4): 67–73.
28. Гаврилова Е. А., Ларинцева О. С. Факторы риска внезапной сердечной смерти спортсменов на разных этапах спортивной подготовки по данным кардиологического обследования. Спортивная медицина: наука и практика. 2018; (2): 33–6.
29. Москвин С. В., Федорова Т. А., Фотеева Т. С. Плазмаферез и лазерное освечение крови. М.–Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2018; 416 с.
30. Греннер Д. Гормоны, регулирующие метаболизм кальция. В книге: Р. Марри, Д Греннер и др., редакторы. Биохимия человека, том 2. М.: Мир, 1993; с. 193–204.
31. Баевский Р. М. Кибернетический анализ процессов управления сердечным ритмом // Актуальные проблемы физиологии и патологии кровообращения. М.: Медицина, 1976; 161 с.
32. Жемайтис Д. И. Вегетативная реакция синусового узла сердца и здоровых и больных. Анализ сердечного ритма. Вильнюс: Москлас, 1982; с. 522.
33. Брук Т. М., Терехов П. А., Осипова Н. В., Зюкин А. В. Эффективность воздействия комплексного применения физических и эргогенных средств на показатели специальной физической подготовленности и анаэробной работоспособности высококвалифицированных спортсменов. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2019; 1 (65): 113–9.

34. Тамбовский А. Н., Сидоренко Т. А., Юрьев Ю. Н., Шурманов Е. Г. Влияние комплекса физиотерапевтических средств на организм спортсменов. Ученые записки университета имени П. Ф. Лесгафта. 2015; (5): 123.
35. Елизаров Н. А. Адаптационная кардиопротекция физическими факторами в лечении и профилактике ишемической болезни сердца [диссертация]. М., 2007.
36. Еремеева О. В. Физиологические особенности эффектов биоуправления потенциалами мозга у спортсменов с доминированием метаболического модулятора сердечного ритма [диссертация]. Архангельск, 2012.
37. Jo H-G, Schmidt S, Inacker E, Markowiak M, Hinterberger Th.

## References

1. Anokhin PK. Printsipial'nye voprosy obshchey teorii funktsional'nykh sistem. Printsipy sistemnoy organizatsii funktsiy. M.: Nauka, 1973; p. 5–61.
2. Kuznetsova TN, Pavlov SE. Metodika primeneniya fizioterapevticheskikh sredstv (nizkoenergeticheskikh IK-lazero) v trenirovochnom protsesse plovtsov. Metodicheskaya razrabotka dlya prepodavateley, aspirantov i studentov RGAFK. M.: RGAFK, 1997; 52 p.
3. Dorovskikh VA, Borodin EA, Borodina GP et al. Vliyanie nizkoenergeticheskikh lazero na svobodnoradiikal'noe okislenie glyukoza-6-fosfat dehidrogenazy i katalazy eritrotsitov. V sbornike: Materialy Mezhdunarodnogo kongressa "Lazer i zdorov'e-99"; Moskva, 1999; 435–36.
4. Kozel AI, Popov GK. Mekhanizm deystviya lazernogo oblucheniya na tkanevom i kletochnom urovne. Vestnik RAMN. 2000; (2): 41–3.
5. Ulashchik VS. Analiz mekhanizmov pervichnogo deystviya nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na organizm. Zdravookhranenie (Minsk). 2016; (6): 41–51.
6. Potemkin NV. Mediko-biologicheskoe obespechenie i kvantovaya meditsina sporta vysshikh dostizheniy. M.: Izd-vo ZAO "MILTA-PPK GiT", 2001; 135 p.
7. Krupatkin AI, Sidorov VV. Funktsional'naya diagnostika sostoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkaneykh sistem: Kolebaniya, informatsiya, nelineynost'. Rukovodstvo dlya vrachev. M.: LIBROKOM, 2014; 498 p.
8. Bogoslova TV. Vliyanie nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na fizicheskuyu rabotosposobnost' studentov instituta fizicheskoy kul'tury [dissertatsiya]. Yaroslavl', 2004.
9. Osipova NV. Sravnitel'naya kharakteristika vliyaniya nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na uroven' fizicheskoy rabotosposobnosti studentov razlichnykh spetsializatsiy sportivnogo vuza [dissertatsiya]. SPb., 2008.
10. Prokopyuk ZN. Ustoychivost' organizma sportsmenov k gipoksii i ee korektsiya nizkointensivnym lazernym vozdeystviem [dissertatsiya]. Smolensk, 2010.
11. Lifke MV. Dinamika gormonal'nogo statusa sportsmenov razlichnoy kvalifikatsii, vypolnyayushchikh fizicheskuyu nagruzku umerennoy moshchnosti na fone lazernogo vozdeystviya [dissertatsiya]. Kursk, 2009.
12. Volkova AA. Vliyanie nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya na funktsional'noe sostoyanie organizma lyzhnikov-gonshchikov [dissertatsiya]. Smolensk, 2011.
13. Pavlov SE., Razumov AN, Pavlov AS. Laser stimulation in medical and biological provision of qualified sportsmen training. M.: Sport, 2017; 536 p.
14. Pavlov SE, Pavlov AS, Petrov AA. Osobennosti dinamiki chrednegruppovykh pokazateley dispersionnykh kharakteristik funktsionirovaniya miokarda khokkeistov, ispol'zovavshikh v predstartovoy podgotovke metod lazernoy stimulatsii sportivnoy rabotosposobnosti. V sbornike: Olimpiyskiy byulleten' № 15, sost. Mel'nikov NYu, Treskin AV, Leonteva NS, Nikiforova AYU; M.: Izd-vo ZAO "Olimpiyskaya panorama", 2014; 247–51.
15. Fokin VF, Ponomareva NV, Kuntsevich GI. Elektrofiziologicheskie korrelyaty skorosti dvizheniya krovi po sredney mozgovooy arterii zdorovogo cheloveka. Vestnik RAMN. 2013; (10): 57–60.
16. Bollinger A. Is high-frequency flux motion due to respiration or to vasomotion activity? In: A. Bollinger et al. Vasomotion and flow motion. Prog Appl Microcirculation. Basel, Karger. 1993; (20): 52–8.
17. Fagrell B. Problems using laser Doppler on the skin in clinical practice. Laser Doppler. London – Los Angeles – Nicosia: Med – Orion Publishing Company. 1994; 49–54.
18. Fedorovich AA. VEB-kapillyaroskopiya — novye vozmozhnosti monitorirovaniya kapillyarnogo krovotoka v kozhe cheloveka. V sbornike: Materialy XII mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii "Mikrotsirkulyatsiya i gemoreologiya"; 01–03 iyulya 2019 g.; Yaroslavl': Kantsler 2019: 11.
19. Murrey RK et al. Harper's Biochemistry. Appleton & Lange, 1996; 700 p.
20. Daniolos A, Lerner AB, Lerner MR. Action of light on frog pigment cells in culture. Riment Cell Res. 1990; 3 (1): 38–43.
21. Tambovskiy AN, Sidorenko TA. Nekotorye rezul'taty primeneniya vnetrenirovochnogo sredstva v protsesse podgotovki grebtsov. Uchenye zapiski universiteta imeni P.F. Lesgafta. 2015; 5 (123): 182–85.
22. Karu TY. Pervichnye i vtorichnye kletochnye mekhanizmy lazernoy terapii. V knige: Moskvin SV, Buylin VA, redaktory. Nizkointensivnaya lazernaya terapiya. M.: Tekhnika, 2000; p. 71–94.
23. Maltsev AP. Mekhanizmy deystviya lazernogo izlucheniya na prokarioticheskie kletki. Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik. 2016; (6): 23.
24. Filippin L, Magalhães PJ, Di Benedetto G et al. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. J Biol Chem. 2003; 278 (40): 39224–34.
25. Schaffer M, Sroka R, Fuchs C et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1997; 40 (3): 253–57.
26. Eliseenko VI. Mekhanizmy vzaimodeystviya nizkoenergeticheskogo lazernogo izlucheniya IK-spektra s biologicheskimi tkanyami V sbornike: Lazery i aeroiony v meditsine pod red. Evstigneeva AR, Kaplana MA; Kaluga–Obninsk, 1997: 71–2.
27. Krupatkin AI. Neinvazivnaya otsenka tkanevogo dykhaniya u cheloveka s ispol'zovaniem veyvlet-analiza kolebaniy saturatsii krovi kislorodom i krovotoka v mikrososudakh kozhi. Fiziologiya cheloveka. 2012; 38 (4): 67–73.
28. Gavrilova EA, Larintseva OS. Faktory riska vnezapnoy serdechnoy smerti sportsmenov na raznykh etapakh sportivnoy podgotovki po dannym kardiologicheskogo obsledovaniya. Sportivnaya meditsina: nauka i praktika. 2018; (2): 33–6.
29. Moskvin SV, Fedorova TA, Foteeva TS. Plazmaferез i lazernoe osvechivanie krovi. M.-Tver': OOO «Izd-vo «Triada», 2018; 416 p.
30. Grenner D. Gormony, reguliruyushchie metabolism kal'tsiya. V knige: R Marri, D Grenner et al, redaktory. Biokhimiya cheloveka, tom 2. M.: Mir, 1993; p. 193–204.
31. Bayevsky RM. Cybernetic analysis of heart rate control processes. Actual problems of physiology and pathology of blood circulation. M.: Medicine, 1976; 161.
32. Zhemaytite DI. Vegetativnaya reaktsiya sinusovogo uzla serdtsa i zdorovykh i bol'nykh. Analiz serdechnogo ritma. Vil'nyus: Mosklas, 1982; p. 522.
33. Bruk TM, Terekhov PA, Osipova NV, Zyukin AV. Effektivnost' Meditation and attention: A controlled study on long-term meditators in behavioral performance and event-related potentials of attentional control. International Journal of Psychophysiology. 2016; (99): 33–9.

- vozdeystviya kompleksnogo primeneniya fizicheskikh i ergogennykh sredstv na pokazateli spetsial'noy fizicheskoy podgotovlennosti i anaerobnoy rabotosposobnosti vysokokvalifitsirovannykh sportsmenov. Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii. 2019; 1 (65): 113–9.
34. Tambovskiy AN, Sidorenko TA, Yurev YuN, Shurmanov EG. Vliyaniye kompleksa fizioterapevticheskikh sredstv na organizm sportsmenov. Uchenye zapiski universiteta imeni PF Lesgafta. 2015; (5): 123.
  35. Elizarov NA. Adaptatsionnaya kardioprotektsiya fizicheskimi faktoram v lechenii i profilaktike ishemicheskoy bolezni serdtsa [dissertatsiya]. M., 2007.
  36. Ereemeeva OV. Physiological features of the effects of biofeedback of brain potentials in athletes with dominance of metabolic heart rate modulator [dissertation]. Arkhangelsk, 2012.
  37. Jo H-G, Schmitd S, Inacker E, Markowiak M, Hinterberger Th. Meditation and attention: A controlled study on long-term meditators in behavioral performance and event-related potentials of attentional control. International Journal of Psychophysiology. 2016; (99): 33–9.
  38. Muller TA, Shilov SN. Osobennosti urovnya aktivatsii lobnoy kory i neyrometabolizma golovnoy mozga u detey 7–10 let s SDVG. Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. 2017; 7 (5): 193–206.
  39. Moskvina SV, Kochetkov AV. Effektivnye metodiki lazernoy terapii. M.–Tver': Triada, 2016; 80 p.
  40. Pavlov SE, Pavlova TN. Tekhnologiya podgotovki sportsmenov. MO, Shchelkovo: Izdatel' Markhotin PYu, 2011; 344 p.