

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 Гейдебрехт, Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Дороница

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. Боженко, 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. Негребецкий, 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

СОТРУДНИЧЕСТВО 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 (h²) 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.2019-06

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

© Фото лошади: <https://unsplash.com>



Подписано в печать 31.12.2019
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
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, Nadezda Tikhomirova

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)
Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobrinskii 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)
Skoblina 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

COLLABORATION 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.2019-06

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

© Photo horse: <https://unsplash.com>



Approved for print 31.12.2019
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

МУЛЬТИЦЕНТРОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Оценка эффективности работы мультидисциплинарной бригады как новой модели оказания реабилитационной помощи пациентам с церебральным инсультом

Г. Е. Иванова, Е. В. Мельникова, А. А. Шмонин, Е. В. Вербицкая, А. А. Белкин, Р. А. Бодрова, П. В. Лебедев, М. Н. Мальцева, С. В. Прокопенко, М. С. Просвирнина, А. М. Сарана, Л. В. Стаховская, А. Ю. Суворов, Д. Р. Хасанова, Н. А. Шамалов

Effectiveness of multidisciplinary team as a new model of after stroke patients' rehabilitation

Ivanova GE, Melnikova EV, Shmonin AA, Verbitskaya EV, Belkin AA, Bodrova RA, Lebedev PV, Maltseva MN, Prokopenko SV, Prosvirina MS, Sarana AM, Stakhovskaya LV, Suvorov AYU, Khasanova DR, Shamalov NA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

16

Оценка качества жизни по Международной классификации функционирования при множественных церебральных аневризмах после эндоваскулярного лечения

А. А. Олейник, Н. Е. Иванова, Е. А. Олейник, А. Ю. Иванов

Quality of life of patient with multiple cerebral aneurysms after endovascular treatment: assessment by the criteria of International Classification of Functioning

Oleynik AA, Ivanova NE, Oleynik EA, Ivanov AYU

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

22

Интериктальная эпилептиформная активность во сне и в бодрствовании у пациентов с височной эпилепсией

А. Г. Брутян, А. И. Белякова-Бодина, С. М. Долгова, Т. Н. Пушкар, А. А. Абрамова

Interictal epileptiform activity in sleep and wakefulness in patients with temporal lobe epilepsy

Broutian AG, Belyakova-Bodina AI, Dolgova SM, Pushkar TN, Abramova AA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

28

Технология интерфейса мозг-компьютер как контролируемый идеомоторный тренинг в реабилитации больных после инсульта

Ю. В. Бушкова, Г. Е. Иванова, Л. В. Стаховская, А. А. Фролов

Brain-computer-interface technology with multisensory feedback for controlled ideomotor training in the rehabilitation of stroke patients

Bushkova YUV, Ivanova GE, Stakhovskaya LV, Frolov AA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

35

Изменение температурной болевой чувствительности у крыс после введения N-концевых аналогов адrenокортикотропного гормона

С. А. Доданова, И. И. Бобынцев, А. Е. Бельх, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов

Changes in the nociceptive response to thermal stimulation in rats following administration of N-terminal analogs of the adrenocorticotrophic hormone

Dodonova SA, Bobyntsev II, Belykh AE, Andreeva LA, Myasoedov NF

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

40

Получение рекомбинантного штамма Herpesvirus Saimiri путем совместной культивации трансфицированной и перmissive клеточных культур

А. Хамад, С. П. Чумаков

Engineering a recombinant Herpesvirus Saimiri strain by co-culturing transfected and permissive cells

Hamad A, Chumakov SP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

48

Мутант фототоксичного белка KillerRed, не формирующий DsRed-подобного хромофора

Д. А. Горбачев, К. С. Саркисян

A mutant of the phototoxic protein KillerRed that does not form DsRed-like chromophore

Gorbachev DA, Sarkisyan KS

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Ассоциация SNP генов белков урокиназной системы с развитием плацентарной недостаточности

Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Н. А. Олейникова, Г. А. Мишуровский, П. Г. Мальков, Л. М. Самоходская, О. Б. Панина, В. А. Ткачук

Associations between SNPs in the genes encoding urokinase system proteins and the risk of placental insufficiency

Revina DB, Balatskiy AV, Larina EB, Oleynikova NA, Mishurovsky GA, Malkov PG, Samokhodskaya LM, Panina OB, Tkachuk VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

61

Особенности полиморфизма генов провоспалительных цитокинов у девочек, предрасположенных к частым респираторным заболеваниям

А. В. Казакова, Е. В. Уварова, Л. В. Лимарева, О. И. Линева, Г. Н. Светлова, А. А. Трупакова

Polymorphism of proinflammatory cytokine genes in girls predisposed to recurrent respiratory infections

Kazakova AV, Uvarova EV, Limareva LV, Lineva OI, Svetlova GN, Trupakova AA

МНЕНИЕ

67

Автономные биолюминесцентные системы: перспективы использования в имиджинге живых организмов

З. М. Осипова, А. С. Щеглов, И. В. Ямпольский

Autonomous bioluminescent systems: prospects for use in the imaging of living organisms

Osipova ZM, Shcheglov AS, Yampolskiy IV

МНЕНИЕ	71
<p>Возможности применения CD4⁺-регуляторных Т-клеток в терапии аутоиммунных заболеваний А. В. Чуров, А. И. Сюткина, К. Ы. Мамашов, Е. К. Олейник</p> <p>The potential of CD4⁺ regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases Churov AV, Siutkina AI, Mamashov KY, Oleinik EK</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	76
<p>Гепатопротекторное действие полифенолов при экспериментальной токсической патологии печени, вызванной тиацетамидом Д. И. Дергачева, О. И. Кляйн, А. А. Мариничев, Н. Н. Гесслер, Е. С. Богданова, М. С. Смирнова, Е. П. Исакова, Ю. И. Дерябина</p> <p>Hepatoprotective effect of polyphenols in rats with experimental thioacetamide-induced toxic liver pathology Dergachova DI, Klein OI, Marinichev AA, Gessler NN, Bogdanova ES, Smirnova MS, Isakova EP, Deryabina YI</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	83
<p>Цилиндроклеточная метаплазия и пищевод Барретта: морфологическая неоднородность и иммуногистохимический фенотип Л. М. Михалева, К. С. Войтковская, Е. Д. Федоров, Н. А. Грачева, А. Е. Бирюков, А. В. Шидий-Закруа, М. Ю. Гущин</p> <p>Columnar metaplasia and Barrett's esophagus: morphological heterogeneity and immunohistochemical phenotype Mikhaleva LM, Voytkovskaya KS, Fedorov ED, Gracheva NA, Birukov AE, Shidiy-Zakrua AV, Guschin MYu</p>	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	90
<p>Особенности липидома у больных с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии А. А. Рогожина, Л. О. Минушкина, А. В. Алесенко, У. А. Гутнер, М. А. Шупик, И. Н. Курочкин, О. А. Малошицкая, С. А. Соколов, Д. А. Затеищников</p> <p>Lipidome features in patients with different probability of family hypercholesterolemia Rogozhina AA, Minushkina LO, Alessenko AV, Gutner UA, Shupik MA, Kurochkin IN, Maloshitskaya OA, Sokolov SA, Zateyshchikov DA</p>	
МЕТОД	98
<p>Обратный меридиональный циклодиализ <i>ab interno</i> в лечении открытоугольной глаукомы — предварительные результаты В. Кумар, М. А. Фролов, Г. Н. Душина, А. С. Шрадка, А. И. Беззаботнов, К. А. Абу Заалан</p> <p>Reverse meridional cyclodialysis <i>ab interno</i> in management of open angle glaucoma — a preliminary report Kumar V, Frolov MA, Dushina GN, Shradqa AS, Bezzabotnov AI, Abu Zaalan KA</p>	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	106
<p>Клинический пример восстановления проходимости печеночной вены и портосистемного шунта через 10 лет после TIPS М. Ш. Цициашвили, В. Н. Шиповский, Д. В. Монахов, А. С. Челяпин, А. Б. Гусейнов</p> <p>Re-establishing the patency of the hepatic vein and the portosystemic shunt 10 years after the TIPS procedure: a clinical case Tsitsiashvili MSh, Shipovskiy VN, Monakhov DV, Chelyapin AS, Huseynov AB</p>	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	110
<p>Клинический случай: удаление пролиферирующей пиломатрикомы CO₂-лазером Т. А. Гайдина, А. С. Дворников, П. А. Скрипкина</p> <p>Case report: removal of a proliferating pilomatricoma with a CO₂ laser Gaydina TA, Dvornikov AS, Skripkina PA</p>	
МНЕНИЕ	114
<p>Диагностика инфекционной урогенитальной патологии методом количественной ПЦР М. Р. Рахматулина, И. С. Галкина</p> <p>Quantitative PCR in diagnosing infectious urogenital pathology Rakhmatulina MR, Galkina IS</p>	

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНОЙ БРИГАДЫ КАК НОВОЙ МОДЕЛИ ОКАЗАНИЯ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ПОМОЩИ ПАЦИЕНТАМ С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ИНСУЛЬТОМ

Г. Е. Иванова^{1,2,9}, Е. В. Мельникова^{1,5,8}, А. А. Шмонин^{1,5,8}, Е. В. Вербицкая⁵, А. А. Белкин^{1,3}, Р. А. Бодрова^{1,4,7}, П. В. Лебедев¹, М. Н. Мальцева^{1,5}, С. В. Прокопенко^{1,6}, М. С. Просвирнина^{1,8}, А. М. Сарана¹, Л. В. Стаховская^{1,2}, А. Ю. Суворов^{1,2,9} ✉, Д. Р. Хасанова^{1,4,7}, Н. А. Шамалов^{1,2,9}

¹ Общероссийская общественная организация содействия развитию медицинской реабилитологии «Союз реабилитологов России», Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

³ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

⁴ Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия

⁵ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Красноярский государственный медицинский университет имени В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

⁷ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

⁸ Городская больница № 26, Санкт-Петербург, Россия

⁹ Федеральный центр цереброваскулярной патологии и инсульта, Москва, Россия

В современных работах по лечению и реабилитации пациентов с инсультом описывают преимущества и эффективность отдельных видов медицинской реабилитации, но этих данных недостаточно для оценки эффективности реабилитационной системы в целом. Целью нашего исследования было изучить эффективность пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной трехэтапной системы медицинской реабилитации пациентов с инсультом. В исследовании принял участие 1021 пациент старше 18 лет с ОНМК по ишемическому или геморрагическому типу в острейшем периоде. Все пациенты имели ограничение жизнедеятельности на момент поступления (без стойкой инвалидизации в анамнезе). Проводили сравнение двух моделей реабилитационных мероприятий, которые осуществляли в две последовательные фазы. В фазе 1 реализовывали преимущественно модель линейной формы оказания реабилитационной помощи, а в фазе 2 — мультидисциплинарную модель. Состояние пациентов оценивали по модифицированной шкале Рэнкина (mRS) в конце курса реабилитации. Сравнение результатов, полученных в первую и вторую фазы исследования, показало, что количество пациентов с оценкой по шкале mRS 0–1 балл в фазе 2 было на 18% меньше. Доля пациентов, имевших положительную динамику, также была значимо выше в фазе 2, чем в фазе 1 (16 и 30% соответственно). Пациентов, продемонстрировавших улучшение на 1–4 балла, в фазе 2 было значимо больше. Таким образом, применение мультидисциплинарной модели по сравнению с линейной моделью реабилитации обеспечивает значимое улучшение.

Ключевые слова: медицинская реабилитация, физическая и реабилитационная медицина, мультидисциплинарная бригада, развитие системы медицинской реабилитации, пилотный проект, ОНМК, нейрореабилитация

Финансирование: средства ТФОМС, бюджетные средства вузов МЗ РФ и МОН РФ, средства Общероссийской общественной организации содействия развитию медицинской реабилитологии «Союз реабилитологов России».

Благодарности: Буряк Юлии, врачу-неврологу и Лобачевой Екатерине, студентке 6 курса ПСПбГМУ имени И. П. Павлова; Касаткиной Виктории, врачу-неврологу из СПб ГБУЗ «Городская Александровская больница».

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ имени И. П. Павлова (заседание от 11 апреля 2018 г.). Добровольное информированное согласие на участие в исследовании подписано всеми участниками.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Юрьевич Суворов
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, г. Москва, 117342; dr_suvorov@mail.ru

Статья получена: 26.11.2019 **Статья принята к печати:** 13.12.2019 **Опубликована онлайн:** 26.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.089

EFFECTIVENESS OF MULTIDISCIPLINARY TEAM AS A NEW MODEL OF AFTER STROKE PATIENTS' REHABILITATION

Ivanova GE^{1,2,9}, Melnikova EV^{1,5,8}, Shmonin AA^{1,5,8}, Verbitskaya EV⁵, Belkin AA^{1,3}, Bodrova RA^{1,4,7}, Lebedev PV¹, Maltseva MN^{1,5}, Prokopenko SV^{1,6}, Prosvirina MS^{1,8}, Sarana AM¹, Stakhovskaya LV^{1,2}, Suvorov AY^{1,2,9} ✉, Khasanova DR^{1,4,7}, Shamalov NA^{1,2,9}

¹ All-Russian Union Rehabilitators, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

⁴ Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

⁵ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁶ Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

⁷ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

⁸ City Hospital № 26, Saint Petersburg, Russia

⁹ Federal Centre of Cerebrovascular Pathology and Stroke, Moscow, Russia

Modern papers on treatment and rehabilitation of stroke patients describe the advantages and effectiveness of certain medical rehabilitation types, but these data are not enough to evaluate the efficiency of the whole rehabilitation system. The study was aimed to investigate the potential of the patient-centered problem-oriented multidisciplinary three-stage system for medical rehabilitation of stroke patients. The study included 1021 patients over 18 affected with ischemic or hemorrhagic stroke in the acute phase. All patients had a disability of admission at the time (but no persisting disability in their history). Two models of rehabilitation measures were compared in two consecutive phases of the study. The linear model of rehabilitation assistance was mainly implemented in phase 1, and the multidisciplinary model was implemented in phase 2. The patients' condition was evaluated using the Modified Rankin Scale (mRS) at the end of rehabilitation. Comparison of the 1st and 2nd phase results demonstrated that the number of patients with mRS score 0–1 in the 2nd phase was lower by 18%. The proportion of patients with positive dynamics was significantly higher in the 2nd phase than in the 1st phase, (16 and 30% respectively). In the 2nd phase there were significantly more patients who demonstrated improvement by 1–4 (mRS score). Thus, the use of a multidisciplinary model provides a significant benefit compared with a linear rehabilitation model.

Keywords: medical rehabilitation, physical and rehabilitation medicine, multidisciplinary team, development of a medical rehabilitation system, pilot project, acute stroke, neurorehabilitation

Funding: Territorial Federal Compulsory Medical Insurance Fund, Ministry of Health of the Russian Federation and the Ministry of Education and Science of the Russian Federation universities budget funds, All-Russian Union Rehabilitators funds.

Acknowledgements: Yulia Buryak, neurologist of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University. Victoria Kasatkina, neurologist of City Alexandrovskaya Hospital. Ekaterina Lobachyova, 6th year student of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (No Ref. protocol dated April 11, 2018). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey Yu. Suvorov
Ostrovityanova, 1–10, Moscow, 117342; dr_suvorov@mail.ru

Received: 26.11.2019 **Accepted:** 13.12.2019 **Published online:** 26.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.089

В литературе применяют различные термины для описания работы мультидисциплинарной бригады (МДБ) в медицинской реабилитации [1–3]. В «Белой книге по физической и реабилитационной медицине в Европе» указано, что реабилитационная команда должна работать, используя мультипрофессиональный, интердисциплинарный, основанный на работе команды подход [4–6]. В России такой принцип называют мультидисциплинарным [1].

Целью настоящего исследования было изучить эффективность пациент-центрированной, проблемно-ориентированной мультидисциплинарной трехэтапной системы медицинской реабилитации пациентов с церебральным инсультом по сравнению с линейной формой организации реабилитационного процесса в рамках многоцентрового исследования.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был опубликован ранее [7–9].

Дизайн исследования был сравнительным, последовательным и состоял из двух фаз. В исследовании участвовали 22 медицинские организации первого, второго и третьего этапов медицинской реабилитации из 7 субъектов Российской Федерации: г. Санкт-Петербург, Тверская область, Свердловская область, Республика Татарстан, Красноярский край, Республика Чувашия, Пермский край. Штатное расписание и оснащение всех центров соответствовало порядку организации медицинской реабилитации (приказ МЗ РФ № 1705н от 29.12.2012) [10] и порядку по оказанию медицинской помощи пациентам с церебральным инсультом (приказ МЗ РФ № 928н от 15.11.2012) [11].

Сравнительные особенности биомедицинской и биопсихосоциальной моделей медицинской реабилитации, реализуемых в фазах 1 и 2, были опубликованы ранее [8, 9]. Фаза 1 — это работа реабилитационной МДБ, реализовывавшей биомедицинскую модель реабилитации (все специалисты работали раздельно, без обсуждения проблем пациентов на встречах МДБ). Врачи-неврологи назначали консультации специалистов по ЛФК, логопедов, физиотерапевтов и психологов. Нарушения функций описывали в соответствии с принятыми формами и формализованными записями в истории болезни

пациентов. Реабилитационный диагноз не составляли, реабилитационную цель не формулировали. Для оценки состояния пациента использовали только международную классификацию болезней (МКБ-10). Международную классификацию функционирования (МКФ) не применяли. В период проведения мероприятий фазы 1 все специалисты МДБ проходили обучение на курсах повышения квалификации в 5 медицинских вузах МЗ РФ и одном университете МОН РФ (РНИМУ имени Н. И. Пирогова, ПСПбГМУ имени И. П. Павлова, ИвГМА, КрасГМУ имени В. Ф. Войно-Ясенецкого и ННГУ имени Н. И. Лобачевского). Обучение во всех центрах шло по единой программе.

Программа подготовки специалистов включала блоки по общим вопросам медицинской реабилитации, по частным вопросам кардио-, нейро- и травматологической реабилитации, по вопросам психологической коррекции, эрготерапии, физической терапии, логопедической коррекции. Специалисты прошли обучение организации и проведению мультидисциплинарного реабилитационного процесса, использованию МКФ, составлению реабилитационного диагноза и реабилитационного плана. Обучение предполагало подготовку специалистов по основным реабилитационным интервенциям в соответствии с российскими клиническими рекомендациями [12] и рекомендациями Европейского общества по физической и реабилитационной медицине (ESPRM) [4–6, 13–21].

Основная группа преподавателей, разработавшая программы для специалистов участников проекта и организовавшая образовательный процесс, предварительно прошла обучение под руководством преподавателей из ESPRM [7] по программе подготовки врачей по физической и реабилитационной медицине. Программа переподготовки преподавателей-реабилитологов подразумевала модульное обучение. Имеющиеся в России программы подготовки специалистов дополняли модулями по медико-социальной реабилитации и иными модулями. Обучение и переподготовка были ключевым элементом исследования.

Фаза 2 по применению новой модели реабилитации началась по завершении подготовки специалистов МДБ. Для оценки соответствия образовательных баз вузов реализуемым моделям подготовки во всех образовательных организациях провели аудит клинических баз с участием российских и европейских специалистов.

Таблица 1. Список оценочных шкал, использованных в фазе 2

Специалист	Шкалы
Реабилитолог (невролог)	Шкала инсульта Национального института здоровья США (NIHSS)
	Модифицированная шкала Рэнкина (mRS)
	Визуально-аналоговая шкала боли (ВАШ)
	Модифицированная шкала Ашфорта (MUSA)
Психолог	Монреальская шкала оценки когнитивных функций (MoCA)
	Госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS)
Логопед	Шкала Л. И. Вассерман для оценки степени выраженности речевых нарушений у больных с локальными поражениями мозга
	Оценка способности глотания (MASA)
Реаниматолог	Шкала инсульта Национального института здоровья США (NIHSS)
	Шкала комы Глазго
Специалист по ЛФК	Шкала Комитета медицинских исследований (MRC)
	Шкала равновесия Берга (BBS)
	Шкала функциональной независимости (FIM)
	Тест Френчай для оценки функциональной активности руки
	Оценка качества жизни по опроснику EuroQ-5D

Согласно заключению, все клинические базы подготовки специалистов МДБ соответствовали порядку организации реабилитации, протоколу исследования и европейским стандартам реабилитации [22].

В фазе 2 медицинские организации работали по новым принципам, реализуя пациент-центрированный проблемно-ориентированный мультидисциплинарный (биопсихосоциальный) подход [8]. В состав МДБ вводили специалиста-эрготерапевта или специалиста, выполняющего функциональные обязанности эрготерапевта после специального обучения (такую возможность имели специалисты с базовым высшим педагогическим, психологическим или медицинским образованием). Программа переподготовки методистов по ЛФК также подразумевала включение модулей по физической терапии.

МДБ работали в соответствии со стандартами ESPRM. Все специалисты встречались и обсуждали проблемы пациента на заседании МДБ, устанавливали цель реабилитации и составляли реабилитационный план, а для координации использовали реабилитационный диагноз. Для обеспечения пациент-центрированного подхода к работе активно привлекали клинических психологов и психотерапевтов.

Для оценки роли специалистов в МДБ были использованы реабилитационные оценочные шкалы [23]. Шкалы и опросники были распределены в соответствии с компетенциями специалистов для описания основных показателей функционирования пациентов, необходимых для проведения реабилитации (табл. 1). Если у пациента были выявлены изменения, которые могли быть оценены по определенной шкале, то такую шкалу использовали в случае технической возможности проведения оценки (например, у пациента с пониженным сознанием невозможно оценить когнитивные функции или тревогу). Однако некоторые шкалы применяли всегда, независимо от тяжести состояния пациента — mRS, индекс мобильности Ривермид, NIHSS и шкалу комы Глазго. Оценку по шкалам проводили в начале и в конце госпитализации на всех трех этапах исследования. Специалисты могли использовать другие шкалы и опросники, однако анализ по ним отдельно не проводили.

При переводе пациента из отделения реанимации и интенсивной терапии или сосудистого отделения в отделение медицинской реабилитации из перечня используемых шкал исключали только шкалу комы Глазго.

Через 1,5 года после завершения курса реабилитации проводили отсроченную оценку состояния пациента с использованием модифицированного набора тестов и шкал, основанную на телефонном интервью пациента и его ближайших родственников. Для телефонного интервьюирования была создана группа специалистов, обученных проведению телефонных опросов. Подготовка включала лекции психолога по психологическим особенностям проведения опросов, лекции по основам конфликтологии и тренинг врача-реабилитолога по применению mRS в телефонном опросе. После тренинга все специалисты успешно сдали экзамен. Для оценки по телефону были выбраны следующие показатели: mRS, индекс мобильности Ривермид, нежелательные явления и EQ-5D. Во время интервью специалисты имели доступ к базе данных пациентов и могли использовать информацию о состоянии пациента на различных этапах реабилитации для повышения эффективности интервью. Проводившие опросы специалисты не знали, к какой фазе исследования

относились пациенты, с которыми они общались. Пациенты также не знали, в какой фазе исследования они принимают участие. Таким образом, исследование можно считать двойным слепым.

Промежуточными конечными точками исследования были выбраны две оценки по шкале mRS — оценка, полученная на момент завершения реабилитации на первом этапе, и оценка, полученная через 1,5 года (18 месяцев) после завершения реабилитации. Шкала mRS была выбрана как универсальный показатель здоровья пациента, ограничения жизнедеятельности и зависимости пациента от окружающих, так как она позволяет описать любую степень инвалидизации независимо от причины (не только связанную с инсультом).

В исследование включали пациентов с ОНМК по ишемическому или геморрагическому типу в острой фазе, имевших ограничение жизнедеятельности на момент поступления (не менее 2 баллов по mRS) и не имевших инвалидизации до инсульта на уровне 2 и более баллов. То есть в исследование принимали больных без предшествующей стойкой инвалидности, которые были самостоятельны в собственной жизни до развития инсульта согласно анамнезу, полученному со слов пациента или его родственников.

Критерии включения: острый период ишемического или геморрагического инсульта (до 21 дня с начала заболевания), при условии, что оперативное вмешательство не требуется; возраст старше 18 лет. Критерии исключения: оценка более 1 балла по шкале mRS до инсульта; проведение или планирование любого оперативного вмешательства (кроме тромбэкстракции); изолированная форма субарахноидального кровоизлияния; транзиторная ишемическая атака; нарушение сознания при поступлении на уровне комы 2-й степени и более.

Протокол обследования пациентов с церебральным инсультом в процессе медицинской реабилитации на всех этапах в фазах 1 и 2 был опубликован ранее [8]. После завершения реабилитации на первом этапе пациентов направляли на второй или на третий этап, в зависимости от степени восстановления жизнедеятельности и необходимости проведения реабилитационных вмешательств. Так, на второй этап направляли пациентов с оценкой по шкале mRS 4–5 баллов, а на третий этап реабилитации — пациентов с оценкой по mRS 2–3 балла. Все пациенты, направленные на второй и третий этапы реабилитации, имели хорошие перспективы восстановления и прогноз полного или частичного восстановления функционирования, либо прогноз адаптации и компенсации. Пациентов, имевших прогноз ухода и паллиатива, переводили в соответствующее учреждение или выписывали домой. Пациентов с оценкой по шкале mRS 0–1 балл тоже выписывали, так как они не были ограничены в функционировании и не нуждались в реабилитации. Выборка была сплошной.

Таким образом, пациенты получали трехэтапную медицинскую реабилитацию в соответствии с мультидисциплинарной проблемно-ориентированной и пациент-центрированной моделью в фазе 2 или в соответствии с биомедицинской моделью в фазе 1, что позволяло сравнивать две системы организации реабилитационного процесса. Протокол обследования пациентов в фазах 1 и 2 был одинаковым. Его разработали на основе действующей нормативно-правовой базы Российской Федерации [10–11]) и клинических шкал, показавших валидность в российских и зарубежных

исследованиях реабилитации пациентов с церебральным инсультом.

Для сбора данных пациентов в качестве электронной регистрационной карты использовали приложение «ICF-reader» (разработчики А. А. Шмонин, М. Н. Мальцева, Е. В. Мельникова; Санкт-Петербург, Россия). Приложение устанавливали во всех принимавших участие в исследовании центрах, оно работало по сетевому принципу. Любой зарегистрированный сотрудник мог войти в приложение, посмотреть данные пациента и провести требуемую оценку. Приложение также способствовало мультидисциплинарности за счет лучшего обмена информацией. Благодаря программному обеспечению «ICF-reader» организаторы исследования могли проводить электронный аудит [9, 23].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения SAS (SAS Institute Inc.; США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Для сравнения основных количественных показателей при нормальном распределении использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Для повторных измерений при нормальном распределении применяли дисперсионный анализ смешанных эффектов (MixedANOVA). Попарный анализ групп проводили только при наличии значимых различий при оценке по критерию Бреслоу–Дэя. Для попарного сравнения использовали поправку Тьюки–Крамера. Критерий Мак-Немара применяли для дихотомических повторных показателей. При распределении, отличном от нормального, для не связанных выборок использовали критерий Манна–Уитни, для связанных — критерий Уилкоксона. Для анализа качественных данных

использовали критерий Фишера и критерий χ^2 Пирсона, в зависимости от количества показателей. За критический уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Исследование было зарегистрировано как клиническое испытание в международном регистре ClinicalTrials.gov под названием: «The Pilot Project Development Of Medical Rehabilitation System in Russian Federation (DOME)» (NCT02793934).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в электронной системе был зарегистрирован 1021 пациент. До начала исследования группы пациентов были сопоставимы по тяжести и основным эпидемиологическим показателям (табл. 2). В фазе 2 наблюдали большее количество пациентов с уточненным патогенетическим вариантом инсульта. Инвалидизация до инсульта, доля пациентов, получивших реперфузионную терапию в острый период инсульта, в фазах 1 и 2 были сопоставимы.

В начале исследования все пациенты имели сходные показатели (табл. 3).

Главной конечной точкой исследования являлась оценка по шкале mRS в конце курса реабилитации (рис. 1). В фазе 2 исследования наблюдали увеличение доли пациентов без инвалидизации на 18% (mRS 0–1) по сравнению с первой фазой ($p < 0,0001$). Показатель по шкале mRS в первой группе к концу курса реабилитации составил 3 (2; 4) балла, в группе 2 — 2 (1; 3) балла (критерий Манна–Уитни, $p < 0,01$).

В фазе 2 наибольшее улучшение демонстрировали пациенты с оценками при поступлении 4, 3 и 2 балла

Таблица 2. Сравнение показателей двух групп пациентов с церебральным инсультом до начала исследования

Показатель	Фаза 1	Фаза 2	Уровень значимости
Количество пациентов	498	523	–
Пол (Ж : М)	1 : 1,5	1 : 1,2	0,06
Возраст	68 ± 12	68 ± 14	0,32
Курение	14%	15%	0,26
Ишемический инсульт	91,2%	92,7%	0,21
Геморрагический инсульт	8,8%	7,3%	
Алкоголизм	4,5%	3,2%	0,16
Ишемический инсульт в анамнезе	20%	18%	0,23
Геморрагический инсульт в анамнезе	1%	1%	0,23
Предшествующая инвалидизация			
mRS до инсульта 0 баллов	81,8%	84,0%	0,33
mRS до инсульта 1 балл	18,0%	16,0%	
mRS до инсульта 2 балла	0,2%	0,0%	
Реперфузионная терапия			
Внутривенная тромболитическая терапия	3,5%	1,5%	0,14
Тромбэкстракция	0,6%	0,6%	
Патогенетический вариант ишемического инсульта			
Не установлен	11,7%	8,0%	< 0,05
Атеротромботический	56,9%	51,4%	
Кардиоэмболический	13,3%	19,2%	
Лакунарный	7,8%	13,2%	
Редкие причины инсульта	0,2%	0,2%	
Другое	1,2%	0,7%	

Примечание: фаза 1 — биомедицинская модель реабилитации; фаза 2 — мультидисциплинарная пациент-центрированная проблемно-ориентированная модель реабилитации.

Таблица 3. Сравнение показателей двух групп пациентов с церебральным инсультом до начала исследования

Шкалы и опросники				Фаза 1	Фаза 2	Уровень значимости, критерий Тьюке-Крамера
NIHSS				6 (4; 10)	5 (3; 9)	>0,05
MoCa				17.5 (8; 21)	18 (9; 23)	0,3287
Тест Френчай				2 (0; 4)	3 (0; 5)	0,0765
FIM				81 (56; 97)	76 (52; 95)	0,8394
BBS				25 (5; 38)	16 (0; 37)	0,1582
MRC	Рука	Справа	Проксимально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,5086
			Дистально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,3538
		Слева	Проксимально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,0038
			Дистально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,0022
	Нога	Справа	Проксимально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,5207
			Дистально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,3081
		Слева	Проксимально	3 (0; 4)	3 (0; 4]	0,0056
			Дистально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	0,0016
MASA				179 (169; 180)	180 (177; 180)	0,5601
Шкала Л. И. Вассерман				6 (0; 25)	0 (0; 24)	0,6027
EuroQ-5D				10 (8; 13)	11 (10; 15)	0,3648
HADS	Депрессия			6 (3; 12)	8 (4; 11)	0,427
	Тревога			7 (3; 11)	6 (4; 10)	0,9971

($p = 0,0009$, $0,0019$ и $0,001$ соответственно). Пациенты с оценками 5 и 1 балл (mRS) не имели преимуществ на первом этапе при реабилитации в фазе 2 по сравнению с фазой 1. Реабилитация в фазе 2 была более эффективна у пациентов средней степени тяжести и ограничения жизнедеятельности. У тяжелых пациентов и пациентов без ограничения жизнедеятельности (mRS 1 балл) эффективность оставалась на том же уровне, как и при использовании биомедицинской модели.

В роли вторичных конечных точек выступали оценочные шкалы (табл. 4). К моменту окончания реабилитации на первом этапе тяжесть по шкале NIHSS в группах 1 и 2 была сопоставима ($p > 0,05$). Оценка по шкале FIM, отражающей изменения самообслуживания, мобильности, коммуникации и социальной активности, показала, что наилучшим образом шло восстановление пациентов из группы 2.

Тест Френчай (табл. 4) в фазе 2 позволил выявить улучшение состояния пациентов. Количество пациентов с оценкой 5 баллов (полное восстановление активности руки) было на 20% больше в фазе 2, чем в фазе 1. Кроме того, в фазе 2 наблюдали меньше оценок 0, 1, 2 и 3 балла (пациенты не смогли полностью выполнить тест либо допустили много ошибок), чем в фазе 1. Однако анализ по методу χ^2 показал, что различия не были значимыми ($p = 0,0604$).

Согласно оценкам по шкале баланса Берга (см. табл. 4), к моменту завершения реабилитации у пациентов наблюдалось значимое улучшение как в группе 1 ($p < 0,0001$), так и в группе 2 ($p < 0,0001$). Улучшение было более выраженным в группе 2, однако анализ по критерию Тьюки-Крамера продемонстрировал, что различия не были значимыми ($p = 0,0859$). Анализ без учета пациентов с нормальными оценками на момент начала эксперимента показал увеличение доли пациентов с низким риском падения (41–56 баллов) к моменту завершения пребывания в стационаре в фазе 2 (59%) по сравнению с фазой 1 (47,3%). Имело место снижение доли пациентов со средним риском падения (21–40 баллов) с 39 до 19% в фазе 2 (метод χ^2 , $p = 0,0077$).

Оценка по шкалам MASA и Л. И. Вассерман продемонстрировала эффект «потолка». К моменту завершения реабилитации на первом этапе было установлено, что пациенты обеих групп достигли по медиане и межквартильному размаху почти полного функционального восстановления глотания (200 баллов — максимальная оценка по шкале MASA), поэтому значимых различий между группами не было. К концу курса реабилитации на первом этапе пациенты обеих групп достигли почти полного восстановления речи, поэтому значимых различий между группами выявлено не было, хотя медианные показатели были выше в группе 2.

Когнитивные функции оценивали по шкале MoCa. В фазе 2 наблюдали лучшее восстановление когнитивных функций, чем в фазе 1 ($p < 0,0001$). Улучшение было значимым как в группе 1 ($p < 0,0001$), так и в группе 2 ($p < 0,0001$).

Оценка уровня тревоги по шкале HADS не позволила выявить значимых различий между группами 1 и 2 ($p = 0,5422$). Более высокие показатели уровня депрессии были выявлены в фазе 2 ($p = 0,0318$). Удаление из выборки пациентов с нормальной оценкой по шкале HADS на момент начала исследования продемонстрировало, что увеличение показателя по шкале депрессии HADS происходило за счет значимого увеличения доли пациентов с «субклинически» выраженной депрессией (фаза 1 — 18%, фаза 2 — 44%, $p = 0,0129$). Количество пациентов с «клинически» выраженной депрессией (шкала HADS) в фазе 1 и фазе 2 было одинаковым (28,3 и 28,8% соответственно).

Применение шкалы EuroQ-5D продемонстрировало сопоставимое качество жизни в обеих группах, значимых различий не было ($p = 0,0887$). При этом лучшие показатели наблюдали в группе 2. При госпитализации на первом этапе как в группе 1 ($p = 0,0896$), так и в группе 2 ($p = 0,567$), качество жизни не улучшилось, что говорит о нечувствительности этого показателя на первом этапе исследования.

Попарное сравнение (критерий Манна-Уитни) показало, что продолжительность госпитализации была меньше в фазе 2 (14 (12; 19) койко-дней) по сравнению с фазой 1

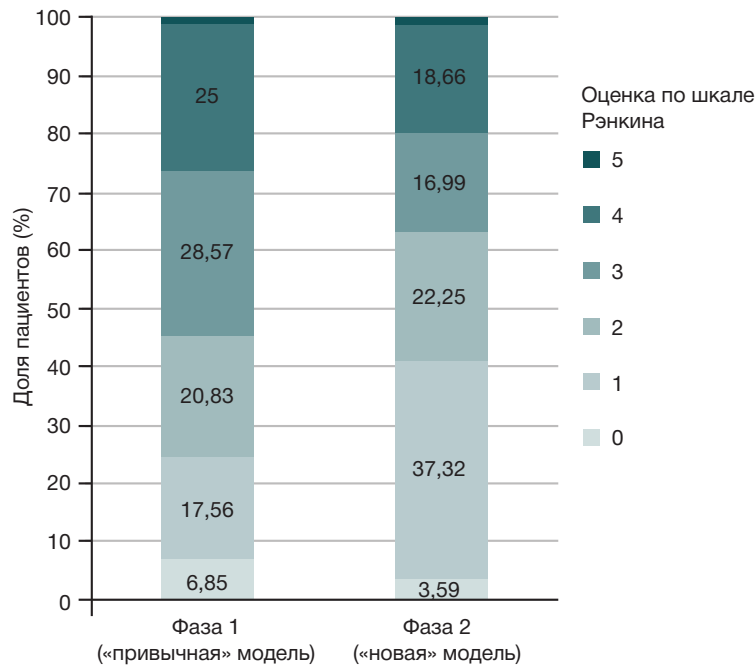


Рис. 1. Результаты реабилитации пациентов с инсультом в конце первого этапа (метод χ^2 , $p < 0,0001$)

(16 (14; 20) койко-дней, $p < 0,001$). Пересчет продолжительности госпитализации в абсолютных значениях показал, что в фазе 2 имело сокращение (экономия) продолжительности госпитализации на 38% койко-дней по сравнению с фазой 1. В фазе 2 специалистам МДБ рекомендовали регулировать продолжительность госпитализации самостоятельно, они не были ограничены заранее определенными временными рамками. Благодаря внедрению пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной реабилитации

часть пациентов получила возможность пребывать на первом этапе дольше, так как была необходимость в более длительной реабилитации. Другая часть пациентов получила возможность выписаться раньше в случае реализации целей программы реабилитации на первом этапе. Принцип «нелимитированности» сроков госпитализации позволил снизить продолжительность госпитализации. Снижение продолжительности госпитализации на первом этапе (с учетом тарифа на оказание помощи пациентам при ОНМК в различных

Таблица 4. Результаты оценки состояния пациентов с инсультом в конце первого этапа реабилитации

Шкалы и опросники				Уровень значимости, попарное сравнение			Уровень значимости, до и после реабилитации на первом этапе		Критерий
				Фаза 1	Фаза 2	Критерий Тьюки–Крамера	Фаза 1	Фаза 2	
NIHSS				5 (3; 7)	3 (2; 7)	> 0,05	< 0,0001	< 0,0001	Тьюки–Крамера
FIM				100 (76; 114)	118 (103;125)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Тьюки–Крамера
Тест Френчай				5 (3; 5)	5 (4,5; 5)	1,0	0,0041		Уилкоксона
							0,0604		χ^2
BBS				42 (27; 51)	50,5 (35; 54)	0,0859	< 0,0001	< 0,0001	Тьюки–Крамера
MRC	Рука	Справа	Проксимально	3 (0; 5)	4 (0; 5)	0,0355		Манна–Уитни	
			Дистально	3 (0; 5)	4 (0; 5)	0,0062		Манна–Уитни	
		Слева	Проксимально	3 (0; 5)	3 (0; 5)	< 0,0001		Манна–Уитни	
			Дистально	3 (0; 5)	4 (0; 5)	< 0,0001		Манна–Уитни	
	Нога	Справа	Проксимально	4 (0; 5)	4 (0; 5)	0,110		Манна–Уитни	
			Дистально	4 (0; 5)	4 (0; 5)	0,0236		Манна–Уитни	
		Слева	Проксимально	4 (0; 5)	4 (0; 5)	0,0003		Манна–Уитни	
			Дистально	3 (0; 4)	3 (0; 4)	< 0,0001		Манна–Уитни	
MASA				180 (178; 180)	180 (178; 180)	0,8284	0,0033	0,0594	Тьюки–Крамера
Шкала Л. И. Вассерман				2 (0; 10)	0 (0; 2)	0,5578	0,0387	0,086	Тьюки–Крамера
MoCa				21,5 (15; 25)	23 (19; 26)	< 0,0001	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	Тьюки–Крамера
HADS		Депрессия		4 (2; 7)	7 (3; 10)	0,0318	0,0009	0,2435	Тьюки–Крамера
		Тревога		4 (2; 7)	5 (3; 7)	0,5422	< 0,0001	0,1048	Тьюки–Крамера
EuroQ-5D				8,5 (6; 10)	7 (5; 10)	0,0887	0,0896	0,567	Тьюки–Крамера

субъектах от 75 до 180 тыс. руб.) следует расценивать как экономический эффект.

Для оценки состояния пациентов с церебральным инсультом через 1,5 года после реабилитации с использованием биопсихосоциальной пациент-центрированной и проблемно-ориентированной модели в анализ включили информацию о состоянии 237 человек, полученную от пациентов или их родственников. Основной причиной недоступности пациента для звонка было отсутствие номера телефона (пациент не оставил номер телефона, специалисты не внесли в базу) или его смена. Двадцать девять человек отказались говорить без объяснения причин (12%). Время от начала инсульта до телефонного интервью было сопоставимо в обеих группах (табл. 5), 21 (19; 23) месяц в группе 1, 20 (18; 22) месяцев в группе 2.

Средняя длительность беседы по телефону составила 7 (5; 9) минут. В основном пациенты и их родственники были положительно настроены и готовы общаться. В обеих группах с интервьюерами чаще говорили родственники пациентов, чем сами пациенты.

Был проведен анализ роли интервьюера и оценки состояния пациента. Было установлено, что оценка у всех специалистов была одинаковой и соответствовала реальному состоянию пациентов. Количество отказов разговаривать также было сопоставимым у всех интервьюеров. Полученные данные были значимыми и не зависели от исследователя.

По данным телефонного опроса (табл. 5), 89% пациентов прошли реабилитацию на втором этапе в фазе 1, а 81% пациентов — в фазе 2 ($p = 0,324$). Медицинскую реабилитацию третьего этапа получили 50% пациентов фазы 1 и 53% фазы 2 ($p = 0,7$). В фазе 2 реабилитационную помощь пациенты получали в учреждениях, где проходили обучение специалисты МДБ. При этом в 57% случаев пациентов переводили на второй и третий этапы реабилитации сразу, минуя попадание домой. Это значит, что между этапами медицинской реабилитации не было перерыва.

Поскольку в выборку попали не все пациенты (только 237 человек), было проведено сравнение групп принявших участие в телефонном интервью пациентов по исходным показателям при поступлении на первый этап (табл. 5). Исходный уровень инвалидизации до инсульта, оцененный анамнестически по mRS, был сопоставим в обеих группах ($p > 0,05$). Уровень инвалидности по mRS также был

одинаковым при поступлении на первый этап ($p = 0,967$), что позволяет проводить дальнейшее сравнение групп.

Главной конечной точкой исследования был анализ mRS, его выполняли по телефону. Уровень ограничения жизнедеятельности пациентов с церебральным инсультом через 1,5 года в группе 2 был ниже, чем 1 (точный критерий Фишера, $p < 0,05$) (рис. 2). Анализ по критерию Манна-Уитни показал, что в группе 1 оценка по mRS составила 3 (2; 4) балла, а во второй группе — 2 (1; 3) балла ($p = 0,026$).

Летальность в обеих группах была сопоставима и значимо не отличалась (группа 1 — 15,5%, группа 2 — 16% (критерий χ^2 Пирсона, $p = 0,532$). Проведение мультидисциплинарной реабилитации в период оказания специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи не повлияло на летальность в течение 1,5 лет после инсульта.

Качество жизни пациентов по шкале EuroQ-5D и БАШ EuroQ-5D к концу исследования было сопоставимо в обеих группах ($p = 0,1293$ и $p = 0,0903$) (табл. 5). Однако субанализ показал, что уровень тревоги по шкале EuroQ-5D при использовании пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной реабилитации был ниже ($p = 0,0045$, критерий Манна-Уитни).

Оценка по индексу мобильности Ривермид была лучше при использовании пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной реабилитации (14 (9; 14) баллов), чем при использовании биомедицинской модели (13,5 (7; 14) баллов, $p = 0,04$), то есть пациенты были более мобильными через 1,5 года после развития инсульта.

Доля пациентов, которые постоянно наблюдались у врача (табл. 5), была больше в фазе 2, различия не были значимыми ($p = 0,123$). У невролога, терапевта и других врачей ($p = 0,123$) в фазах 1 и 2 наблюдалось равное количество пациентов. Пациент-центрированная проблемно-ориентированная мультидисциплинарная реабилитация не влияла на приверженность к контролю своего состояния у врача после завершения трехэтапной реабилитации. Пациенты, получившие реабилитацию по биомедицинской модели, в 10% случаев отказывались от приема лекарств по завершении лечения в медицинских организациях. При использовании пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной реабилитации пациенты отказывались реже (4% случаев), однако различия не были значимыми ($p = 0,23$). Артериальное

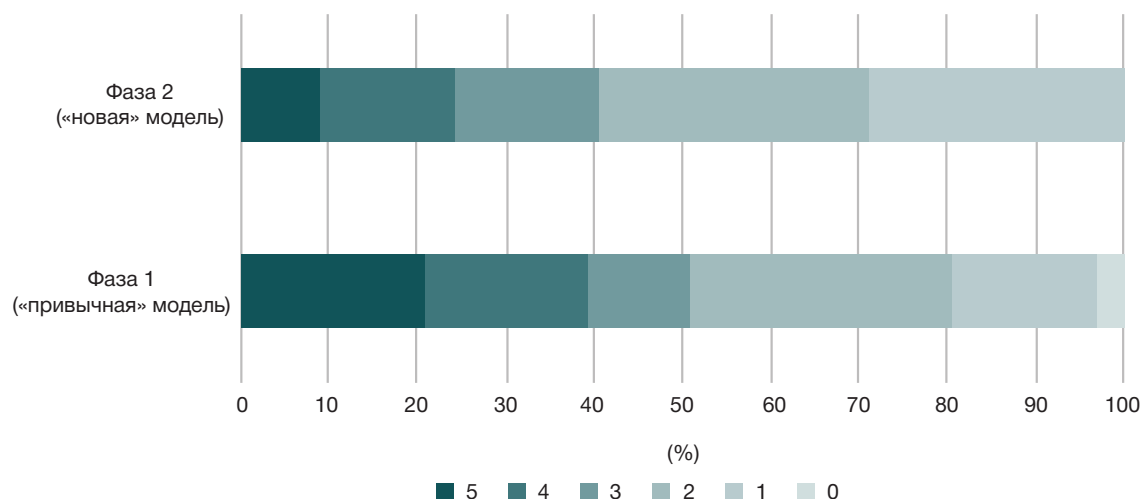


Рис. 2. Оценка mRS через 1,5 года после инсульта, полученная в ходе телефонного опроса

давление не контролировали 7% пациентов, прошедших реабилитацию по биомедицинской модели, и 4% пациентов, прошедших реабилитацию по мультидисциплинарной проблемно-ориентированной и пациент-центрированной модели ($p = 0,73$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внедрение пациент-центрированной проблемно-ориентированной мультидисциплинарной реабилитации на первом этапе лечения и реабилитации в нашем исследовании обеспечило статистически значимое снижение уровня зависимости в повседневной жизни пациентов с инсультом по сравнению с классической моделью реабилитации. Эффект новой модели реабилитации был связан с оптимизацией реабилитационного процесса, лучшей организацией реабилитационных мероприятий, ориентированностью на функциональный исход, большей вовлеченностью пациента и его родственников в процесс реабилитации, а также с большей заинтересованностью пациента.

Анализ изменений состояния пациентов (шкала mRS) показал, что доля пациентов, продемонстрировавших ухудшение на первом этапе медицинской реабилитации, в фазе 2 была меньше, чем в фазе 1. Ухудшение состояния пациентов связано с развитием пневмонии, повторного инсульта, инфекции мочевыводящих путей, ТЭЛА, прогрессированием отека мозга и т. д. Значимое улучшение (на 3 и 4 балла) возможно только на первом этапе реабилитации, если у пациентов присутствуют функциональные нарушения, связанные с «быстроустраняемыми» причинами (стрессом, болью, отеком мозга, интоксикацией, острой инфекцией и т. д.). Использование проблемно-ориентированной пациент-центрированной и мультидисциплинарной модели реабилитации обеспечивает значимое улучшение, меньшее количество пациентов демонстрирует ухудшение состояния в процессе реабилитации.

Полученные результаты оценки по шкале FIM подчеркивают особенности реабилитационного вмешательства, которое в случае невозможности восстановления функции позволяет улучшить функционирование за счет активного участия пациента. FIM также отражает эффективность работы специалистов по эрготерапии и физической терапии.

Результаты оценки с использованием теста Френчай показали, что эта шкала является не такой чувствительной и в полной мере не отражает эффекты реабилитации. Возможно, для оценки необходимо использовать более чувствительные инструменты (например, как тест ARAT).

Оценка по шкале баланса Берга позволила продемонстрировать эффективность работы специалистов по физической терапии в фазе 2. Шкала MASA и шкала Л. И. Вассерман для оценки степени выраженности речевых нарушений у больных с локальными поражениями мозга продемонстрировали статистический эффект «потолка». Хорошее восстановление речи и глотания были связаны с эффективной работой логопедов как в фазе 1, так и в фазе 2.

Когнитивные нарушения у больных с инсультом могут быть как проявлением инсульта, так и преморбидными нарушениями, связанными с факторами риска cerebro-васкулярной патологии. В ряде случаев имеет место сочетание одного и другого. Лучшее восстановление когнитивных функций (MoCa) в фазе 2 демонстрирует

преимущество пациент-центрированного проблемно-ориентированного подхода в работе психологов из МДБ.

Оценка состояния по шкале HADS, применяемой для скрининговой оценки эмоциональных нарушений у пациентов с церебральным инсультом, позволила выявить более высокий уровень «субклинически» выраженной депрессии в фазе 2. Это может быть связано с более высоким уровнем осознанности пациентов и сложности адаптации в фазе 2, о чем, в том числе, свидетельствует лучшее восстановление когнитивных функций в фазе 2. Вероятно, применение более широкого спектра диагностических инструментов позволит лучше изучить проявления эмоциональных нарушений пациентов с церебральным инсультом в период восстановления.

Оценка с использованием EuroQ-5D продемонстрировала сопоставимый уровень качества жизни в обеих группах. Отсутствие улучшения качества жизни на первом этапе может быть связано с необходимостью вынужденного пребывания в больнице, вынужденного общения с чужими лицами и другими факторами. Отсроченная оценка может дать возможность получить объективную информацию о качестве жизни пациентов.

Изменение сроков госпитализации и, как следствие, экономическая эффективность реабилитации свидетельствуют о невозможности внедрения «жестких» (фиксированных) сроков госпитализации для реабилитационных пациентов, поскольку потребности пациентов с ОНМК, а значит и продолжительность реабилитации, могут быть разными. Необходимо связывать продолжительность госпитализации с реализацией реабилитационного потенциала и достижением целей реабилитации, установленных при поступлении пациента на каждый из этапов.

Равное количество пациентов, получивших реабилитацию на втором и третьем этапах медицинской реабилитации, способствует объективности исследования, поскольку объем помощи, которую получили пациенты в фазах 1 и 2, является одинаковым. Однако качество помощи, которую получили пациенты на втором и третьем этапах исследования в учреждениях, где команды работали по мультидисциплинарной пациент-центрированной проблемно-ориентированной модели, было значительно выше, о чем свидетельствуют результаты исследования.

Анализ основных конечных точек исследования показал, что пациент-центрированная проблемно-ориентированная мультидисциплинарная медицинская реабилитация более эффективна, чем традиционный подход к реабилитации пациентов с церебральным инсультом. Показано, что эффект от проведенной реабилитации сохраняется как минимум до полутора лет, что свидетельствует о его стойкости. Пациенты в фазе 1 почти не попадали сразу на второй и третий этапы реабилитации и «выпадали» из наблюдения. После выписки на первом этапе пациенты вставали в очередь, получая реабилитацию спустя месяцы и годы, когда ее эффективность становилась ниже. В фазе 2 количество пациентов, получивших реабилитацию на втором и третьем этапах в учреждениях-участниках исследования, было значительно больше, однако с учетом малого размера выборки в фазе 1 исследования статистический анализ не проводили. В фазе 2 была создана система обеспечения преемственности, которая при равном объеме оказанной помощи по профилю медицинской реабилитации продемонстрировала более высокое качество и лучший эффект от реабилитационного лечения.

Таблица 5. Исходные характеристики групп пациентов и результаты, полученные в ходе телефонного интервью

Шкалы и опросники	Фаза 1		Фаза 2	Уровень значимости	Критерий
Время от поступления на первый этап до телефонного интервью, месяцы	21 (19; 23)		20 (18; 22)	0,09	Манна–Уитни
mRS до инсульта 0 баллов	80%		79%	0,47	Фишера
mRS до инсульта 1 балл	20%		21%		
Отвечили на звонок родственники	73%		66%	0,194	
Отвечил на звонок сам пациент	27%		34%		
mRS при поступлении на первый этап	3 (3; 4)		3 (3; 4)	0,967	Манна–Уитни
mRS 0 баллов	При поступлении на первый этап	0%	0%	0,109	Фишера
mRS 1 балл		0%	0%		
mRS 2 балла		14%	12%		
mRS 3 балла		29%	30%		
mRS 4 балла		43%	45%		
mRS 5 баллов		14%	13%		
Индекс мобильности Ривермид	13.5 (7; 14)		14 (9; 14)	0,04	Манна–Уитни
Всего EuroQ-5D	7 (5; 10)		6 (5; 8)	0,1293	
ВАШ EuroQ-5D, %	50 (20; 70)		50 (50; 70)	0,0903	
EuroQ-5D Подвижность	2 (1; 2)		2 (1; 2)	0,5097	
EuroQ-5D Самообслуживание	1 (1; 2)		1 (1; 2)	0,1517	
EuroQ-5D Бытовая активность	2 (1; 2)		1 (1; 2)	0,2346	
EuroQ-5D Боль/дискомфорт	2 (1; 2)		1 (1; 2)	0,125	
EuroQ-5D Тревога/депрессия	2 (1; 2)		1 (1; 2)	0,0045	
Проходил реабилитацию на втором этапе	89,25%		81,33%	0,342	
Проходил реабилитацию на третьем этапе	50,00%		52,78%	0,7	
Избыточная масса тела	37,78%		34,78%	0,251	
Ни у кого не наблюдался	33,33%		27,14%	0,123	
Наблюдался у невролога	22,22%		20,00%		
Наблюдался у терапевта	30,00%		22,86%		
Наблюдался у другого врача	14,44%		30,00%		
Не принимал лекарства	10,11%		4,29%	0,23	
Не контролировал АД	6,74%		4,29%	73	

Обращает на себя внимание удобство сбора данных с использованием телефонных интервью с применением ряда шкал. Телефонные интервью позволяют оценить мобильность пациента по индексу Ривермид, получить информацию об осложнениях и повторных событиях, летальности и уровню инвалидизации (mRS). В нашем исследовании в ходе телефонных опросов удалось получить ценную информацию о состоянии пациентов и стойкости эффектов реабилитации, которую можно использовать при создании баз данных по объему и качеству оказанной медицинской помощи.

Литература

1. Сычева А. В. Мультидисциплинарный подход при восстановительном лечении последствий церебрального инсульта [диссертация]. М., 2008.

2. Stroke Unit Trialists' Collaboration. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Sep 11; 9: CD000197.

3. Turner-Stokes L, Pick A, Nair A, Disler PB, Wade DT. Multi-disciplinary rehabilitation for acquired brain injury in adults of working age. Cochrane Database Syst Rev. 2015 Dec 22; 12: CD004170.

4. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance.

ВЫВОДЫ

Трехэтапная пациент-центрированная, проблемно-ориентированная, мультидисциплинарная модель является более выгодной, так как позволяет достичь более высоких результатов в восстановлении пациентов после церебрального инсульта, повысить качество жизни и приверженность пациентов к лечению, снизить вторичные расходы здравоохранения, а также сократить расходы на оказание специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи этой категории пациентов.

White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 8. The PRM specialty in the healthcare system and society. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 261–78.

5. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 7. The clinical field of competence: PRM in practice. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 230–60.

6. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 6. Knowledge and skills of PRM physicians. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 214–29.

7. Иванова Г. Е., Аронов Д. М., Белкин А. А., Беляев А. Ф., Бодрова Р. А., Бубнова М. Г. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в РФ». Вестник восстановительной медицины. 2016; (2): 2–6.
8. Иванова Г. Е., Белкин А. А., Беляев А. Ф., Бодрова Р. А., Буйлова Т. В., Мельникова Е. В. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации». Общие принципы и протокол. Вестник Ивановской медицинской академии. 2016; 21 (1): 6–11.
9. Иванова Г. Е., Белкин А. А., Беляев А. Ф., Бодрова Р. А., Мельникова Е. В., Прокопенко С. В. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации». Система контроля и мониторингирования эффективности медицинской реабилитации при острых нарушениях мозгового кровообращения. Вестник Ивановской медицинской академии. 2016; 21 (1): 19–22.
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 1705н от 29.12.2012. «О порядке организации медицинской реабилитации».
11. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 928н от 15.11.2012. «Об утверждении порядка медицинской помощи больным с нарушениями мозгового кровообращения».
12. Заболотских И. Б., Шифман Е. М., редакторы. Клинические рекомендации. Анестезиология-реаниматология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; с. 873–928.
13. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 11. Challenges and perspectives for the future of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 311–21.
14. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 10, Science and research in PRM: specificities and challenges. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 287–310.
15. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 9. Education and continuous professional development: shaping the future of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 279–86.
16. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 5. The PRM organizations in Europe: structure and activities. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 198–213.
17. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 4. History of the specialty: where PRM comes from. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 186–97.
18. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 3. A primary medical specialty: the fundamentals of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 177–85.
19. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine in Europe. Chapter 2. Why rehabilitation is needed by individual and society. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 166–76.
20. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 1. Definitions and concepts of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 156–65.
21. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine in Europe. Introductions, Executive Summary, and Methodology. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 125–55.
22. Иванова Г. Е., Мельникова Е. В., Шмонин А. А., Аронов Д. М., Белкин А. А., Беляев А. Ф. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации». Протокол второй фазы проекта. Ученые записки ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2016; (2): 27–34.
23. Иванова Г. Е., Мельникова Е. В., Шмонин А. А., Вербицкая Е. В., Аронов Д. М., Белкин А. А. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации»: предварительные результаты на первом и втором этапах. Вестник восстановительной медицины. 2017; 2 (78): 10–15.

References

1. Sycheva AV. Multidisciplinary approach in the recovery treatment of the consequences of cerebral stroke [dissertation]. M., 2008. Russian.
2. Stroke Unit Trialists' Collaboration. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Sep 11; 9: CD000197.
3. Turner-Stokes L, Pick A, Nair A, Disler PB, Wade DT. Multidisciplinary rehabilitation for acquired brain injury in adults of working age. Cochrane Database Syst Rev. 2015 Dec 22; 12: CD004170.
4. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 8. The PRM specialty in the healthcare system and society. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 261–78.
5. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 7. The clinical field of competence: PRM in practice. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 230–60.
6. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 6. Knowledge and skills of PRM physicians. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 214–29.
7. Ivanova GE, Aronov DM, Belkin AA, Belyaev AF, Bodrova RA, Bubnova MG, et al. Pilot Project "Development of Medical Rehabilitation System in the Russian Federation". Journal of Restorative Medicine. 2016; (2): 2–6.
8. Ivanova GE, Belkin AA, Belyaev AF, Bodrova RA, Bujlova TV, Melnikova EV, et al. Pilot project "Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation." General Principles and Protocol. Journal of the Ivanovsky Medical Academy. 2016; 21 (1): 6–11.
9. Ivanova GE, Belkin AA, Belyaev AF, Bodrova RA, Melnikova EV, Prokopenko SV, et al. Pilot project "Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation." System of monitoring and monitoring the effectiveness of medical rehabilitation in case of acute disorders of cerebral circulation. Journal of the Ivanovsky Medical Academy. 2016; 21 (1): 19–22.
10. On the procedure for organizing medical rehabilitation. Pub. L. of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation № 1705н (Dec. 29, 2012).
11. On approval of the procedure for medical care for patients with Stroke. Pub. L. of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation № 928н (Nov. 15, 2012).
12. Zabolotskih IB, Shifman EM, redaktory. Klinicheskie rekomendacii. Anesteziologija-reanimatologija. M.: GJEOTAR-Media, 2016; p. 873–928. Russian.
13. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 11. Challenges and perspectives for the future of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 311–21.
14. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 10, Science and research in PRM: specificities and challenges. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 287–310.
15. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 9. Education and continuous professional development: shaping the future of PRM. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 279–86.
16. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 5. The PRM organizations in Europe: structure and activities. Eur J Phys Rehabil Med. 2018; 54 (2): 198–213.

17. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 4. History of the specialty: where PRM comes from. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2018; 54 (2): 186–97.
18. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 3. A primary medical specialty: the fundamentals of PRM. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2018; 54 (2): 177–85.
19. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine in Europe. Chapter 2. Why rehabilitation is needed by individual and society. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2018; 54 (2): 166–76.
20. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine (PRM) in Europe. Chapter 1. Definitions and concepts of PRM. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2018; 54 (2): 156–65.
21. European Physical and Rehabilitation Medicine Bodies Alliance. White Book on Physical and Rehabilitation Medicine in Europe. Introductions, Executive Summary, and Methodology. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2018; 54 (2): 125–55.
22. Ivanova GE, Melnikova EV, Shmonin AA, Aronov DM, Belkin AA, Belyaev AF, et al. Pilot project "Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation". Protocol of the second phase of the project. *Scientific notes of PSPbGMU.* 2016; (2): 27–34.
23. Ivanova GE, Melnikova EV, Shmonin AA, Verbitskaya EV, Aronov DM, Belkin AA, et al. Pilot Project "Development of Medical Rehabilitation System in the Russian Federation": Preliminary Results at the First and Second Stages. *Journal of Restorative Medicine.* 2017; 2 (78): 10–15.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПО МЕЖДУНАРОДНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМАХ ПОСЛЕ ЭНДОВАСКУЛЯРНОГО ЛЕЧЕНИЯ

А. А. Олейник¹ ✉, Н. Е. Иванова¹, Е. А. Олейник¹, А. Ю. Иванов^{2,3}¹ Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия³ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Аневризматическое субарахноидальное кровоизлияние (САК) ассоциировано с высокой летальностью и инвалидизацией больных. Пациенты с множественными церебральными аневризмами (МА) чаще подвержены неоднократным оперативным вмешательствам, у них имеется вероятность образования аневризм *de novo* и их разрыва. Целью исследования было оценить качество жизни (КЖ) пациентов с помощью Международной классификации функционирования (МКФ) в отдаленном послеоперационном периоде после эндоваскулярного лечения МА для определения пути оптимизации реабилитации. В исследовании приняли участие оперированные эндоваскулярно пациенты с множественными (> 2) церебральными аневризмами (141 человек). Всем пациентам было выполнено 1–6 эндоваскулярных операций, осложнения лечения возникли в 7,1% (10/141). КЖ определяли в сроки от 6 до 24 месяцев после операции, используя МКФ. Выявлено, что в отдаленном послеоперационном периоде результаты были хуже по доменам, связанным с болью, памятью, координацией движений, силой конечностей. При геморрагическом типе течения результаты по доменам, связанным с передвижением, были хуже по сравнению с другими типами течения ($p < 0,05$), а при псевдоопухолевом — по доменам, связанным с нарушением функции черепно-мозговых нервов, отвечающих за иннервацию мышц глаза ($p < 0,001$). По сравнению с показателями дооперационного периода в отдаленном послеоперационном периоде выявлено повышение активности и участия больных с геморрагическим типом течения ($p < 0,05$). На выраженность нарушений активности влияли осложнения операций, возраст больных ($p < 0,05$), осложнения острого периода САК ($p < 0,001$).

Ключевые слова: множественные церебральные аневризмы, качество жизни, эндоваскулярное лечение, отдаленные результаты лечения аневризм, оптимизация медицинской реабилитации

Информация о вкладе авторов: А. А. Олейник — сбор, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, написание текста статьи; Н. Е. Иванова — планирование исследования, редактирование рукописи; Е. А. Олейник — анализ литературы, статистическая обработка; А. Ю. Иванов — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова (протокол № 30 от 13 февраля 2017 г.). Все участники подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Анатольевна Олейник
ул. Маяковского, д. 12, г. Санкт-Петербург, 191014; doctor.an.an@mail.ru

Статья получена: 19.11.2019 **Статья принята к печати:** 03.12.2019 **Опубликована онлайн:** 13.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.080

QUALITY OF LIFE OF PATIENT WITH MULTIPLE CEREBRAL ANEURYSMS AFTER ENDOVASCULAR TREATMENT: ASSESSMENT BY THE CRITERIA OF INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF FUNCTIONING

Oleynik AA¹ ✉, Ivanova NE¹, Oleynik EA¹, Ivanov AY^{2,3}¹ Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia² St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia³ North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

The rate of mortality and disability associated with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH) is high. Patients with multiple cerebral aneurysms (MCA) require repeated surgeries more often and they are likely to develop aneurysms *de novo* and suffer their rupture. This study aimed to apply the International Classification of Functioning (ICF) to assess the quality of life (QOL) of MCA patients after endovascular treatment, late postoperative period. The study involved patients who underwent endovascular treatment and had multiple (>2) cerebral aneurysms (141 people). All patients underwent 1–6 endovascular surgeries; complications developed in 7.1% (10/141) of cases. The patients' QOL was assessed against the ICF 6 to 24 months post-surgery. We found that at such time points treatment results deteriorate in a number of domains, namely those associated with pain, memory, motor coordination, limb strength. Patients with ruptured aneurysms showed worse results for locomotion-related domains than patients with unruptured aneurysms ($p < 0.05$), in patients with aneurysms having a pseudotumor type of flow, by domains associated with dysfunction of the cranial nerves responsible for innervation of the eye muscles ($p < 0.001$) ($p < 0.001$). Patients with ruptured MCA were more active in the late post-surgery period, which was revealed by comparing that period's data to the baseline pre-surgery records ($p < 0.05$). The severity of activity disorders depended on surgery complications, patient age ($p < 0.05$), complications that developed during the acute SAH stage ($p < 0.001$).

Keywords: multiple cerebral aneurysms, quality of life, endovascular treatment, late aneurysms treatment results, optimization of medical rehabilitation

Author contribution: Oleynik AA — data collection, analysis and interpretation, literature analysis, article authoring; Ivanova NE — research planning, manuscript editing; Oleynik EA — literature analysis, statistical processing; Ivanov AY — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Almazov National Medical Research Centre (minutes #30 of February 13, 2017). All participants signed a voluntary consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Oleynik
Mayakovskogo, 12, St. Petersburg, 191014; doctor.an.an@mail.ru

Received: 19.11.2019 **Accepted:** 03.12.2019 **Published online:** 13.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.080

Аневризмы сосудов головного мозга — сосудистые аномалии, являющиеся одной из самых частых причин субарахноидального кровоизлияния (САК) [1–2]. За последние

30 лет лечение САК значительно изменилось [3]. Понимание патофизиологических механизмов вазоспазма и ишемии головного мозга после САК привело к улучшению

интенсивной терапии в остром периоде и уменьшению ишемических осложнений [4–5]. В связи с достижениями хирургии аневризм сосудов головного мозга, в том числе в остром периоде САК, усовершенствованием методов внутрисосудистого выключения аневризм из кровотока уменьшилась доля повторных САК [6]. Развитие и распространение неинвазивной диагностики (магнитно-резонансной ангиографии, спиральной компьютерной ангиографии) привели к обнаружению бессимптомных аневризм сосудов головного мозга [7]. Оценку риска кровоизлияния из аневризмы проводят с учетом морфологических особенностей аневризмы (размера, формы, расположения), а единственным методом лечения остается хирургическое вмешательство [8]. Осложнения оперативных вмешательств на аневризмах варьируют от 3 до 29% [9–11]. На сегодняшний день, однако, недостаточно исследований качества жизни больных после операции на аневризмах, как бессимптомных, так и проявляющихся кровоизлиянием или псевдоопухолевым течением [12]. Известно, что до 20–30% больных после перенесенного внутримозгового кровоизлияния остаются инвалидами [13]. Улучшение результатов медицинской реабилитации больных после перенесенного САК, а также ишемических или геморрагических осложнений операций возможно при оптимизации алгоритмов реабилитации с учетом ведущих неврологических нарушений [14]. Оценка качества жизни больных, основанная на Международной классификации функционирования, ограничения жизнедеятельности и здоровья (МКФ), дает целостное представление о различных аспектах здоровья пациента [15]. Цель исследования — оценить качество жизни пациентов с помощью МКФ, в отдаленном послеоперационном периоде после эндоваскулярного лечения множественных аневризм сосудов головного мозга для определения пути оптимизации реабилитационных алгоритмов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты с множественными аневризмами сосудов головного мозга (141 человек), получившие эндоваскулярное лечение в РНХИ имени

А. Л. Поленова в 2010–2018 гг. Среди них лиц мужского пола было 17% (24/141), лиц женского пола — 83% (117/141); средний возраст пациентов составил 54,16 ± 11,24 года. Критерии включения пациентов в исследование: наличие у пациента множественных (> 2) церебральных аневризм, оперированных эндоваскулярно; возможность проследить у больного отдаленные результаты. Критерии исключения: возраст меньше 18 лет; наличие у больного аневризм в сочетании с артериовенозными мальформациями; наличие в анамнезе микрохирургического лечения аневризмы. В каждом наблюдении было диагностировано от 2 до 6 аневризм: 2 аневризмы были выявлены в 62,4% случаев (88/141), 3 аневризмы — в 26,2% (36/141), 4 аневризмы — в 7,8% (11/141), 5 аневризм — в 2,8% (4/141), 6 аневризм — в 0,7% (1/141). В 141 наблюдении — 349 аневризм. Размеры аневризм: миллиарные (до 3 мм) — 22,9% (80/349), обычного размера (4–15 мм) — 67,9% (237/349), большие (16–25 мм) — 5,2% (18/349), гигантские (> 25 мм) — 4,0% (14/349). В дооперационном периоде перенесли одно или несколько субарахноидальных кровоизлияний — 45,4% пациентов (64 наблюдения), имели псевдоопухолевый (проявляющийся объемным воздействием на окружающие структуры) тип течения аневризмы — 7,1% (10 наблюдений), бессимптомный тип течения (случайно выявленные аневризмы) — 47,5% (67 наблюдений). Всем пациентам выполнено от 1 до 6 эндоваскулярных операций (всего 271 операция): эндоваскулярная окклюзия аневризм отделяемыми спиралями — 42,4% (115/271), эндоваскулярная окклюзия аневризм отделяемыми спиралями с использованием ассистирующих методик (стент- и баллон-ассистенция) — 32,8% (89/271), установка поток-отклоняющего стента — 24,7% (67/271). Осложнения эндоваскулярного лечения (вазоспазм, ишемические осложнения, геморрагические осложнения) возникали в 7,1% случаев (10/141), из них стойкий неврологический дефицит развился в 4,3% (6/141). Качество жизни определяли в отдаленном послеоперационном периоде в сроки от 6 до 24 месяцев. Для этих целей использовали МКФ [15]. Оценивали домены нарушения функции организма, домены активности и участия (табл.).

Таблица. Домены нарушения функции, активности и участия и методы их оценки

Домены нарушения функции организма	Метод оценки
b144 Функции памяти	MMSE [16]
b2152 Функции мышц глаза	Изолированная оценка функции мышц глаза по шкале повреждения функциональных систем по J. F. Kurtzke*
b2702 Тактильная чувствительность	Шкальная оценка**
b167 Умственные функции речи	Шкала нарушения речи Л. И. Вассермана [17]
b28010 Боль в голове и шее	Визуальная аналоговая шкала оценки боли [18]
b320 Функции артикуляции	Оценка по степени тяжести
b730 Функции мышечной силы	Шкала оценки мышечной силы
b7602 Координация произвольных движений	GET UP AND GO TEST [19]
d450 Ходьба	Тест шестиминутной ходьбы [20]
d640 Выполнение работы по дому	Шкала Рэнкина [21], расширенная шкала исходов Глазго [22]
d510 Мытье	Индекс повседневной активности Бартел [23], шкала Рэнкина
d540 Одевание	Индекс повседневной активности Бартел
d550 Прием пищи	Индекс повседневной активности Бартел

Примечание: * — 0 — нет изменений; 1 — симптомы без нарушения функций (легкие нарушения, выявляемые при неврологическом осмотре, у пациента жалоб нет); 2 — легкие нарушения (легкое нарушение движений глаз, пациент жалуется на двоение, имеется парез какой-либо одной наружной мышцы глаза); 3 — умеренные нарушения (умеренные нарушения движений глаз, у пациента есть жалобы на двоение); 4 — выраженные нарушения (паралич одной или нескольких наружных мышц глаза); ** — 0 — нет нарушений; 1 — легкие нарушения; 2 — умеренные нарушения; 3 — тяжелые нарушения; 4 — абсолютные нарушения.

Все данные заносили в электронную таблицу Microsoft Excel 7.0. Полученные в исследовании клинические данные обрабатывали в STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Tulsa; USA). Сравнение количественных параметров (оценку по доменам МКФ, шкале Рэнкина, расширенной шкале исходов Глазго, индекса повседневной активности Бартел в зависимости от возрастных групп, наличия осложнений САК, осложнений оперативных вмешательств, групп дооперационного клинического течения) проводили с помощью критериев Манна–Уитни, медианного χ^2 и модуля ANOVA. Динамику показателей по доменам активности и участия до и после оперативного вмешательства оценивали с помощью критерия Уилкоксона. Статистически достоверными считали выводы при величине $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка неврологической симптоматики и жалоб пациента в отдаленном послеоперационном периоде представлена на рис. 1. Оценка доменов активности и участия в определителе «капацитет» и «реализация» представлена на рис. 2.

В связи с тем, что МКФ позволяет системно оценить состояние нарушений функций организма, используя единую оценку степени выраженности нарушений, было выявлено, что чаще показатели были хуже по доменам, связанным с болью (b28010), функциям памяти (b144), несколько реже — с координацией движений (b7602), силой мышц (b7302). По разделу активности и участия чаще были выявлены нарушения, связанные с ходьбой (d450), выполнением работы по дому (d640).

При оценке выявленных нарушений в отдаленном послеоперационном периоде в зависимости от типа предоперационного течения аневризм обнаружено, что

при геморрагическом типе течения результаты по доменам, связанным с передвижением (b 7302, d4602, d640), были достоверно хуже по сравнению с другими типами течения множественных аневризм ($p < 0,05$). Нарушения функций черепно-мозговых нервов, отвечающих за иннервацию мышц глаза (III, IV, VI), достоверно чаще были в группе с псевдоопухолевым типом течения аневризм, даже в отдаленном послеоперационном периоде ($p < 0,001$). Достоверной разницы между группами в других доменах выявлено не было ($p > 0,05$). Оценка цефалгического синдрома после операции показала, что нет статистически значимой разницы у пациентов с разорвавшимися и неразорвавшимися аневризмами. Данный факт указывает на значимость детального изучения структуры цефалгического синдрома и его причины.

При сравнении дооперационных данных и полученных в отдаленном послеоперационном периоде выявлено улучшение качества жизни больных с геморрагическим типом течения по доменам d4602 (передвижение вне своего дома и вне других зданий; рис. 3) ($p = 0,004$), d640 (выполнение работы по дому) ($p = 0,03$).

На степень выраженности нарушений активности (оценка с помощью индекса повседневной активности Бартел, шкалы Рэнкина, расширенной шкалы исходов Глазго) оказывали влияние осложнения после оперативных вмешательств ($p < 0,05$), возраст больных от 51 до 60 лет ($p < 0,05$), осложнения острого периода САК ($p < 0,001$).

В отдаленном послеоперационном периоде были выявлены следующие осложнения: разрыв аневризмы — 1,4% (2/141, с формированием очаговой неврологической симптоматики), тромбоз сосуда — 2,1% (3/141, в одном наблюдении с формированием очаговой неврологической симптоматики). В связи с наличием неоперированной аневризмы, проявившей

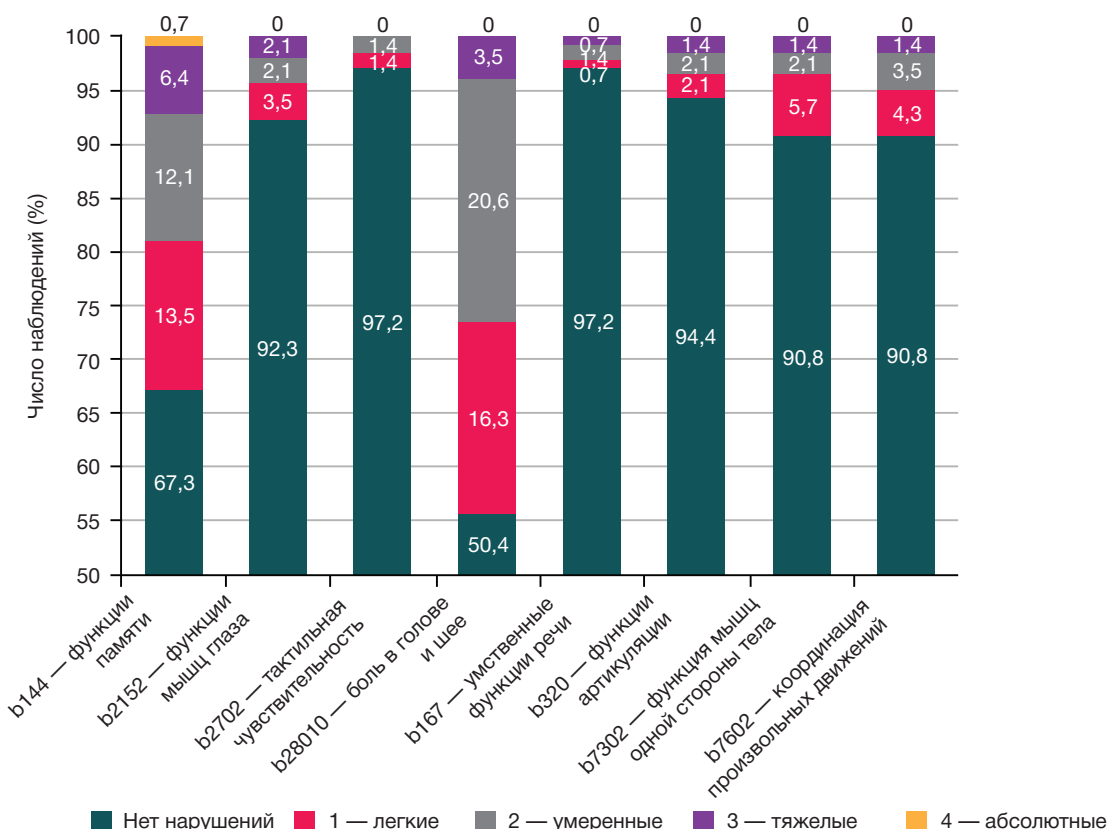


Рис. 1. Оценка по доменам нарушений функций организма у больных с множественными церебральными аневризмами в отдаленном послеоперационном периоде

себя внутримозжечковым кровоизлиянием, больные были направлены на хирургическое лечение с последующими реабилитационными мероприятиями.

Таким образом, оценка степени нарушений по МКФ позволяет определять пути реабилитации таких больных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам нашего исследования, у пациентов как с одиночными, так и с множественными аневризмами, наличие в анамнезе субарахноидального кровоизлияния снижает функциональные результаты, что подтверждают и литературные данные [24–26]. Как и в нашем исследовании, в ряде других работ были выявлены следующие факторы, влияющие на функциональный исход: возраст больных

на момент кровоизлияния [24], паренхиматозное кровоизлияние [24–25], большой и гигантский размер аневризмы [25]. Полученные нами данные расходятся с результатами других исследований, выделяющих из факторов также локализацию аневризмы в области средней мозговой артерии [24, 30], внутримозжечковое кровоизлияние [27].

В последние годы принято использовать МКФ для оценки результатов лечения и/или реабилитации при заболеваниях и повреждениях нервной системы [28] и других систем организма [29]. Однако работ, посвященных оценке результатов эндоваскулярного лечения больных с множественными аневризмами с помощью МКФ, недостаточно. Так, с использованием МКФ были классифицированы детерминанты при обобщении

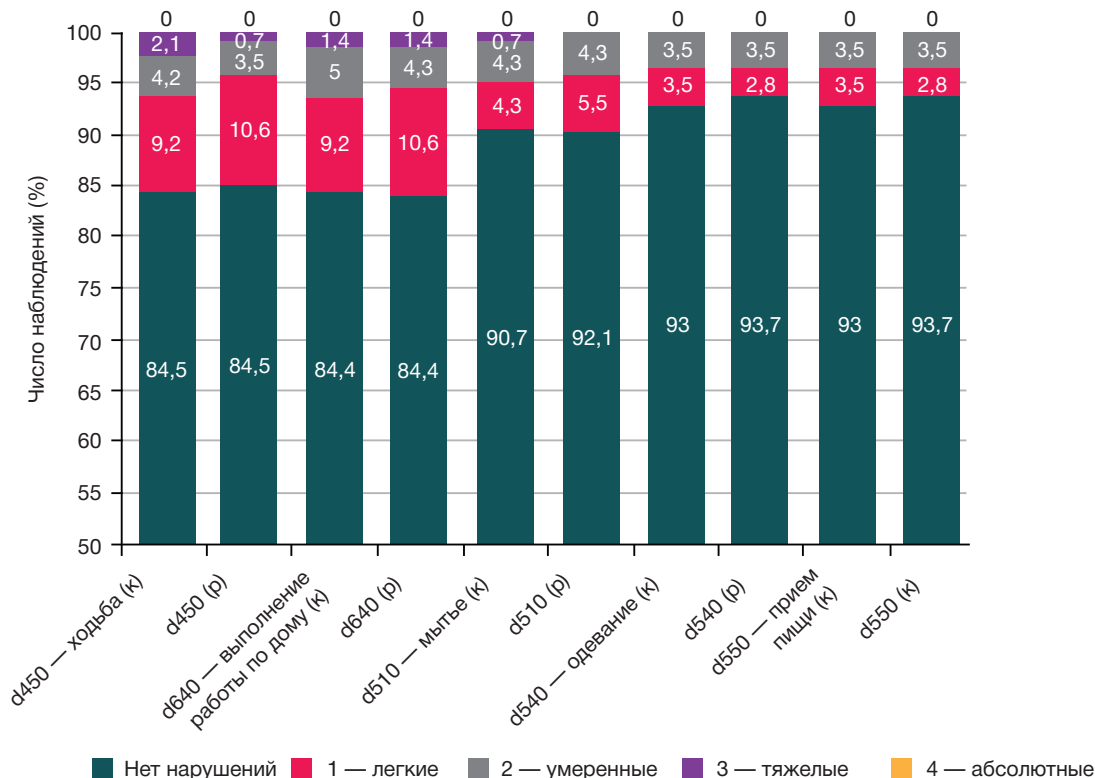


Рис. 2. Оценка по доменам активности и участия в определителе «капситет» (κ) и «реализация» (р) у больных с множественными церебральными аневризмами в отдаленном послеоперационном периоде

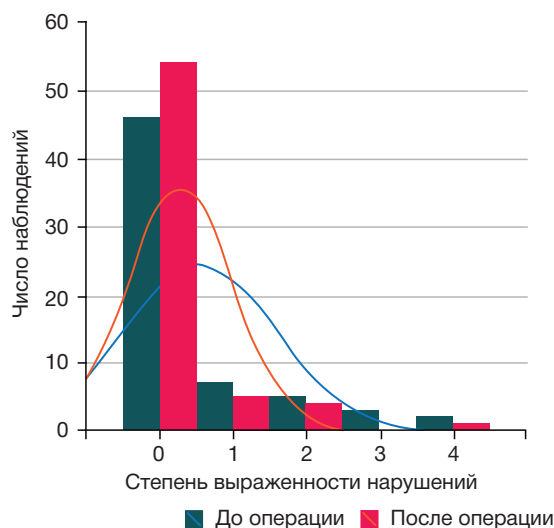


Рис. 3. Оценка по домену d4602 (передвижение вне своего дома и вне других зданий) у больных с геморрагическим типом течения дооперационно и в отдаленном послеоперационном периоде

данных разных исследований по детерминантам снижения качества жизни у больных после аневризматического субарахноидального кровоизлияния [30]. Было выявлено, что детерминанты, связанные со структурой и функциями организма (клиническое состояние при поступлении, снижение настроения), ограничения активности (физическая инвалидность и когнитивные жалобы) и личностные факторы (женский пол, более старший возраст) связаны с ухудшением качества жизни после аневризматического САК. В нашем исследовании тоже показано снижение качества жизни у больных с нарушениями функций организма (b7302, b2152).

ВЫВОДЫ

В отдаленном послеоперационном периоде после эндоваскулярного лечения множественных церебральных

аневризм качество жизни снижено у больных, перенесших САК, а также у имеющих крупные аневризмы с псевдоопухолевым типом течения. В связи с вероятностью образования аневризм *de novo*, а также реканализации аневризм, имеется риск повторного САК. Таким образом, дальнейшие реабилитационные мероприятия необходимо проводить с учетом нейровизуализационных данных в отдаленном послеоперационном периоде. Оценка состояния пациента по МКФ позволяет описать нарушения функций организма, его активности и участия, формулировать цели реабилитации, оценивать результаты эндоваскулярного лечения и дальнейших реабилитационных мероприятий. Использование отдельных шкал препятствует проведению системного анализа состояния пациента. Единое описание степени выраженности нарушений не только удобно для оценки результатов, но и позволяет проводить научные исследования, выполнять их сравнение друг с другом.

Литература

1. Крылов В. В., редактор. Хирургия аневризм головного мозга. В трех томах. Том I. М.: Изд-во ИП «Т. А. Алексеева», 2011; 432 с.
2. Азаров М. В., Купатадзе Д. Д., Набоков В. В. Синдром Клиппеля-Треноне, этиология, патогенез, диагностика и лечение. Педиатрия. 2018; 9 (2): 78–86.
3. La Pira B, Singh TD, Rabinstein AA, Lanzino G. Time Trends in Outcomes After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Over the Past 30 Years. Mayo Clin Proc. 2018 Dec; 93 (12): 1786–93.
4. Dinger MN, Zazulia AR. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Strategies for Preventing Vasospasm in the Intensive Care Unit. Semin Respir Crit Care Med. 2017 Dec; 38 (6): 760–7.
5. Горощенко С. А., Иванова Н. Е., Рожченко Л. В., Забродская Ю. М., Размологова А. Ю., Кондратьев А. Н. и др. Экстрапонтинный миелолиоз, развившийся после аневризматического субарахноидального кровоизлияния (случай из практики и обзор литературы). Вопросы нейрохирургии. 2016; (6): 82–7.
6. Anxionnat R, Tonnelet R, Derelle AL, Liao L, Barbier C, Bracard S. Endovascular treatment of ruptured intracranial aneurysms: Indications, techniques and results. Diagn Interv Imaging. 2015 Jul–Aug; 96 (7–8): 667–75.
7. Крылов В. В., Элиава Ш. Ш., Яковлев С. Б., Хейреддин А. С., Белоусова О. Б., Полунина Н. А. Клинические рекомендации по лечению неразорвавшихся бессимптомных аневризм головного мозга. Вопросы нейрохирургии. 2016; 80 (5): 124–35.
8. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J 3rd, Meissner I, Brown RD Jr, Piepgras DG, et al. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. Lancet. 2003 Jul 12; 362 (9378): 103–10.
9. Ihn YK, Shin SH, Baik SK, Choi IS. Complications of endovascular treatment for intracranial aneurysms: Management and prevention. Interv Neuroradiol. 2018 Jun; 24 (3): 237–45.
10. Oishi H, Yamamoto M, Shimizu T, Yoshida K, Arai H. Endovascular therapy of 500 small asymptomatic unruptured intracranial aneurysms. AJNR Am J Neuroradiol. 2012 May; 33 (5): 958–64.
11. Kim DY, Park JC, Kim JK, Sung YS, Park ES, Kwak JH, Choi CG, Lee DH. Microembolism after Endovascular Treatment of Unruptured Cerebral Aneurysms: Reduction of its Incidence by Microcatheter Lumen Aspiration. Neurointervention. 2015 Sep; 10 (2): 67–73.
12. Dammann P, Wittek P, Darkwah Oppong M, Hütter BO, Jabbari R, et al. Relative health-related quality of life after treatment of unruptured intracranial aneurysms: long-term outcomes and influencing factors. Ther adv neurol disord. 2019; (12): 1–12.
13. le Roux AA, Wallace MC. Outcome and cost of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Neurosurg Clin N Am. 2010 Apr; 21 (2): 235–46.
14. Geyh S, Cieza A, Schouten J, Dickson H, Frommelt P, Omar Z, et al. ICF Core Sets for stroke. J Rehabil Med. 2004 Jul; (44 Suppl): 135–41.
15. World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability and Health: ICF. Geneva: WHO; 2001.
16. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-mental state» a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. Journal of Psychiatric Research. 1975; 12 (3): 189–98.
17. Вассерман Л. И., Дорофеева С. А., Меерсон Я. А. Методы нейропсихологической диагностики. Практическое руководство. СПб.: Стройлеспечатль, 1997.
18. Scott J, Huskisson EC. Graphic representation of pain. Pain. 1976; 2 (2): 175–84.
19. Mathias S, Nayak US, Isaacs B. Balance in elderly patients: the "get-up and go" test. Arch Phys Med Rehabil. 1986 Jun; 67 (6): 387–9.
20. American Thoracic Society statement: guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166 (1): 111–7.
21. Bonita R, Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke. Stroke. 1988 Dec; 19 (12): 1497–500.
22. Wilson JT, Pettigrew LE, Teasdale GM. Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use. J Neurotrauma. 1998; (15): 573–85.
23. Mahoney F, Barthel D. Functional evaluation: the Barthel Index. Md Med J. 1965; (14): 61–5.
24. Preiss M, Netuka D, Koblihova J, Bernardova L, Charvat F, Kratochvilova D, et al. Quality of life 1 year after aneurysmal subarachnoid hemorrhage in good outcome patients treated by clipping or coiling. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg. 2012 Aug; 73 (4): 217–23.
25. Andersen CR, Fitzgerald E, Delaney A, Finfer S. Systematic Review of Outcome Measures Employed in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (aSAH). Clin res neurocritical care. 2019; 30 (3): 534–41.
26. AlMatter M, Aguilar Pérez M, Bhogal P, Hellstern V, Ganslandt O, Henkes H. Results of interdisciplinary management of 693 patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Clinical outcome and relevant prognostic factors. Clin Neurol Neurosurg. 2018 Apr; (167): 106–11.
27. Visser-Meily JMA, Rhebergen ML, Rinkel GJE, van Zandvoort MJ, Post MWM. Long-term health related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage; relationship with psychological symptoms and personality characteristics. Stroke. 2009; (40): 1526–9.

28. Бодрова Р. А., Аухадеев Э. И., Тихонов И. В. Опыт применения международной классификации функционирования в оценке эффективности реабилитации пациентов с последствиями поражения ЦНС. Практическая медицина. 2013; 1 (66): 98–100.
29. Пономаренко Г. Н., Шошмин А. В., Бесстрашнова Я. К., Черкашина И. В. Планирование и оценка эффективности реабилитации больных остеоартрозом: использование базового

набора Международной классификации функционирования, ограничений жизнедеятельности и здоровья. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2017; (1): 4–8.

30. Passier PE, Visser-Meily JM, Rinkel GJ, Lindeman E, Post MW. Determinants of health-related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. Qual Life Res. 2013 Jun; 22 (5): 1027–43.

References

1. Krylov VV, redaktor. Hirurgija anevrizm golovnogogo mozga. V treh tomah. Tom I. M.: Izd-vo IP «T. A. Alekseeva», 2011; 432 s. Russian.
2. Azarov MV, Kupatadze DD, Nabokov VV. Sindrom Klippelja-Trenone, jetiologija, patogeneza, diagnostika i lechenie. Pediatrija. 2018; 9 (2): 78–86. Russian.
3. La Pira B, Singh TD, Rabinstein AA, Lanzino G. Time Trends in Outcomes After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Over the Past 30 Years. Mayo Clin Proc. 2018 Dec; 93 (12): 1786–93.
4. Diringier MN, Zazulia AR. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Strategies for Preventing Vasospasm in the Intensive Care Unit. Semin Respir Crit Care Med. 2017 Dec; 38 (6): 760–7.
5. Goroshhenko SA, Ivanova NE, Rozhchenko LV, Zabrodskaja YuM, Razmologova AYU, Kondratiev AN, i dr. Jekstrapontinnyj mielinoliz, razvivshijsja posle anevrizmaticheskogo subarahnoidal'nogo krovoizlivanija (sluchaj iz praktiki i obzor literatury). Voprosy neirohirurgii. 2016; (6): 82–7. Russian.
6. Anxionnat R, Tonnelet R, Derelle AL, Liao L, Barbier C, Bracard S. Endovascular treatment of ruptured intracranial aneurysms: Indications, techniques and results. Diagn Interv Imaging. 2015 Jul–Aug; 96 (7–8): 667–75.
7. Krylov VV, Eliava ShSh, Yakovlev SB, Kheyreddin AS, Belousova OB, Polunina NA. Klinicheskie rekomendacii po lecheniju nerazorvavshijsja bessimptomnyh anevrizm golovnogogo mozga. Voprosy neirohirurgii. 2016; 80 (5): 124–35. Russian.
8. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J 3rd, Meissner I, Brown RD Jr, Piegras DG, et al. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. Lancet. 2003 Jul 12; 362 (9378): 103–10.
9. Ihn YK, Shin SH, Baik SK, Choi IS. Complications of endovascular treatment for intracranial aneurysms: Management and prevention. Interv Neuroradiol. 2018 Jun; 24 (3): 237–45.
10. Oishi H, Yamamoto M, Shimizu T, Yoshida K, Arai H. Endovascular therapy of 500 small asymptomatic unruptured intracranial aneurysms. AJNR Am J Neuroradiol. 2012 May; 33 (5): 958–64.
11. Kim DY, Park JC, Kim JK, Sung YS, Park ES, Kwak JH, Choi CG, Lee DH. Microembolism after Endovascular Treatment of Unruptured Cerebral Aneurysms: Reduction of its Incidence by Microcatheter Lumen Aspiration. Neurointervention. 2015 Sep; 10 (2): 67–73.
12. Dammann P, Wittek P, Darkwah Oppong M, Hütter BO, Jabbari R, et al. Relative health-related quality of life after treatment of unruptured intracranial aneurysms: long-term outcomes and influencing factors. Ther adv neurol disord. 2019; (12): 1–12.
13. le Roux AA, Wallace MC. Outcome and cost of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Neurosurg Clin N Am. 2010 Apr; 21 (2): 235–46.
14. Geyh S, Cieza A, Schouten J, Dickson H, Frommelt P, Omar Z, et al. ICF Core Sets for stroke. J Rehabil Med. 2004 Jul; (44 Suppl): 135–41.
15. World Health Organization. International Classification of Functioning, Disability and Health: ICF. Geneva: WHO; 2001.
16. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-mental state» a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. Journal of Psychiatric Research. 1975; 12 (3): 189–98.
17. Vasserman LI, Dorofeeva SA, Meerson YaA. Metody neipsihologicheskoy diagnostiki. Prakticheskoe rukovodstvo. SPb.: Strojlespechat', 1997. Russian.
18. Scott J, Huskisson EC. Graphic representation of pain. Pain. 1976; 2 (2): 175–84.
19. Mathias S, Nayak US, Isaacs B. Balance in elderly patients: the "get-up and go" test. Arch Phys Med Rehabil. 1986 Jun; 67 (6): 387–9.
20. American Thoracic Society statement: guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166 (1): 111–7.
21. Bonita R, Beaglehole R. Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke. Stroke. 1988 Dec; 19 (12): 1497–500.
22. Wilson JT, Pettigrew LE, Teasdale GM. Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use. J Neurotrauma. 1998; (15): 573–85.
23. Mahoney F, Barthel D. Functional evaluation: the Barthel Index. Md Med J. 1965; (14): 61–5.
24. Preiss M, Netuka D, Koblihovala J, Bernardova L, Charvat F, Kratochvilova D, et al. Quality of life 1 year after aneurysmal subarachnoid hemorrhage in good outcome patients treated by clipping or coiling. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg. 2012 Aug; 73 (4): 217–23.
25. Andersen CR, Fitzgerald E, Delaney A, Finfer S. Systematic Review of Outcome Measures Employed in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (aSAH). Clin res neurocritical care. 2019; 30 (3): 534–41.
26. AlMatter M, Aguilar Pérez M, Bhogal P, Hellstern V, Ganslandt O, Henkes H. Results of interdisciplinary management of 693 patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Clinical outcome and relevant prognostic factors. Clin Neurol Neurosurg. 2018 Apr; (167): 106–11.
27. Visser-Meily JMA, Rhebergen ML, Rinkel GJE, van Zandvoort MJ, Post MWM. Long-term health related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage; relationship with psychological symptoms and personality characteristics. Stroke. 2009; (40): 1526–9.
28. Bodrova RA, Auhadeev Yel, Tihonov IV. Opyt primeneniya mezhdunarodnoj klassifikacii funkcionirovaniya v ocenke jeffektivnosti reabilitacii pacientov s posledstviami porazheniya CNS. Prakticheskaja medicina. 2013; 1 (66): 98–100. Russian.
29. Ponomarenko GN, Shoshmin AV, Besstrashnova YaK, Cherkashina IV. Planirovanie i ocenka jeffektivnosti reabilitacii bol'nyh osteoartrozom: ispol'zovanie bazovogo nabora Mezhdunarodnoj klassifikacii funkcionirovaniya, ogranichenij zhiznedejatel'nosti i zdorov'ja. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kul'tury. 2017; (1): 4–8. Russian.
30. Passier PE, Visser-Meily JM, Rinkel GJ, Lindeman E, Post MW. Determinants of health-related quality of life after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. Qual Life Res. 2013 Jun; 22 (5): 1027–43.

ИНТЕРИКТАЛЬНАЯ ЭПИЛЕПТИФОРМНАЯ АКТИВНОСТЬ ВО СНЕ И В БОДРСТВОВАНИИ У ПАЦИЕНТОВ С ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

А. Г. Брутян , А. И. Белякова-Бодина, С. М. Долгова, Т. Н. Пушкар, А. А. Абрамова


Научный центр неврологии, Москва, Россия

Сон является значимым активатором эпилептиформной активности, при этом вероятность регистрации разрядов может меняться в зависимости от стадии и глубины сна. Целью исследования было оценить зависимость эпилептиформной активности от уровня бодрствования и глубины сна в популяции взрослых пациентов с височной локализацией разрядов. Нами было проанализировано 32 продолженных ЭЭГ-мониторинга с записью ночного сна, в которых были отмечены все фокальные разряды, а также проводилось стадирование сна. Определяли общий индекс эпилептиформной активности, как отношение общего количества разрядов к длительности исследования в часах, а также индивидуальные индексы эпилептиформной активности для бодрствования и каждой из стадий сна: для REM-фазы и N1, N2 и N3 стадий NREM-сна. У подавляющего числа пациентов (28) максимальный индекс зарегистрирован в стадии N3. По мере перехода к более глубоким стадиям сна, индекс разрядов последовательно и достоверно увеличивался, достигая максимальных величин в стадии N3 ($p < 0,01$). В фазу REM-сна индекс резко снижался ($p < 0,01$), приближаясь к значениям, зарегистрированным в бодрствовании. Основным механизмом, который приводит к увеличению индекса эпилептиформной активности в NREM-сне, может быть нарастающая синхронизация корковых нейронов с увеличением доли медленной активности в ЭЭГ. Таким образом, стадия N3 является наиболее информативной в плане регистрации фокальных разрядов, что диктует необходимость достижения достаточной глубины сна при проведении диагностических ЭЭГ исследований у пациентов с височными формами эпилепсии.

Ключевые слова: электроэнцефалография, сон, эпилептиформная активность, эпилепсия, височная эпилепсия

Информация о вкладе авторов: А. Г. Брутян — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. И. Белякова-Бодина, А. А. Абрамова — сбор, анализ, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; С. М. Долгова, Т. Н. Пушкар — сбор, анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 1–4/19 от 23 января 2019 г.).

 **Для корреспонденции:** Амаяк Грачевич Брутян
Ленинградский проспект, д. 33, г. Москва, 125284; abrutian@mail.ru

Статья получена: 23.08.2019 **Статья принята к печати:** 30.09.2019 **Опубликована онлайн:** 02.11.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.073

INTERICTAL EPILEPTIFORM ACTIVITY IN SLEEP AND WAKEFULNESS IN PATIENTS WITH TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Broutian AG , Belyakova-Bodina AI, Dolgova SM, Pushkar TN, Abramova AA


Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Sleep is an important activator of epileptiform activity, with epileptiform discharge (ED) probability varying among sleep stages. The aim of our study was to analyze the association between epileptiform activity and sleep stages or wakefulness in adults with temporal discharges. We analyzed 32 long-term overnight EEG recordings. All focal discharges were marked, and the entire sleep was staged. Absolute general epileptiform discharge index (EDI), defined as a ratio of total ED number to the full recording time in hours, as well as absolute EDIs for REM, N1, N2 and N3 stages were calculated. The majority of patients (28) had the highest EDI in N3. EDI increased significantly while sleep progressed to deeper stages, reaching its peak in N3. In REM sleep, EDI sharply declined ($p < 0.01$) reaching the levels of wakefulness. Increasing synchronization of cortical neurons is thought to be the major mechanism of EDI rise in NREM sleep. Hence, N3 seems to be the most sensitive stage to capture EDs, which highlights the importance of deep sleep recording in patients with temporal epilepsy.

Keywords: electroencephalography, sleep, epileptiform activity, epilepsy, temporal lobe epilepsy

Author contribution: Broutian AG — research planning, literature analysis, data interpretation, manuscript drafting; Belyakova-Bodina AI, Abramova AA — data collection, analysis, interpretation, manuscript drafting; Dolgova SM, Pushkar TN — data collection, analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Research Center of Neurology Ethics Committee (protocol № 1–4/19 of January 23, 2019).

 **Correspondence should be addressed:** Amayak G. Broutian
Leningradsky Prospect, 33, Moscow, 125284; abrutian@mail.ru

Received: 23.08.2019 **Accepted:** 30.09.2019 **Published online:** 02.11.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.073

Вероятность развития эпилептических приступов в зависимости от уровня бодрствования и глубины сна в значительной степени определяют форма эпилепсии и тип приступов [1, 2]. Например, для юношеской миоклонической эпилепсии характерны приступы после пробуждения. При аутосомно-доминантной ночной лобной эпилепсии приступы возникают исключительно во сне. Известно также, что сон служит значимым активатором интериктальной (межприступной) эпилептиформной активности в электроэнцефалографии (ЭЭГ), причем для фокальных разрядов в большей степени, чем

для генерализованных [3]. Сон, однако, не является однородным состоянием, а представляет собой довольно цикличную смену нескольких состояний, которые отличаются глубиной, физиологическими показателями и паттернами ЭЭГ. Наиболее ярким примером служит эпилептическая энцефалопатия с продолженной спайк-волновой активностью во сне (continuous spikes and waves during sleep, CSWS), при которой эпилептические разряды практически полностью замещают физиологические паттерны NREM-сна (non-rapid eye movements sleep, сон без «быстрых движений глаз»), однако регрессируют в

фазу REM (rapid eye movements) сна. Таким образом, следует ожидать различную вероятность регистрации эпилептиформной активности в ЭЭГ в зависимости от стадии сна. Представляется целесообразным не только учитывать абсолютное количество разрядов в той или иной стадии, но и соотносить их с общей продолжительностью стадий за время сна. Так, в норме наибольшее общее время приходится на 2-ю стадию, поэтому неудивительно, что может создаваться ошибочное впечатление о большей вероятности регистрации разрядов во второй стадии.

Индексы эпилептиформной активности описаны как при генерализованных, так и при фокальных формах эпилепсии [4–8]. Опубликованные работы по фокальным разрядам различаются количеством пациентов, локализацией разрядов, методами подсчета индексов эпилептиформной активности. В значительной части исследований разряды подсчитывали выборочно — на фрагментах стадий сна и бодрствования, от 5 до 20 мин в каждой стадии. Как локализация очага, так и методы расчета индекса разрядов могут оказывать влияние на результаты [4–8].

Височная локализация очага — наиболее частая, и, по некоторым данным, составляет около 2/3 от общего количества случаев локализационно-обусловленной эпилепсии [9]. Целью исследования было изучить влияние различных стадий сна на интериктальную эпилептиформную активность ЭЭГ на относительно однородной группе взрослых пациентов с височной эпилепсией с полным подсчетом разрядов на протяжении всей записи.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Из общего числа пациентов, которые прошли обследование в лаборатории видео-ЭЭГ мониторинга ФГБНУ НЦН в период с февраля 2018 г. по июнь 2019 г., из соображений стандартизации времени исследования были выбраны ночные видео-ЭЭГ мониторинги (НВЭМ) с включением вечернего и утреннего бодрствований длительностью 10–12 ч в количестве 709 исследований. Первоначально из этого числа отобрали 142 записи, в которых была зарегистрирована фокальная эпилептиформная активность у пациентов вне зависимости от длительности заболевания и приема противоэпилептических препаратов. Критерии включения: 1) наличие разрядов только височной локализации; 2) в случае повторных обращений пациентов для анализа использовали запись, выполненную при первом визите; 3) наличие регистрации всех стадий сна; 4) все разряды отмечены врачом вручную, без использования алгоритма автоматической детекции разрядов; 5) общее количество разрядов не менее 10. Критерии исключения: 1) записи с зарегистрированными эпилептическими приступами; 2) с количеством разрядов более 500. Записи с приступами исключали в связи с их потенциальным влиянием на индекс эпилептиформной активности. Записи с очень большим количеством разрядов (более 500) исключали, поскольку ручная маркировка эпилептиформной активности в таких случаях затруднительна. Окончательное количество пациентов, записи ЭЭГ которых соответствовали критериям и вошли в анализ, составило 32, из них 17 женщин и 15 мужчин, в возрасте от 19–79 лет (медиана — 41 год).

Запись ЭЭГ производили скальповыми электродами по международной системе 10–20 и электрокардиографическим

(ЭКГ) каналом, в 11 из 32 записей использовали дополнительные электроды «скуловой дуги» (F9, F10, T9, T10, P9, P10). Для регистрации ЭЭГ использовали электроэнцефалографы моделей NicOne (Natus; США) и BePlus LTM (EBNeuro; Италия). Исследование начинали в 20:00–21:00 и завершали в 7:00–8:00 ч. В начале записи проводили пробы с ритмической фотостимуляцией и 5-минутной гипервентиляцией, которые повторяли после утреннего пробуждения. Эпилептиформную активность определяли в соответствии с пересмотренным глоссарием рекомендованных терминов ЭЭГ от 2017 г. [10]. Количество разрядов на данной выборке пациентов зарегистрировали в диапазоне от 13 до 401 за время записи (медиана — 72 разряда за ночь). У 27 пациентов (84%) разряды регистрировались только с одной стороны, у 5 пациентов — битемпорально. Количество пациентов с локализацией (или преобладанием) разрядов в левой височной области (17) было сопоставимо с количеством пациентов с исключительно или преимущественно правосторонней локализацией (15).

Стадирование сна и бодрствования осуществляли на 30-секундных эпохах в соответствии с рекомендациями Американской ассоциации медицины сна [11]. Поскольку при записи не использовали электроокулографические (ЭОГ) каналы и электромиографические (ЭМГ) каналы мышц подбородка, стадирование REM-сна осуществляли косвенно на основании глазодвигательных артефактов в лобных отделах и миографических артефактов в каналах ЭЭГ, а также наличия ЭЭГ-потенциалов, характерных для REM-сна [11]. В данной публикации использованы традиционные обозначения для стадий сна и бодрствования: Wake — бодрствование, N1 — первая стадия сна, N2 — вторая стадия сна, N3 — третья стадия сна (медленноволновой сон), REM — REM-сон. На рис. 1 представлен пример гипнограммы с отметками разрядов.

Для каждого из исследований после построения гипнограммы и разметки разрядов вначале проводили расчет следующих показателей: 1) общего индекса эпилептиформной активности, определяемого как отношение общего числа разрядов ко всей длительности записи в часах; 2) индексов эпилептиформной активности для бодрствования и каждой стадии сна (N1, N2, N3, REM), определяемых как отношение числа разрядов в стадии ко всему времени стадии за время записи в часах. В случае битемпоральных разрядов рассчитывали объединенный средний индекс разрядов с обеих сторон. Был отмечен довольно большой разброс полученных абсолютных значений (индексов). Поскольку в данном исследовании нас интересовали прежде всего тренды индексов в зависимости от стадии, проводили дополнительную нормализацию: рассчитывали относительный индекс каждой стадии (отношение индекса разрядов каждой стадии к общему индексу разрядов). В дальнейшем тексте под индексом разрядов, если не указано иное, следует понимать именно относительные индексы эпилептиформной активности для бодрствования и каждой стадии сна.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы STATISTICA 12.6 (Statsoft, Dell Software; США). Нормальность распределения признаков проверяли методом Шапиро–Уилка, использовали методы непараметрической статистики: Манна–Уитни для независимых выборок и критерий Уилкоксона для зависимых выборок. Корреляцию рассчитывали по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В стадии бодрствования разряды встречались в 18 случаях из 32 (56%), в стадии N1 у 16 (50%), в N2 — у 31 из 32 (97%), в стадии N3 — у всех 32 (100%), в REM-фазу — у 9 пациентов (28%) (табл. 1). Отмечены различные сочетания стадий сна, в которых была зарегистрирована эпилептиформная активность (рис. 2). Не было ни одного пациента, у которого разряды регистрировали исключительно в бодрствовании, N1, N2 или REM; в одном случае разряды были зарегистрированы исключительно в стадии N3.

Были подсчитаны стадии с максимальным количеством индекса разрядов за исследование. Наибольшее количество — 28 (87,5%) записей пришлось на стадию дельта-сна N3, в 2 случаях при бодрствовании, у 1 — в N2, еще у 1 — в REM, ни у одного пациента в нашей выборке не было максимума в стадии N1.

Данные относительных индексов в бодрствовании и по всем стадиям сна с трендами по всем пациентам представлены на рис. 3. Были получены следующие групповые значения по стадиям (медиана): 0,03 — при бодрствовании, 0,11 — в стадии N1, 0,19 — в стадии N2, 3,92 — в N3 и 0,19 — в фазу REM-сна (табл. 1, рис. 4). Статистический анализ (парный критерий Уилкоксона) показал, что по сравнению с бодрствованием индекс разрядов в NREM-сне достоверно выше: $p < 0,05$ для стадии N1 и $p < 0,01$ для стадий N2 и N3, разница с фазой REM незначима. Значения индекса в N2 выше, чем в N1 и REM ($p < 0,01$). Относительный индекс в стадии N3 достоверно превышает значения во всех остальных стадиях ($p < 0,01$). Индекс в REM-фазе достоверно уступает всем стадиям NREM-сна и, как указано ранее в тексте, слабо отличается от индекса в бодрствовании.

Вся выборка была разделена на 2 группы: с низким (от 14, минимального в выборке количества разрядов за исследование, до 75) и относительно высоким (от 75 до максимального в выборке значения, равного 401) количеством разрядов. Разница в индексах разрядов

между группами с низким и высоким количеством разрядов была статистически недостоверной.

Проведен корреляционный анализ между показателями абсолютных индексов разрядов при бодрствовании и в различных стадиях сна между собой. Обнаружена статистически значимая корреляция между следующими парами: положительные корреляции индекса в бодрствовании с индексом в N1 и REM, N1 с N2, а также N2 с N3.

Достоверной разницы индексов эпилептиформной активности в бодрствовании и во сне между левой и правой стороной височных разрядов не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам нашего исследования, индексы в стадии дельта-сна значительно превышают таковые в остальных стадиях сна и бодрствовании. Максимальная представленность разрядов в фазу медленноволнового сна показана в предыдущих работах, в которых индекс эпилептиформной активности анализировали по отдельным стадиям сна [6–8, 12–14]. В нашем исследовании среди пациентов с фокальными разрядами не было ни одного, у кого разряды не регистрировались бы в стадии N3, при этом вероятность их регистрации превышала в среднем в 3 раза таковую в стадии N2. Еще большая разница проявляется при сопоставлении стадий с максимальным количеством разрядов, где количество записей с максимумом разрядов в N3 составило 87,5%. При анализе численных значений (табл.) и графика трендов индексов (рис. 3) отмечали всплеск в стадии N3, а также схожую динамику индекса разрядов в стадии N2, значительно уступающего численно N3 и превышающего значения в бодрствовании, стадии N1 и фазе REM-сна. Достоверное различие индексов эпилептиформной активности в стадиях N1 и N2 у пациентов с фокальной эпилептиформной активностью было показано нами впервые. Вероятно, отсутствие достоверных различий между этими стадиями в предыдущих исследованиях можно связать с применявшейся в данных работах

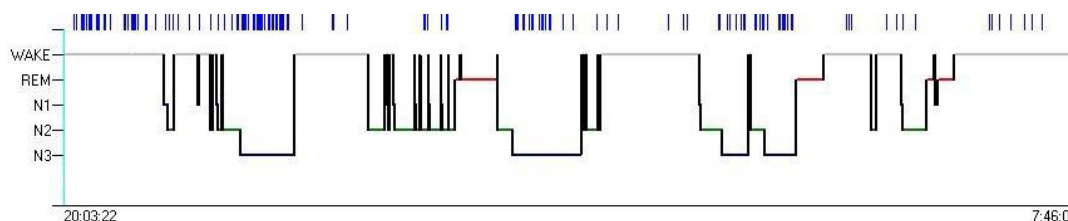


Рис. 1. Пример гипнограммы с разметкой разрядов. На оси абсцисс отложено астрономическое время. Вертикальные линии над гипнограммой — отметки о разрядах эпилептиформной активности. Wake — бодрствование, N1 — первая стадия сна, N2 — вторая стадия сна, N3 — третья стадия сна (медленноволновой сон), REM — REM-сон

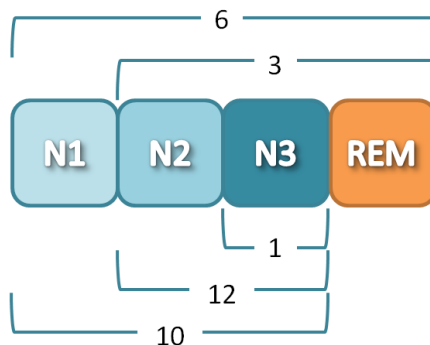


Рис. 2. Зарегистрированные комбинации встречаемости эпилептиформной активности в различных стадиях сна. Фигурными скобками выделены характерные сочетания стадий сна, в которых была зарегистрирована эпилептиформная активность. Значение над фигурной скобкой — число пациентов с данным распределением разрядов

Таблица. Количество записей с разрядами и средние значения индексов эпилептиформной активности по стадиям сна и бодрствования, нормированные в отношении общего индекса разрядов за исследование

Стадия	Wake	N1	N2	N3	REM
Количество пациентов с разрядами/без разрядов в данной стадии	18/14	16/16	31/1	32/0	9/23
Количество пациентов с максимальным числом разрядов в указанной стадии	2	0	1	28	1
Относительный индекс разрядов, медиана [нижний; верхний квартиль]	0,03 [0; 0,23]	0,11 [0; 0,89]	1,19 [0,64; 1,64]	3,92 [2,74; 6,64]	0,19 [0; 0,06]

выборочной разметкой эпилептиформной активности [8, 15, 16].

Таким образом, выявлено возрастание индекса эпилептиформной активности по мере увеличения глубины сна от REM-фазы к стадии N1, N2 и N3.

Рассмотрим вероятный физиологический механизм, объясняющий найденные закономерности изменения индекса разрядов. Известно, что для регистрации потенциалов в скальповой ЭЭГ необходима синхронная активность достаточно большого количества корковых нейронов. По экспериментальным данным, площадь таких синхронно работающих нейронов должна составлять не менее 6–8 см². Медленная активность, в первую очередь дельта-диапазона, является отражением большой степени синхронизации корковых нейронов. Критерием стадии N3 является наличие не менее 20% высокоамплитудных дельта-колебаний в эпохе. Однако при тщательном анализе можно видеть, что постепенное нарастание медленной активности отмечается уже во второй стадии.

Помимо ритмической медленноволновой активности, не достигающей, однако, критериев 3-й стадии, в N2 регистрируются К-комплексы, являющиеся ее важнейшим критерием и фактически представляющие собой отдельные высокоамплитудные относительно медленные одиночные потенциалы, в которые нередко встраиваются разряды. Это так называемые эпилептизированные К-комплексы, которые регистрируются как при генерализованных, так и при фокальных эпилепсиях [17–18]. Более того, имеются данные, указывающие на возможную связь приступов при ночной лобной эпилепсии с К-комплексами [19]. Таким образом, можно рассматривать высокую вероятность регистрации разрядов в NREM-сне как следствие нарастания синхронизации работы нейронных сетей, что также подтверждают работы, в которых проводили прямую корреляцию частоты разрядов с мощностью дельта-колебаний [20].

Несмотря на то что сон в целом является сильнейшим активатором эпилептиформной активности, в REM-фазе

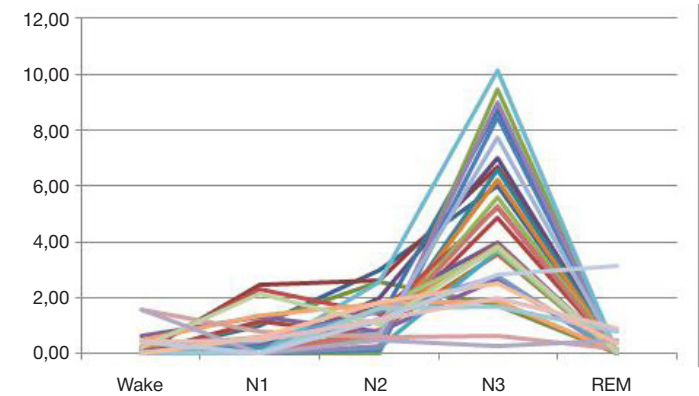


Рис. 3. Тренды индивидуальных индексов эпилептиформной активности при бодрствовании и по стадиям сна у всех пациентов с височной локализацией эпилептиформной активности

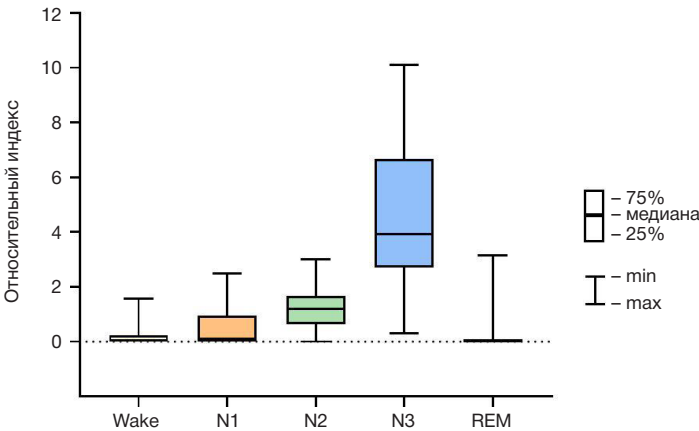


Рис. 4. Значения относительного индекса эпилептиформной активности по стадиям сна и бодрствования у всех пациентов с височной локализацией эпилептиформной активности

представленность разрядов была наиболее низкой, сопоставимой с таковой при бодрствовании. Наши данные согласуются с предыдущими работами, в которых исследовали влияние REM-сна на эпилептиформную активность [8, 14, 21–22]. Во всех исследованиях индекс в REM-фазу был наименьшим во сне. Если сравнивать с бодрствованием, то в большинстве работ индекс разрядов при бодрствовании был несколько выше. Не являясь активатором эпилептиформной активности, REM-сон, однако, привлекает особое внимание в двух аспектах. Во-первых, если разряды в REM все-таки регистрируются, они носят более фокальный характер и имеют, таким образом, более высокое локализационное значение, чем другие стадии сна [23–24]. Во-вторых, REM, являясь неотъемлемой частью структуры здорового сна, не просто не потенцирует разряды, но и снижает их вероятность. Таким образом, функционирование нейронных сетей в REM носит в какой-то степени протективный характер, снижая вероятность не только разрядов, но и приступов [3].

Следует отметить, что на результаты нашего исследования могли повлиять критерии включения пациентов, в частности, мы сознательно исключили пациентов с очень большим количеством разрядов, которые практически невозможно подсчитать вручную. В некоторых предыдущих исследованиях [15, 8, 14, 25] применяли выборочный метод подсчета разрядов, основанный на регистрации разрядов на фрагментах стадий (5–20 мин, 1 ч) с экстраполяцией на все исследование. Мы также применяем выборочную разметку у пациентов с большим количеством разрядов, однако решили не включать эти записи в настоящее исследование, предполагая, что они могут потенциально сказаться на результатах. Кроме того, поскольку мы не использовали ЭМГ-регистрацию (*m. mentalis*), это могло привести к некоторой недооценке продолжительности REM-сна. Значения индексов, которые мы получили для бодрствования, могли также оказаться несколько завышенными, поскольку в бодрствование вошли и 5-минутные пробы с гипервентиляцией, которая, снижая мозговой кровоток, увеличивает степень синхронизации

нейронов и является потенциальным активатором эпилептиформной активности. Однако NREM является существенно более сильным активатором эпилептиформной активности, чем гипервентиляция [15]. В данной работе не оценивали также возможное влияние противозепептической терапии, времени от дебюта приступов, частоты приступов, их семиологии, наличия фармакорезистентного течения и структурной патологии на МРТ.

С практической точки зрения результаты нашего исследования подчеркивают необходимость регистрации медленноволнового сна в диагностических исследованиях у пациентов с подозрением на фокальную форму эпилепсии. Короткие записи, в частности рутинная ЭЭГ бодрствования, продолжительность которой не превышает 20 мин, недостаточно чувствительны в диагностике эпилепсии, прежде всего ее фокальных форм, что может приводить к задержке в постановке точного диагноза и назначения соответствующего лечения в связи с отсутствием на таких записях достаточной глубины сна.

ВЫВОДЫ

Результаты настоящего исследования на группе пациентов с височной локализацией эпилептиформной активности показывают возрастание индекса фокальных разрядов по мере увеличения глубины NREM-сна от первой к третьей стадии. В фазе REM-сна индекс значительно снижается до уровня, сопоставимого с бодрствованием. Наиболее вероятным механизмом достоверного преобладания разрядов в стадии медленноволнового сна представляется синхронизация работы корковых нейронов. Отсутствие стадии N3, в которой представленность эпилептиформной активности максимальна, или недостаточная продолжительность этой стадии значительно снижают вероятность регистрации эпилептиформной активности, что в случае недостаточно убедительных клинических проявлений может приводить к ошибочным выводам, задержке в постановке правильного диагноза и начала терапии.

Литература

1. Minecan D, Natarajan A, Marzec M, Malow B. Relationship of epileptic seizures to sleep stage and sleep depth. *Sleep*. 2002; 25 (8): 899–904.
2. Bazil CW. Seizure modulation by sleep and sleep state. *Brain Res*. 2019; (1703): 13–17.
3. Ng M, Pavlova M. Why are seizures rare in rapid eye movement sleep? Review of the frequency of seizures in different sleep stages. *Epilepsy Res Treat*. 2013; (2013): 932790.
4. Kellaway P, Frost JD, Crawley JW. Time modulation of spike-and-wave activity in generalized epilepsy. *Ann Neurol*. 1980; 8 (5): 491–500.
5. Halász P, Terzano MG, Parrino L. Spike-wave discharge and the microstructure of sleep-wake continuum in idiopathic generalised epilepsy. *Neurophysiol Clin*. 2002; 32 (1): 38–53.
6. Lieb JP, Joseph JP, Engel J, Walker J, Crandall PH. Sleep state and seizure foci related to depth spike activity in patients with temporal lobe epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1980; 49 (5–6): 538–57.
7. Sammaritano M, Gigli GL, Gotman J. Interictal spiking during wakefulness and sleep and the localization of foci in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1991; 41 (2 Pt 1): 290–7.
8. Clemens Z, Janszky J, Clemens B, Szucs A, Halász P. Factors affecting spiking related to sleep and wake states in temporal lobe epilepsy (TLE). *Seizure*. 2005; 14 (1): 52–7.
9. Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*. 1998; 51 (5): 1256–62.
10. Kane N, Acharya J, Benickzy S, Caboclo L, Finnigan S, Kaplan PW, et al. A revised glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers and updated proposal for the report format of the EEG findings. Revision 2017. *Clin Neurophysiol Pract*. 2017; (2): 170–85.
11. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL, et al. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.2. www.aasmnet.org. Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2015.
12. Malow BA, Kushwaha R, Lin X, Morton KJ, Aldrich MS. Relationship of interictal epileptiform discharges to sleep depth in partial epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1997; 102 (1): 20–6.
13. Clemens Z, Janszky J, Szucs A, Békésy M, Clemens B, Halász P. Interictal epileptic spiking during sleep and wakefulness in mesial temporal lobe epilepsy: a comparative study of scalp and foramen ovale electrodes. *Epilepsia*. 2003; 44 (2): 186–92.
14. Singh S, Shukla G, Goyal V, Srivastava AK, Singh MB, Vibha D, et al. Impact of sleep on the localizing value of video EEG in patients

- with refractory focal seizures — a prospective video-EEG with EOG and submental EMG study. *Clin Neurophysiol.* 2014; 125 (12): 2337–43.
15. Klein KM, Knake S, Hamer HM, Ziegler A, Oertel WH, Rosenow F. Sleep but not hyperventilation increases the sensitivity of the EEG in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2003; 56 (1): 43–9.
 16. Yu YL, Yan YL, Tian SF, Feng ZH, Shi MT. Circadian rhythm of interictal epileptiform discharges and changes of spindles in patients with temporal lobe epilepsy. *Biomed Res.* 2018; 29 (6): 1263–7.
 17. Geyer JD, Carney PR, Gilliam F. Focal epileptiform spikes in conjunction with K-complexes. *J Clin Neurophysiol.* 2006; 23 (5): 437–40.
 18. Niedermeyer E. Epileptiform K complexes. *Am J Electroneurodiagnostic Technol.* 2008; 48 (1): 48–51.
 19. ElHelou J, Navarro V, Depienne C, Fedirko E, LeGuern E, Baulac M, et al. K-complex-induced seizures in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119 (10): 2201–4.
 20. Ferrillo F, Beelke M, DeCarli F, Cossu M, Munari C, Rosadini G, et al. Sleep-EEG modulation of interictal epileptiform discharges in adult partial epilepsy: a spectral analysis study. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111 (5): 916–23.
 21. Malow BA, Lin X, Kushwaha R, Aldrich MS. Interictal spiking increases with sleep depth in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 1998; 39 (12): 1309–16.
 22. Campana C, Zubler F, Gibbs S, deCarli F, Proserpio P, Rubino A1, et al. Suppression of interictal spikes during phasic rapid eye movement sleep: a quantitative stereo-electroencephalography study. *J Sleep Res.* 2017; 26 (5): 606–13.
 23. Malow BA, Aldrich MS. Localizing value of rapid eye movement sleep in temporal lobe epilepsy. *Sleep Med.* 2000; 1 (1): 57–60.
 24. Ochi A, Hung R, Weiss S, Widjaja E, To T, Nawa Y, et al. Lateralized interictal epileptiform discharges during rapid eye movement sleep correlate with epileptogenic hemisphere in children with intractable epilepsy secondary to tuberous sclerosis complex. *Epilepsia.* 2011; 52 (11): 1986–94.
 25. Scarlatelli-Lima AV, Sukys-Claudino L, Watanabe N, Guarnieri R, Walz R, Lin K. How do people with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy sleep? A clinical and video-EEG with EOG and submental EMG for sleep staging study. *eNeurologicalSci.* 2016; (4): 34–41.

References

1. Minecan D, Natarajan A, Marzec M, Malow B. Relationship of epileptic seizures to sleep stage and sleep depth. *Sleep.* 2002; 25 (8): 899–904.
2. Bazil CW. Seizure modulation by sleep and sleep state. *Brain Res.* 2019; (1703): 13–17.
3. Ng M, Pavlova M. Why are seizures rare in rapid eye movement sleep? Review of the frequency of seizures in different sleep stages. *Epilepsy Res Treat.* 2013; (2013): 932790.
4. Kellaway P, Frost JD, Crawley JW. Time modulation of spike-and-wave activity in generalized epilepsy. *Ann Neurol.* 1980; 8 (5): 491–500.
5. Halász P, Terzano MG, Parrino L. Spike-wave discharge and the microstructure of sleep-wake continuum in idiopathic generalised epilepsy. *Neurophysiol Clin.* 2002; 32 (1): 38–53.
6. Lieb JP, Joseph JP, Engel J, Walker J, Crandall PH. Sleep state and seizure foci related to depth spike activity in patients with temporal lobe epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1980; 49 (5–6): 538–57.
7. Sammaritano M, Gigli GL, Gotman J. Interictal spiking during wakefulness and sleep and the localization of foci in temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 1991; 41 (2 (Pt 1): 290–7.
8. Clemens Z, Janszky J, Clemens B, Szucs A, Halász P. Factors affecting spiking related to sleep and wake states in temporal lobe epilepsy (TLE). *Seizure.* 2005; 14 (1): 52–7.
9. Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology.* 1998; 51 (5): 1256–62.
10. Kane N, Acharya J, Benickzy S, Caboclo L, Finnigan S, Kaplan PW, et al. A revised glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers and updated proposal for the report format of the EEG findings. Revision 2017. *Clin Neurophysiol Pract.* 2017; (2): 170–85.
11. Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Lloyd RM, Marcus CL, et al. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications, Version 2.2. www.aasmnet.org. Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2015.
12. Malow BA, Kushwaha R, Lin X, Morton KJ, Aldrich MS. Relationship of interictal epileptiform discharges to sleep depth in partial epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1997; 102 (1): 20–6.
13. Clemens Z, Janszky J, Szucs A, Békésy M, Clemens B, Halász P. Interictal epileptic spiking during sleep and wakefulness in mesial temporal lobe epilepsy: a comparative study of scalp and foramen ovale electrodes. *Epilepsia.* 2003; 44 (2): 186–92.
14. Singh S, Shukla G, Goyal V, Srivastava AK, Singh MB, Vibha D, et al. Impact of sleep on the localizing value of video EEG in patients with refractory focal seizures — a prospective video-EEG with EOG and submental EMG study. *Clin Neurophysiol.* 2014; 125 (12): 2337–43.
15. Klein KM, Knake S, Hamer HM, Ziegler A, Oertel WH, Rosenow F. Sleep but not hyperventilation increases the sensitivity of the EEG in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2003; 56 (1): 43–9.
16. Yu YL, Yan YL, Tian SF, Feng ZH, Shi MT. Circadian rhythm of interictal epileptiform discharges and changes of spindles in patients with temporal lobe epilepsy. *Biomed Res.* 2018; 29 (6): 1263–7.
17. Geyer JD, Carney PR, Gilliam F. Focal epileptiform spikes in conjunction with K-complexes. *J Clin Neurophysiol.* 2006; 23 (5): 437–40.
18. Niedermeyer E. Epileptiform K complexes. *Am J Electroneurodiagnostic Technol.* 2008; 48 (1): 48–51.
19. ElHelou J, Navarro V, Depienne C, Fedirko E, LeGuern E, Baulac M, et al. K-complex-induced seizures in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 2008; 119 (10): 2201–4.
20. Ferrillo F, Beelke M, DeCarli F, Cossu M, Munari C, Rosadini G, et al. Sleep-EEG modulation of interictal epileptiform discharges in adult partial epilepsy: a spectral analysis study. *Clin Neurophysiol.* 2000; 111 (5): 916–23.
21. Malow BA, Lin X, Kushwaha R, Aldrich MS. Interictal spiking increases with sleep depth in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 1998; 39 (12): 1309–16.
22. Campana C, Zubler F, Gibbs S, deCarli F, Proserpio P, Rubino A1, et al. Suppression of interictal spikes during phasic rapid eye movement sleep: a quantitative stereo-electroencephalography study. *J Sleep Res.* 2017; 26 (5): 606–13.
23. Malow BA, Aldrich MS. Localizing value of rapid eye movement sleep in temporal lobe epilepsy. *Sleep Med.* 2000; 1 (1): 57–60.
24. Ochi A, Hung R, Weiss S, Widjaja E, To T, Nawa Y, et al. Lateralized interictal epileptiform discharges during rapid eye movement sleep correlate with epileptogenic hemisphere in children with intractable epilepsy secondary to tuberous sclerosis complex. *Epilepsia.* 2011; 52 (11): 1986–94.
25. Scarlatelli-Lima AV, Sukys-Claudino L, Watanabe N, Guarnieri R, Walz R, Lin K. How do people with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy sleep? A clinical and video-EEG with EOG and submental EMG for sleep staging study. *eNeurologicalSci.* 2016; (4): 34–41.

ТЕХНОЛОГИЯ ИНТЕРФЕЙСА МОЗГ–КОМПЬЮТЕР КАК КОНТРОЛИРУЕМЫЙ ИДЕОМОТОРНЫЙ ТРЕНИНГ В РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ИНСУЛЬТА

Ю. В. Бушкова¹✉, Г. Е. Иванова¹, Л. В. Стаховская², А. А. Фролов³

¹ Федеральный центр цереброваскулярной патологии и инсульта, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

³ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия

Восстановление функции руки у пациентов после инсульта является приоритетным направлением в нейрореабилитации. Развитие технологии интерфейса мозг–компьютер–экзоскелет кисти (ИМКЭ) качественно улучшило реабилитацию в этом направлении. Целью данного исследования было изучить факторы, влияющие на двигательное восстановление верхней конечности у пациентов после инсульта на фоне применения технологии ИМКЭ. Исследовали 24 пациента (14 мужчин, 10 женщин) в возрасте от 51 до 62 лет с единичным очагом инсультной этиологии, супратенториальной локализации. В 11 (45,6%) случаях левополушарное поражение, в 13 (54,4%) случаях — правополушарное. Давность инсульта — 4,0 (3,0; 12,0) месяца. Медиана MoCA — 25,0 (23,0; 27,0). Курс занятий ИМКЭ включал 9,5 (8,0; 10,0) процедур. Выявлена значимая умеренная корреляция между успешностью моторного представления (MIQ-RS) и эффективностью взаимодействия пациентов с ИМКЭ кисти. Пациенты с высокими показателями MIQ-RS 47,5 (32,0; 54,0) достоверно лучше взаимодействовали с ИМКЭ 63,0 (54,0; 67,0), $R = 0,67$ ($p < 0,05$). У пациентов с высокими показателями MIQ-RS динамика двигательного восстановления была более выраженной: медиана Δ Fugl-Meyer Assessment (FMA) составила 14 (8,0; 16,0) баллов против группы пациентов с низкими показателями MIQ-RS, Δ FMA — 10 (6,0; 13,0), но при этом не достигла статистически значимого уровня. Таким образом, выявлена взаимосвязь между способностью пациентов к моторному представлению (MIQ-RS) и эффективностью взаимодействия пациентов с ИМКЭ. Для выявления влияния этих факторов на динамику двигательного восстановления руки, вероятно, требуется продолжить исследование с большей выборкой.

Ключевые слова: инсульт, нейрореабилитация, интерфейс мозг–компьютер, идеомоторная тренировка

Финансирование: исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-29-08247 офи_m).

Информация о вкладе авторов: Ю. В. Бушкова — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Г. Е. Иванова — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи; Л. В. Стаховская — планирование исследования, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Фролов — подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 12/14 от 10 декабря 2014 г.). Протокол исследования iMove зарегистрирован в международном реестре клинических исследований Национального института здоровья США Clinical Trials.gov (identifier: NCT02325947). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Владимировна Бушкова
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, г. Москва, 117342; Juljabush777@gmail.com

Статья получена: 12.11.2019 **Статья принята к печати:** 24.11.2019 **Опубликована онлайн:** 07.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.078

BRAIN-COMPUTER-INTERFACE TECHNOLOGY WITH MULTISENSORY FEEDBACK FOR CONTROLLED IDEOMOTOR TRAINING IN THE REHABILITATION OF STROKE PATIENTS

Bushkova YuV¹✉, Ivanova GE¹, Stakhovskaya LV², Frolov AA³

¹ Research Center of Cerebrovascular Pathology and Stroke, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Motor recovery of the upper limb is a priority in the neurorehabilitation of stroke patients. Advances in the brain-computer interface (BCI) technology have significantly improved the quality of rehabilitation. The aim of this study was to explore the factors affecting the recovery of the upper limb in stroke patients undergoing BCI-based rehabilitation with the robotic hand. The study recruited 24 patients (14 men and 10 women) aged 51 to 62 years with a solitary supratentorial stroke lesion. The lesion was left-hemispheric in 11 (45.6%) patients and right-hemispheric in 13 (54.4%) patients. Time elapsed from stroke was 4.0 months (3.0; 12.0). The median MoCa score was 25.0 (23.0; 27.0). The rehabilitation course consisted of 9.5 sessions (8.0; 10.0). We established a significant moderate correlation between motor imagery performance (the MIQ-RS score) and the efficacy of patient-BCI interaction. Patients with high MIQ-RS scores (47.5 (32.0; 54.0) achieved a better control of the BCI-driven hand exoskeleton (63.0 (54.0; 67.0), $R = 0.67$; $p < 0.05$). Recovery dynamics were more pronounced in patients with high MIQ-RS scores: the median score on the Fugl-Meyer Assessment scale was 14 (8.0; 16.0) points vs 10 (6.0; 13.0) points in patients with low MIQ-RS scores. However, the difference was not significant. Thus, we established a correlation between a patient's ability for motor imagery (MIQ-RS) and the efficacy of patient-BCI interaction. A larger patient sample might be necessary to assess the effect of these factors on motor recovery dynamics.

Keywords: stroke, neurorehabilitation, brain-computer interface, ideomotor training

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant ID 16-29-08247 ofi_m).

Author contribution: Bushkova YuV — study planning; literature analysis; data acquisition, analysis and interpretation; manuscript preparation; Ivanova GE — study planning; literature analysis; data interpretation; manuscript preparation; Stakhovskaya LV — study planning; data interpretation; manuscript preparation; Frolov AA — manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (Protocol № 12/14 dated December 10, 2014). The iMove study has been registered on Clinical Trials.gov (identifier: NCT02325947). All patients gave informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuliya V. Bushkova
Ostrovityanova, 1, str. 10, Moscow, 117342; Juljabush777@gmail.com

Received: 12.11.2019 **Accepted:** 24.11.2019 **Published online:** 07.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.078

Инсульт является одной из основных причин, определяющих длительную инвалидизацию пациентов во всем мире. Двигательный и когнитивный дефицит, возникающий вследствие инсульта, отрицательно влияет на мобильность пациентов, значительно ограничивает возможности в повседневной бытовой деятельности, тем самым ухудшая их социальную интеграцию и снижая вероятность возврата к профессиональной деятельности [1, 2].

Нейрореабилитация (НР), основанная на принципах системности, последовательности, специфичности, адекватности реабилитационного пособия, значимо уменьшает проявления неврологического дефицита, возникшего вследствие инсульта у данной категории больных.

В основе НР лежит системная организация мозговых функций, которая определяет резервные возможности головного мозга в условиях патологического процесса. В процессе двигательного переобучения пациента происходит реорганизация его мозговых функций, что в итоге приводит к восстановлению или компенсации нарушенных функций. Главной целью НР является достижение истинного восстановления. Такой подход представляется наиболее правильным и заключается в том, что функции организма полностью возвращаются или максимально приближаются к исходному состоянию. Восстановление утраченных функций большей частью происходит за счет перестройки сохранных функциональных систем. Этот процесс обеспечивают пластичность нервной системы и анатомические связи между ее отделами.

Реабилитация неврологических пациентов в настоящее время располагает большим количеством методик, которые направлены на активацию пластических процессов в нейронных сетях, замещающих или компенсирующих утраченную функцию. Однако в большом числе клинических случаев восстановление утраченных функций происходит в ограниченном объеме. Развитие методики активации моторной коры, специфичной конкретному движению, а именно технологии интерфейса мозг–компьютер–экзоскелет кисти (ИМКЭ кисти), качественно улучшило реабилитацию в этом направлении [3, 4].

ИМКЭ кисти — это устройство, использующее нейрофизиологическую активность мозга для прямого управляющего воздействия на внешние приборы без включения типичных нейромышечных путей [5]. В основе реабилитационного тренажера ИМКЭ кисти с визуальной и кинестетической обратной связью лежит способность пациентов генерировать различные ЭЭГ-сигналы (в нашем случае μ -ритм (мю-ритм) на ЭЭГ в двигательных зонах мозга), что позволяет «соединять мозг» с внешними устройствами без участия нейромышечных путей. Реабилитационный тренажер ИМКЭ использует ментальные двигательные представления (МДП) выполнения активных движений, которые, по данным функциональной нейровизуализации, активизируют двигательные зоны коры головного мозга [6], за исключением случаев, когда инсульт нарушает способность мозга формировать МДП [7].

Известно, что многократное мысленное повторение, называемое идеомоторной тренировкой (ИТ), способствует не только формированию двигательного навыка в нормальных физиологических условиях, но и восстановлению нарушенного или утраченного в условиях патологии центральной нервной системы. Идеомоторное упражнение — это выполнение человеком того или иного активного двигательного действия мысленно (по представлению), так называемая мысленная тренировка.

Пациенту дают инструкцию представить выполнение определенного движения (например, вытянуть руку, раскрыть кисть, сжать кисть в кулак, взять со стола чашку и т. п.) от первого или третьего лица. Если заданное мысленное действие выполняется от *первого лица*, то с большой долей вероятности пациент выполняет его кинестетически. Если пациент выполняет идеомоторное действие от *третьего лица*, то такой способ выполнения соответствует визуальному [8]. Кинестетический способ решения ментальной задачи пациентами более прочно ассоциируется со способностью успешно взаимодействовать с реабилитационными нейрокомпьютерными интерфейсами по сравнению с визуальным вариантом решения ментальной задачи [9].

Существует несколько основных гипотез относительно механизма действия мысленных тренировок. Так называемая нервно-мышечная теория [10] основана на предположении, что мысленная тренировка вызывает подпороговую активацию мышц, участвующих в мысленном движении, и приводит к закреплению двигательной программы. Согласно второй теории, представление движений способствует возникновению специфических нейрофизиологических паттернов, аналогичных тем, которые происходят при условии выполнения реального движения, в проекции двигательных областей коры. Исследования с применением функциональной МРТ (fMRI) говорят о реорганизации двигательной системы в обоих полушариях головного мозга на фоне тренировок представления движения [6, 11].

Режим дозирования идеомоторных тренировок, по данным рандомизированных клинических исследований, достаточно вариателен. Статистически значимый эффект (по двигательным шкалам FMA и ARAT) был показан при занятиях по 30 мин 2 раза в неделю в течение 6 недель [12]. При этом для ментальных тренировок были выбраны функционально значимые движения вроде достижения и захвата объекта, использования письменных принадлежностей и т. п.

Однако использование ИТ для восстановления нарушенных движений у взрослых пациентов после мозговой катастрофы дает противоречивые результаты [13]. Нарушения элементов контроля двигательной системы мозга негативно сказываются как на возможности выполнять движения, так и на способности к их представлению. Виной тому могут быть когнитивные нарушения, развивающиеся у больных вследствие инсульта [1, 14].

Перспективы применения у больных с повреждением головного мозга реабилитационных технологий, основанных на представлении движения, дают обнадеживающие результаты [12]. ИТ рассматривают в виде дополнительного метода в составе комплексной реабилитационной терапии. Сочетание идеомоторного тренинга с базовой лечебной физкультурой, соответствующей неврологическому дефициту, лежит в основе целеориентированной терапии (англ. *repetitive taskspecific practice*, RTP). Ранее было показано, что эффект тренировок с представлением движений на нейронную пластичность развивается и сохраняется в долгосрочной перспективе, например, при систематическом многодневном графике мысленных тренировок [15].

Представление движения субъективно, в связи с этим имеются сложности по объективизации этого процесса. Разные исследователи предлагали идеи использования реакции десинхронизации сенсомоторных ритмов ЭЭГ, возникающих на фоне представления движения [4, 16]. Десинхронизация сенсомоторных ритмов ЭЭГ

действительно позволяет детектировать мысленное представление движения, однако специфичность такой реакции остается не до конца изученной.

В литературе было уделено внимание необходимости оценки индивидуальной способности к представлению движений [17]. Они описали тест анкетного типа — MIQ (англ. *movement imagery questionnaire*), который впоследствии был доработан для применения на клинической популяции. Тесты MIQ, MIQ-R в основном применяют у спортсменов, а опросники MIQ-RS у людей, испытывающих затруднения в выполнении движений.

Реабилитационную технологию ИМКЭ кисти с мультисенсорной обратной связью (визуальной и кинестетической) можно обозначить как контролируемый идеомоторный тренинг. В основе ИТ, контролируемой посредством ИМКЭ кисти, лежит усиление афферентной стимуляции с верхней конечности посредством механической работы экзоскелета, *только* в ответ на успешное решение пациентом предъявленной ему ментальной задачи.

Таким образом, одной из важнейших проблем при изучении представления движений является определение способности пациента к реализации ментальной двигательной программы, так как именно это определяет эффективность взаимодействия пациента с данной реабилитационной технологией.

Целью нашего исследования было изучить факторы, влияющие на двигательное восстановление верхней конечности у пациентов после инсульта в раннем восстановительном периоде на фоне применения технологии ИМКЭ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в Научно-исследовательском институте цереброваскулярной патологии и инсульта РНИМУ им. Н. И. Пирогова на базе ГКБ 31 г. Москвы, неврологического отделения для больных с инсультом в период с сентября 2018 по апрель 2019 г.

Критерии включения пациентов в исследование: мужчины и женщины в возрасте 18–80 лет; наличие в головном мозге единичного очага инсультной этиологии подкорковой локализации давностью до двух лет; сохранность когнитивных функций, равная не менее 22 баллов по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA) [18]; двигательный дефицит в верхней конечности от 0 до 4 баллов по Британской шкале оценки мышечной силы (MRCMS) [19]; праворукость пациента по данным Эдинбургского опросника мануальной асимметрии [20].

Критерии исключения: давность инсульта более двух лет; леворукость по данным Эдинбургского опросника мануальной асимметрии; выраженное снижение когнитивных функций; сенсорная афазия; грубая моторная афазия; грубое нарушение зрения, не позволяющее выполнять визуально предъявляемые на экране компьютера инструкции; наличие мышечной контрактуры в руке, достигающей 4 баллов по модифицированной шкале Ashworth (mAS) [21].

В текущий анализ были включены данные 24 пациентов, из которых было 14 (58,3%) мужчин и 10 (41,7%) женщин. Медиана возраста составила 56,5 (51,0; 62,0) лет. Единичный очаг инсультной этиологии ишемического характера — у 20 (83,3%) пациентов и геморрагического характера — у 4 (16,7%) пациентов, супратенториальной локализации — у всех 24 (100%) пациентов (по данным

КТ, МРТ). Левополушарное поражение выявлено в 11 (45,6%) случаях, правополушарное — в 13 (54,4%) случаях. Давность инсульта — 4 (3,0; 12,0) месяца. Медиана MoCA составила 25,0 (23,0; 27,0) баллов, что соответствует наличию умеренного когнитивного дефицита. Часть пациентов, участвовавших в исследовании, получали терапию в условиях стационара ($n = 11$), остальные амбулаторно ($n = 13$). Курс занятий на тренажере включал 9,5 (8,0; 10,0) процедур.

В исследовании использовали ИМКЭ кисти с кинестетической и визуальной обратной связью («Экзокисть-2») (РНИМУ им. Н. И. Пирогова; Москва) (см. рис.).

ИМКЭ кисти основан на анализе паттернов ЭЭГ и распознавании реакции синхронизации/десинхронизации сенсомоторного μ -ритма при воображении движений рук. Сигналы ЭЭГ фильтровали в полосе частот 5–30 Гц. В исследовании применяли классификатор паттернов ЭЭГ, основанный на методе Байеса [22]. В качестве показателей точности классификации использовали индекс капла Коэна (при идеальном распознавании $\kappa = 1$, при случайном распознавании $\kappa = 0$ [23]) и процент правильных ответов классификатора (более 33% — распознавание выше случайного, так как пациенты выполняют по инструкции ментальные задачи).

Результаты распознавания ментальной задачи предъявляли пациенту по зрительной и кинестетической обратной связи: в случае успешного распознавания классификатором задачи, соответствующей предъявляемой инструкции, метка в середине экрана принимала зеленый цвет, а экзоскелет разгибал пальцы кисти. При распознавании других задач, цвет метки не менялся, а экзоскелет не срабатывал [4]. Таким образом, этот вид терапии можно назвать управляемой идеомоторной



Рис. Внешний вид ИМКЭ кисти с кинестетической и визуальной обратной связью («Экзокисть-2»)

тренировкой с использованием принципов многоканальной биологической обратной связи по зрительному, кинестетическому анализаторам и ЭЭГ.

Во время процедуры на голову пациента надевали шапочку с электродами для регистрации ЭЭГ, под каждый из которых был нанесен электродный гель. Кисти обеих рук фиксировали электромеханизированным экзоскелетом, предназначенным для разгибания пальцев кисти в физиологическом объеме. В процессе тренинга человек сидел в кресле перед компьютерным монитором. В центре темного экрана монитора находился круг, служащий для фиксации взгляда, вокруг него расположены три стрелки для обозначения инструкций изменяющимся цветом. Пациент выполнял одну из трех инструкций: расслабиться, кинестетически представить медленное разгибание пальцев кисти правой или левой руки. Инструкции на воображение разгибания пальцев правой или левой руки (изменение цвета стрелки справа или слева соответственно) предъявляли в случайном порядке в течение 10 с. Между инструкциями по воображению движения предъявляли инструкцию расслабиться (загоралась верхняя стрелка) тоже в течение 10 с. По инструкции «расслабиться» пациент должен спокойно сидеть и смотреть в центр экрана. Одна процедура содержала до трех вышеописанных сессий, каждая длительностью 10 мин. Между сессиями пациент отдыхал не менее 3 мин. С каждым пациентом занятия на тренажере ИМКЭ кисти проводили в течение 14–18 дней, с возможными промежутками между занятиями до 2 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты прошли курс комплексной двигательной реабилитации, включавший в себя стандартизированную методику реабилитации больных после инсульта (ООКТ 1–4 ступень, PNF, тренировки на кардиотренажере «Motomed») [24] с включением в программу занятий на тренажере ИМКЭ кисти в количестве 9,5 (8,0; 10,0) процедур.

Для оценки двигательной функции верхней конечности пациентов применяли шкалы Fugl-Meyer Assessment (FMA) [25], Британскую шкалу оценки мышечной силы (MRCWS), модифицированную шкалу спастичности Ashworth (mAS). Для оценки функциональной активности верхней конечности мы использовали Action Research Arm Test (ARAT) [26]. Для оценки повседневной жизнедеятельности применяли Barhtel Index (BI). Для оценки качества идеомоторного представления мы использовали шкалу Movement Imagery Questionnaire (MIQ-RS) для клинической популяции.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критериев Манна–Уитни, Уилкоксона, коэффициента корреляции Спирмена на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ

Statistica v 13.0 (StatSoft; США). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25; 75%). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Медиана качества управления пациентами нейрокомпьютерным интерфейсом (индекс каппа Коэна и процент распознавания) составила 58,5% (45,7; 62,6) ($p < 0,05$), что подтверждает успешность взаимодействия пациентов с нейроинтерфейсом.

Для изучения возможности и качества кинестетической компоненты идеомоторного представления на основании данных теста MIQ-RS мы разделили пациентов на две группы в зависимости от латерализации очага поражения в головном мозге (табл. 1).

Различия полученных показателей были статистически значимы. Больные с левополушарной локализацией очага инсульта оказались более успешными в формировании ментального кинестетического двигательного представления, чем пациенты с правополушарной локализацией очага, что не противоречит данным литературы [27].

Однако попытка поиска корреляции между качеством моторного представления больными в зависимости от «стороны инсульта» и эффективностью взаимодействия с ИМКЭ кисти, по данным классификатора, успеха не принесла. В связи с этим пациенты были разделены на две группы по качеству моторного представления, исходя из данных шкалы MIQ-RS, в зависимости от полученных баллов. Первую группу составили те из пациентов, кто набрал более 50% баллов в субшкале от максимального значения, отражающей кинестетическую составляющую представления; вторую группу — те, кто набрал менее 50%. 13 пациентов субъективно оценили возможность своего кинестетического представления достаточно высоко, медиана показателя составила 47,5 (32,0; 54,0) балла. Медиана показателя остальных 11 пациентов — 27,0 (15,0; 29,0) баллов. Различие в группах по выделенному показателю достигло статистической значимости ($p < 0,05$). Далее была изучена связь качества моторного представления пациентами с успешностью взаимодействия их с ИМКЭ кисти (табл. 2).

При анализе полученных данных была выявлена значимая умеренная корреляция между успешностью моторного представления (MIQ-RS) и эффективностью взаимодействия пациентов с ИМКЭ кисти. Другими словами, пациенты с высокими показателями по шкале MIQ-RS показывали достоверно высокие значения классификатора, а пациенты с более низкими взаимодействовали с ИМКЭ кисти достоверно хуже.

Зависимость восстановления двигательной и функциональной активности пациентов от эффективности их взаимодействия с ИМКЭ кисти представлена в табл. 3.

В обеих группах в восстановлении двигательной и функциональной активности верхней конечности была

Таблица 1. Качество моторного представления пациентами в зависимости от латерализации очага поражения в головном мозге

Показатель/Критерий Манна–Уитни	Правополушарная локализация очага (n = 13)	Левополушарная локализация очага (n = 11)
MIQ-RS ($p < 0,05$)	29 (18,0; 35,0)	44,0 (25,0; 54,0)

Таблица 2. Данные эффективности взаимодействия пациентов с ИМКЭ кисти в зависимости от качества моторного представления пациентов по данным MIQ-RS

Показатель	Пациенты с MIQ-RS > 50% (n = 13)	Пациенты с MIQ-RS < 50% (n = 11)
Коэффициент корреляции Спирмена	$R = 0,67$ ($p < 0,05$)	$R = 0,43$ ($p < 0,05$)
MIQ-RS	47,5 (32,0; 54,0)	27,0 (15,0; 29,0)
Классификатор, $p < 0,05$	63,0 (54,0; 67,0)*	39,0 (32,0; 48,0)*

Примечание: * — $p < 0,05$.

Таблица 3. Зависимость восстановления двигательной, функциональной активности верхней конечности и бытовой активности пациентов от эффективности их взаимодействия с ИМКЭ кисти

Показатель/Критерий Манна-Уитни	Пациенты с MIQ-RS > 50% (n = 13)		Пациенты с MIQ-RS < 50% (n = 11)	
Классификатор, p < 0,05	63,0 (54,0; 67,0)		39,0 (32,5; 48,5)	
	До	После	До	После
FMA общий балл	88,0 (62,0; 102,0)	102,0 (66,0; 112,0)*	95,5 (67,0; 109,0)	105,0 (69,0; 110,0)*
MRCWS	3,0 (2,0; 4,0)	3,0 (3,0; 4,0)	3,0 (2,0; 4,0)	3,0 (3,0; 4,0)
mAS	1,5 (3,0; 1,0)	1,0 (1,0; 1,0)*	2,0 (1,0; 2,0)	1,0 (1,0; 1,0)*
ARAT общий балл	37,0 (4,0; 47,0)	42,0 (6,0; 53,0)*	35,0 (5,0; 43,0)	39,0 (4,0; 48,0)*
BI	90,0 (75,0; 95,0)	95,0 (80,0; 100,0)*	87,5 (75,0; 100,0)	92,5 (85,0; 100,0)*

выявлена положительная статистически значимая динамика. У пациентов с более успешным представлением движения динамика была более выраженной, но не достигла значимых различий с пациентами другой группы. Кроме того, на данной выборке пациентов не было обнаружено значимой корреляции между успешностью взаимодействия пациентов с нейроинтерфейсом (по данным классификатора) и выраженностью динамики двигательного восстановления функции верхней конечности, что возможно объясняется недостаточным количеством участников. Положительную динамику по шкале BI наблюдали у пациентов обеих групп за счет движений, требующих бимануального выполнения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неинвазивные нейроинтерфейсы позволяют людям контролировать внешние устройства с помощью декодирования мозговой активности в режиме реального времени. В неинвазивных подходах ИМК пользователи участвуют в когнитивной задаче, такой как визуальное внимание или двигательное представление, в то время как сигналы их мозга записывают с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ) и декодируют в режиме онлайн для окончательного контроля над внешними устройствами [28]. Несмотря на технические достижения и продолжающееся усовершенствование технологии нейроинтерфейсов, способность эффективно взаимодействовать остается ограниченной для некоторых пользователей здоровой популяции. Показано, что доля пользователей, которые не могут добиться успешного контроля, находится в диапазоне 15–30% [29]. По результатам исследований с участием большого количества субъектов, до 50% пользователей не могут достичь

точности выше 70% — порога, который обычно считают более точным для определения успешного контроля [30]. Важно, что эти показатели отражают возможности лиц здоровой популяции. В нашем исследовании участвовали пациенты неврологического профиля, имеющие умеренный когнитивный дефицит. Несмотря на это часть пациентов во взаимодействии с нейроинтерфейсом были более успешными: индекс каппа Коэна и процент распознавания у них составили 63,0% (54,0; 67,0), а часть пациентов менее успешными — их показатель составил 39,0% (32,0; 48,0). Уровень полученных данных коррелировал с результатами тестирования пациентов с помощью шкалы MIQ-RS. Результат работы имеет большое теоретическое и практическое значение, так как наглядно подтверждает единство когнитивных и двигательных процессов в организме человека, демонстрирует необходимость дуалистического подхода к процессу восстановления как двигательных, так и когнитивных функций при поражении мозга, ставит задачи по разработке персонализированного подхода к использованию технологии в целях получения наилучшего результата, что, в свою очередь, приведет к более рациональному использованию реабилитационных ресурсов.

ВЫВОДЫ

В исследовании выявлена взаимосвязь способности пациентов к моторному представлению (по данным шкалы MIQ-RS) с эффективностью взаимодействия пациентов с нейроинтерфейсом. Для выявления влияния успешности взаимодействия пациентов с нейроинтерфейсом (по данным классификатора) на динамику двигательного восстановления функции верхней конечности вероятно требуется продолжить исследование с увеличенным объемом выборки.

Литература

1. Куташов В. А., Будневский А. В., Припутневич Д. Н., Суржко Г. В. Психологические особенности пациентов с последствиями кровообращения, затрудняющими социальную адаптацию. Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. 2014; (8): 8–13.

2. Roman GC. Facts, myths, and controversies in vascular dementia. J Neurol Sci. 2004; 226: 49–52.

3. Ang KK, Phua KS, Wang C, Chin ZY, Kuah CW, Low W, et al. Randomized Controlled Trial of EEG-Based Motor Imagery Brain-Computer Interface Robotic Rehabilitation for Stroke. Clinical EEG and neuroscience. 2015; 46 (4): 310–20. <https://doi.org/10.1177/1550059414522229>.

4. Фролов А. А., Мокиенко О. А., Люкманов Р. Х., Черникова Л. А., Котов С. В. и др. Предварительные результаты контролируемого исследования эффективности технологии ИМК-экзоскелет

при постинсультном парезе руки. Вестник РГМУ. 2016; (2): 175.

5. Novak DA, Grefkes C, Arneli M, Fink GR. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. Neururehabil Neural Repair. 2009; (23): 641–57.

6. Sharma N, Simmons LH, Jones PS, Day DJ, Carpenter TA, Pomeroy VM, et al. Motor imagery after subcortical stroke: a functional magnetic resonance imaging study. Stroke. 2009; 40 (4): 315–24.

7. Johnson SH, Sprehn G, Saykin AJ. Intact motorimagery in chronic upper limb hemiplegics: evidence for activity-independent action representations. Journal of Cognitive Neuroscience. 2002; 14 (6): 841–52.

8. Barclay-Goddard RE, Stevenson TJ, Poluha W, Thalman L. Mental practice for treating upper extremity deficits in individuals with

- hemiparesis after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 11 (5): CD005950. DOI: 10.1002/14651858.CD005950.pub4.
9. Chholak P, Niso G, Maksimenko VA, Kurkin SA, Frolov NS, Pitsik EN et al. Visual and kinesthetic modes affect motor imagery classification in untrained subjects. 2019 Jul 8; 9 (1): 9838. DOI:10.1038/s41598-019-46310-9.
 10. Schmidt R, Lee T. *Motor Control and Learning: A Behavioral Emphasis*. Champaign, IL: Human Kinetics, 1999; 592 p.
 11. Bajaj S, Butler AJ, Drake D, Dhamala M. Brain effective connectivity during motor-imagery and execution following stroke and rehabilitation. *Neuroimage Clin*. 2015 (8): 572–82. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.06.006>.
 12. Page SJ, Levine P, Leonard A. Mental practice in chronic stroke: results of a randomized, placebo-controlled trial. *Stroke*. 2007 Apr; 38 (4): 1293–7.
 13. Braun SM, Beurskens AJ, Borm PJ, Schack T, Wade DT. The effects of mental practice in stroke rehabilitation: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil*. 2006 Jun; 87 (6): 842–52.
 14. Román GC. Facts, myths, and controversies in vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2004 Nov 15; 226 (1–2): 49–52.
 15. Sauvage C, De Greef N, Manto M, Jissendi P, Nioche C, Habas C. Reorganization of large-scale cognitive networks during automation of imagination of a complex sequential movement // *Journal of neuroradiology*. 2015; 42 (2): 115–25.
 16. Каплан А. Я. Нейрофизиологические основания и практические реализации технологии мозг машинных интерфейсов в неврологической реабилитации. *Физиология человека*. 2016; 42 (1): 118–27.
 17. Hall CR, Martin KA. Measuring movement imagery abilities: A revision of the Movement Imagery Questionnaire. *Journal of mental imagery*. 1997.
 18. Bocti C, Legault V, Leblanc N, Berger L, Nasreddine Z, BeaulieuBoire I, et al. Vascular cognitive impairment: most useful subtests of the Montreal Cognitive Assessment in minor stroke and transient ischemic attack. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2013; 36 (3–4): 154–62.
 19. Compston A. Aids to the investigation of peripheral nerve injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with aids to the examination of the peripheral nervous system. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier, 2010; pp. 64.
 20. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971 Mar; 9 (1): 97–113.
 21. Bohannon RW, Smith MB. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Phys Ther*. 1987 Feb; 67 (2): 206–7.
 22. Бобров П. Д., Коршаков А. В., Рощин В. Ю., Фролов А. А. Байесовский подход к реализации интерфейса мозг–компьютер, основанного на представлении движений. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2012; 62 (1): 89–99.
 23. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Recovery of walking function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 1995. 76 (1): 27–32.
 24. Инсульт у взрослых: центральный парез верхней конечности. Клинические рекомендации МКБ10: I60/I61/I62/I63/I64/I69.
 25. Sanford J, Moreland J, Swanson LR, Stratford PW, Gowland C. Reliability of the Fugl-Meyer assessment for testing motor performance in patients following stroke. *Phys Ther*. 1993 Jul; 73 (7): 447–54.
 26. Doussoulin SA, Rivas SR, Campos SV. Validation of «Action Research Arm Test» (ARAT) in Chilean patients with a paretic upper limb after a stroke. *Rev Med Chil*. 2012 Jan; 140 (1): 59–65. Spanish.
 27. Боголюбов В. М. Медицинская реабилитация. М.: БИНОМ, 2010; с. 21.
 28. Wolpaw JR, McFarland DJ. Control of a two-dimensional movement signal by a noninvasive brain-computer interface in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 (101): 17849–54.
 29. Vidaurre C, Blankertz B. Towards a cure for BCI illiteracy. *Brain Topogr*. 2010; (23): 194–8.
 30. Ahn M, Chan S. Performance variation in motor imagery brain – computer interface: A brief review. *J Neurosci Methods*. 2015; (243): 103–10.

References

1. Kutashov VA, Budnevskiy AV, Pripitnevich DN, Surzhko GV. Psychological features of patients with consequences of acute disorders of cerebral circulation, hamper their social adaptation. *Vestnik neurologii, psichiatrii i neirohirurgii*. 2014; (8): 8–13.
2. Roman GC. Facts, myths, and controversies in vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2004; 226: 49–52.
3. Ang KK, Phua KS, Wang C, Chin ZY, Kuah CW, Low W, et al. Randomized Controlled Trial of EEG-Based Motor Imagery Brain-Computer Interface Robotic Rehabilitation for Stroke. *Clinical EEG and neuroscience*. 2015; 46 (4): 310–20. <https://doi.org/10.1177/1550059414522229>.
4. Frolov AA, Mokienko OA, Lyukmanov RKh, Chernikova LA, Kotov SV, et al. Preliminary results of a controlled study of the effectiveness of IMC-exoskeleton technology for post-stroke paresis of the arm. *Vestnik RSMU*. 2016; (2): 175.
5. Novak DA, Grefkes C, Arneli M, Fink GR. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. *Neururehabil Neural Repair*. 2009; (23): 641–57.
6. Sharma N, Simmons LH, Jones PS, Day DJ, Carpenter TA, Pomeroy VM, et al. Motor imagery after subcortical stroke: a functional magnetic resonance imaging study. *Stroke*. 2009; 40 (4): 315–24.
7. Johnson SH, Sprehn G, Saykin AJ. Intact motorimagery in chronic upper limb hemiplegics: evidence for activity-independent action representations. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2002; 14 (6): 841–52.
8. Barclay-Goddard RE, Stevenson TJ, Poluha W, Thalman L. Mental practice for treating upper extremity deficits in individuals with hemiparesis after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 11 (5): CD005950. DOI: 10.1002/14651858.CD005950.pub4.
9. Chholak P, Niso G, Maksimenko VA, Kurkin SA, Frolov NS, Pitsik EN et al. Visual and kinesthetic modes affect motor imagery classification in untrained subjects. 2019 Jul 8; 9 (1): 9838. DOI:10.1038/s41598-019-46310-9.
10. Schmidt R, Lee T. *Motor Control and Learning: A Behavioral Emphasis*. Champaign, IL: Human Kinetics, 1999; 592 p.
11. Bajaj S, Butler AJ, Drake D, Dhamala M. Brain effective connectivity during motor-imagery and execution following stroke and rehabilitation. *Neuroimage Clin*. 2015 (8): 572–82. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.06.006>.
12. Page SJ, Levine P, Leonard A. Mental practice in chronic stroke: results of a randomized, placebo-controlled trial. *Stroke*. 2007 Apr; 38 (4): 1293–7.
13. Braun SM, Beurskens AJ, Borm PJ, Schack T, Wade DT. The effects of mental practice in stroke rehabilitation: a systematic review. *Arch Phys Med Rehabil*. 2006 Jun; 87 (6): 842–52.
14. Román GC. Facts, myths, and controversies in vascular dementia. *J Neurol Sci*. 2004 Nov 15; 226 (1–2): 49–52.
15. Sauvage C, De Greef N, Manto M, Jissendi P, Nioche C, Habas C. Reorganization of large-scale cognitive networks during automation of imagination of a complex sequential movement // *Journal of neuroradiology*. 2015; 42 (2): 115–25.
16. Kaplan AYa. Neurophysiological foundations and practical implementation of the technology of the brain of machine interfaces in neurological rehabilitation. *Human Physiology*. 2016; 42 (1): 118–27.
17. Hall CR, Martin KA. Measuring movement imagery abilities: A revision of the Movement Imagery Questionnaire. *Journal of mental imagery*. 1997.
18. Bocti C, Legault V, Leblanc N, Berger L, Nasreddine Z, BeaulieuBoire I, et al. Vascular cognitive impairment: most useful

- subtests of the Montreal Cognitive Assessment in minor stroke and transient ischemic attack. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2013; 36 (3–4): 154–62.
19. Compston A. Aids to the investigation of peripheral nerve injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with aids to the examination of the peripheral nervous system. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier, 2010; pp. 64.
 20. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971 Mar; 9 (1): 97–113.
 21. Bohannon RW, Smith MB. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Phys Ther*. 1987 Feb; 67 (2): 206–7.
 22. Bobrov PD, Korshakov AV, Roshchin VYu, Frolov AA. Bayesian approach to the implementation of the brain-computer interface based on the representation of movements. *Journal of Higher Nervous Activities*. 2012; 62 (1): 89–99.
 23. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Recovery of walking function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 1995. 76 (1): 27–32.
 24. Stroke in adults: central paresis of the upper limb. Clinical recommendations ICD10: I60/I61/I62/I63/I64/I69.
 25. Sanford J, Moreland J, Swanson LR, Stratford PW, Gowland C. Reliability of the Fugl-Meyer assessment for testing motor performance in patients following stroke. *Phys Ther*. 1993 Jul; 73 (7): 447–54.
 26. Doussoulin SA, Rivas SR, Campos SV. Validation of «Action Research Arm Test» (ARAT) in Chilean patients with a paretic upper limb after a stroke. *Rev Med Chil*. 2012 Jan; 140 (1): 59–65. Spanish.
 27. Bogolyubov VM. *Medicinskaja reabilitacija*. M.: BINOM, 2010; s. 21.
 28. Wolpaw JR, McFarland DJ. Control of a two-dimensional movement signal by a noninvasive brain-computer interface in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 (101): 17849–54.
 29. Vidaurre C, Blankertz B. Towards a cure for BCI illiteracy. *Brain Topogr*. 2010; (23): 194–8.
 30. Ahn M, Chan S. Performance variation in motor imagery brain – computer interface: A brief review. *J Neurosci Methods*. 2015; (243): 103–10.

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ БОЛЕВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ N-КОНЦЕВЫХ АНАЛОГОВ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

С. А. Додонова¹✉, И. И. Бобынцев¹, А. Е. Белых¹, Л. А. Андреева², Н. Ф. Мясоедов²

¹ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

² Институт молекулярной генетики, Москва, Россия

Меланокортины (МК) — один из активно исследуемых классов пептидных регуляторов с широким спектром биологических эффектов. В структуре всех природных МК присутствует общий фрагмент — His-Phe-Arg-Trp (HFRW), соответствующий последовательности с 6-го по 9-й аминокислотный остаток молекулы аденокортикотропного гормона (АКТГ₆₋₉) и являющийся ее активным центром. Показано, что присоединение к С-концу аминокислотной последовательности Pro-Gly-Pro (PGP) приводит к пролонгации действия пептидов. Целью работы было изучить влияние эффектов АКТГ₆₋₉-PGP (HFRWPGP) на спинальные и супраспинальные механизмы формирования болевой чувствительности у крыс, а также сравнить их с эффектами его структурного аналога — АКТГ₄₋₇-PGP (MEHFPGP). Эффекты АКТГ₆₋₉-PGP были исследованы при его внутривнутрибрюшинном введении в дозах 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150 и 450 мкг/кг за 15 мин до начала опыта по изучению температурной болевой чувствительности у крыс с использованием тестов «горячая пластина» и «отдергивание хвоста». Эффекты АКТГ₄₋₇-PGP были исследованы в аналогичных условиях в дозах 50; 150 и 450 мкг/кг. Показано, что АКТГ₆₋₉-PGP в дозах 5 и 150 мкг/кг вызывал выраженное снижение температурной болевой чувствительности через 15 и 45 мин после его внутривнутрибрюшинного введения ($p = 0,04$), реализованного на супраспинальном уровне. В тесте «отдергивание хвоста» АКТГ₆₋₉-PGP в дозе 150 мкг/кг повышал температурную болевую чувствительность с участием сегментарных спинальных механизмов ($p = 0,04$). АКТГ₄₋₇-PGP не оказывал влияния на исследованные механизмы болевой чувствительности. Таким образом, установлено, что АКТГ₆₋₉-PGP, в отличие от АКТГ₄₋₇-PGP, способен обладать как анальгетическими, так алгическими эффектами.

Ключевые слова: регуляторный пептид, АКТГ, боль, горячая пластина, отдергивание хвоста

Информация о вкладе авторов: С. А. Додонова, А. Е. Белых — сбор, обработка материала и статистический анализ данных; И. И. Бобынцев, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов — концепция и дизайн исследования; С. А. Додонова, А. Е. Белых, И. И. Бобынцев — написание текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 27 октября 2015 г.). Условия содержания животных и работы с ними соответствовали принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, директиве Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Александровна Додонова
ул. К. Маркса, д. 3, г. Курск, 305004; dodonovasveta@mail.ru

Статья получена: 02.12.2019 **Статья принята к печати:** 16.12.2019 **Опубликована онлайн:** 20.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.085

CHANGES IN THE NOCICEPTIVE RESPONSE TO THERMAL STIMULATION IN RATS FOLLOWING ADMINISTRATION OF N-TERMINAL ANALOGS OF THE ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE

Dodonova SA¹✉, Bobyntsev II¹, Belykh AE¹, Andreeva LA², Myasoedov NF²

¹ Kursk State Medical University, Kurks, Russia

² Institute of Molecular Genetics, Moscow, Russia

Melanocortins (MCs) are an increasingly studied class of regulatory peptides exerting a wide range of biological effects. All naturally occurring MCs share a His-Phe-Arg-Trp fragment (HFRW) corresponding to the sequence of amino acid residues 6–9 of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH₆₋₉), which is also a central active component of ACTH. Attaching the Pro-Gly-Pro (PGP) sequence to the C-end of the peptide extends the duration of the peptide's effect. The aim of this study was to investigate the effects of ACTH₆₋₉-PGP (HFRWPGP) on the spinal and supraspinal mechanisms involved in the nociceptive response in rats and to compare them to those of its structural analog ACTH₄₋₇-PGP (MEHFPGP). ACTH₆₋₉-PGP effects were studied following the intraperitoneal administration of the peptide at doses 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, or 450 µg/kg 15 minutes before the hot plate and tail flick tests. ACTH₄₋₇-PGP effects were studied under the same conditions at the following doses: 50, 150 and 450 µg/kg. We found that ACTH₆₋₉-PGP administered intraperitoneally at 5 or 150 µg/kg induced a pronounced reduction in pain sensitivity 15 and 45 minutes after the injection ($p = 0.04$); this effect was implemented via supraspinal mechanisms. In the tail flick test, 150 µg/kg ACTH₆₋₉-PGP increased pain sensitivity, with the participation of segmental spinal mechanisms ($p = 0.04$). ACTH₄₋₇-PGP did not have any effect on the studied mechanisms of pain sensitivity. Thus, unlike ACTH₄₋₇-PGP, ACTH₆₋₉-PGP can both increase pain sensitivity and exert an analgesic effect.

Keywords: regulatory peptide, ACTH, pain, hot plate, tail flick

Author contribution: Dodonova SA, Belykh AE — collected processed and analyzed the data; Bobyntsev II, Andreeva LA, Myasoedov NF — conceived and designed the study; Dodonova SA, Belykh AE, Bobyntsev II — wrote this manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kursk State Medical University (Protocol № 3 dated October 27, 2015). The animals were treated in strict compliance with the Declaration of Helsinki, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council (September 22, 2010) on the protection of animals used for scientific purposes, and Good Laboratory Practice guidelines established by the Order 708n of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (August 23, 2010).

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana A. Dodonova
K. Marx, 3, Kursk, 305004; dodonovasveta@mail.ru

Received: 02.12.2019 **Accepted:** 16.12.2019 **Published online:** 20.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.085

Известно, что регуляторные пептиды семейства меланокортинов и их фрагменты обладают широким спектром биологических эффектов, что послужило основанием для создания ряда синтетических аналогов с целью структурно-функционального анализа молекул и разработки фармакологических препаратов [1, 2]. Известно, что N-концевые участки адренкортикотропного гормона (АКТГ) оказывают нейротропное действие, в том числе на болевую чувствительность [3]. При этом последовательность His-Phe-Arg-Trp, соответствующая участку АКТГ₆₋₉, необходима для активации всех видов меланокортиновых рецепторов [4]. Показано, что после присоединения трипептида Pro-Gly-Pro (PGP) к С-концу АКТГ₆₋₉ для повышения устойчивости к действию карбоксипептидаз ряд его нейротропных эффектов сохранялся [5]. Однако влияние пептида АКТГ₆₋₉-PGP на болевую чувствительность до настоящего времени не было изучено. В то же время структурно близкий синтетический фрагмент АКТГ₄₋₇-PGP, являющийся активной субстанцией фармакологического препарата «семакс», обладает подобными эффектами [3]. Поэтому с целью структурно-функционального анализа N-концевых фрагментов АКТГ представлялось необходимым исследовать данный вид нейротропной активности у молекулы АКТГ₆₋₉-PGP.

Целью данной работы было изучить влияние пептида АКТГ₆₋₉-PGP на спинальные и супраспинальные механизмы формирования болевой чувствительности у крыс и сравнить с эффектами АКТГ₄₋₇-PGP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполняли на крысах-самцах Вистар массой 150–190 г (всего 121 животное). Крыс содержали в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме (12 ч — свет, 12 ч — темнота) и контролируемой температуре (22 ± 2 °C); животные получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе. Исследования проводили в промежутках времени с 9 до 15 ч.

Крысы были разделены на 11 групп (10 опытных и 1 контрольная) по 11 особей в каждой. Каждая опытная группа животных получала АКТГ₆₋₉-PGP или АКТГ₄₋₇-PGP (семакс) в одной из исследуемых доз. В работе применяли пептиды, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН. АКТГ₆₋₉-PGP растворяли в физиологическом растворе 0,9% натрия хлорида и вводили животным первых семи опытных групп внутривентрально в дозах 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150 и 450 мкг/кг однократно за 15 мин до начала эксперимента (одна доза на одну опытную группу). АКТГ₄₋₇-PGP также растворяли в физиологическом растворе и вводили животным из трех оставшихся опытных групп однократно внутривентрально за 15 мин до начала опыта в дозах 50, 150 и 450 мкг/кг по аналогичной схеме. Группе контрольных животных вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы.

Изучение болевой чувствительности при термическом воздействии проводили с использованием тестов «горячая пластина» и «отдергивание хвоста» [6] на специальном оборудовании (PanLab Harvard Apparatus; Испания): приборе «Hot plate» (модель LE7406), приборе «Tail-flick» (модель LE7106). В тесте «горячая пластина» при температуре 53 °C проводили четыре испытания с интервалом 15 мин: однократное измерение исходного болевого порога до введения пептидов и три измерения болевого

порога после введения пептидов. Регистрировали время с момента помещения животного на горячую пластину до появления поведенческого ответа на ноцицептивный стимул (облизывание задних лап, выпрыгивание). В тесте «отдергивание хвоста» болевое раздражение наносили на середину хвоста локально тепловым излучением интенсивностью 50 ед. по шкале прибора и регистрировали латентный период реакции извлечения от болевого раздражителя (отдергивание хвоста). Проводили пять измерений: дважды до введения пептида (с вычислением среднего значения исходного болевого порога) и три измерения болевого порога после введения пептида. Все измерения проводили с интервалом в 15 мин. При обработке полученных результатов рассчитывали величину максимально возможного эффекта (МВЭ) по формуле [6]:

$$\text{МВЭ} = \frac{\text{ЛП}_{\text{оп}} - \text{ЛП}_{\text{контр}}}{\text{МАХ}_{\text{время}} - \text{ЛП}_{\text{контр}}} \times 100\%,$$

где ЛП_{оп} — латентный период реакции после введения вещества, ЛП_{контр} — латентный период реакции до введения вещества, МАХ_{время} — максимальное время нанесения раздражителя (45 с — для теста «горячая пластина» и 9 с — для теста «отдергивание хвоста»).

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения «MS Excel 2016» (Microsoft; USA), программы «Stasticica 13.3» (StatSoft; USA) и программной среды вычислений R (The R Foundation for Statistical Computing; Austria). Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, оценку равенства дисперсий — с помощью критерия Левене (пакет lawstat). Полученные результаты выражали в виде медианы (Me), нижнего (25) и верхнего (75) перцентилей (Q1 и Q3). Значимость данных оценивали с применением непараметрического однофакторного дисперсионного анализа с помощью критерия Краскела–Уоллиса, для выявления межгрупповых различий в качестве post-hoc-анализа использовали критерий Манна–Уитни (U-тест) с поправкой Бенджамини–Хохберга. Критический уровень значимости (p-value) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение пептида АКТГ₆₋₉-PGP дозозависимо влияло на изменение величины максимально возможного эффекта в тесте «горячая пластина» (см. табл.). Так, после введения пептида в дозе 5 мкг/кг на 15-й и 45-й минутах наблюдали наиболее выраженный анальгетический эффект с достоверным увеличением болевого порога в 2,5 и 7 раз соответственно ($p = 0,04$ и $p = 0,02$). При уменьшении вводимой дозы до 1,5 мкг/кг пептид не оказывал существенного влияния на болевую чувствительность. Однако дальнейшее снижение дозы до 0,5 мкг/кг привело к смене направленности эффекта: через 30 мин после введения АКТГ₆₋₉-PGP наблюдали тенденцию к алгическому эффекту — снижению величины МВЭ на 193% ($p = 0,15$), которое сохраняется до 45-й мин эксперимента ($p = 0,07$).

Увеличение вводимой дозы АКТГ₆₋₉-PGP до 15 мкг/кг не сопровождалось достоверным эффектом. При использовании пептида в дозе 50 мкг/кг отмечена тенденция к алгическому эффекту через 45 минуты ($p = 0,1$). Последующее повышение дозы до 150 мкг/кг вновь сопровождалось достоверным увеличением болевого

порога на 15-й ($p = 0,04$) и 45-й ($p = 0,04$) минутах после введения пептида. В дозе 450 мкг/кг АКГГ₆₋₉-PGP не оказывал достоверного влияния на исследованные показатели.

Введение АКГГ₄₋₇-PGP на протяжении всего теста «горячая пластина» не приводило к достоверным различиям между животными опытных групп во всех используемых дозах по сравнению с контрольной.

При исследовании влияния АКГГ₆₋₉-PGP на величину болевого порога у крыс в тесте «отдергивание хвоста» в группах животных, получавших пептид в дозах 0,5, 1,5, 15, 50 и 450 мкг/кг, достоверных изменений порогов болевой чувствительности выявлено не было (см. табл.).

Важно отметить, что при отсутствии достоверных эффектов пептида в тесте «горячая пластина» в дозах 5 и 150 мкг/кг через 30 мин после введения в тесте «отдергивание хвоста» АКГГ₆₋₉-PGP оказывал влияние на температурную болевую чувствительность в аналогичном интервале времени: в дозе 150 мкг/кг наблюдали достоверное снижение болевого порога ($p = 0,04$), а в дозе 5 мкг/кг — тенденцию к алгическому эффекту ($p = 0,1$).

При исследовании влияния АКГГ₄₋₇-PGP на болевую чувствительность в тесте «отдергивание хвоста» достоверных изменений зафиксировано не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биологические эффекты меланокортинов реализуются через различные типы меланокортиновых рецепторов (MCR). В частности, MCR1 экспрессируется в нейронах околосерозного серого вещества, MCR3 — в коре и таламусе, MCR4 — в стволе головного мозга. Активация указанных структур играет важную роль в формировании

боли, ограничивая ее развитие [7, 8]. Учитывая, что болевые реакции в тесте «горячая пластина» формируются с участием супраспинальных структур [6], взаимодействие АКГГ₆₋₉-PGP с тем или иным типом рецепторов в головном мозге может оказывать влияние на исследованный вид болевой чувствительности.

Кроме того, MCR4 обнаруживаются в структурах спинного мозга [3, 8] и изменение их активности после введения АКГГ₆₋₉-PGP может оказывать влияние на функционирование сегментарных механизмов боли, наблюдавшееся в тесте «отдергивание хвоста». При этом вопрос о действии аналогов АКГГ через меланокортиновые рецепторы остается открытым и можно предполагать наличие как минимум еще одного неопisanного подтипа рецепторов [9, 10].

Отмеченные различия в выраженности и направленности эффектов пептида при использовании различных доз могут быть обусловлены как взаимодействием пептида с теми или иными типами MCR по пути его распространения по структурам мозга, так и с возможными особенностями внутриклеточных механизмов реализации его действия. В частности, трансмембранная и последующая внутриклеточная передача сигнала с одного и того же MCR в зависимости от концентрации лиганда может быть осуществлена различными путями: за счет активации цАМФ, инозитолфосфатной системой [1, 11], а также Ca^{2+} и протеинкиназами [1]. Данные особенности установлены для всех типов меланокортиновых рецепторов [1]. Активация того или иного механизма передачи сигнала влияет на направленность, силу и продолжительность эффекта, вызванного соответствующим стимулом [1, 2]. Указанные выше факты согласуются с установленными в нашей работе дозозависимыми и разнонаправленными

Таблица. Влияние пептидов АКГГ₆₋₉-PGP и АКГГ₄₋₇-PGP на болевую чувствительность крыс в тестах «горячая пластина» и «отдергивание хвоста», МВЭ (Me (Q1; Q3))

Группа животных \ МВЭ, %	15-я минута	30-я минута	45-я минута	15-я минута	30-я минута	45-я минута
	Тест «горячая пластина»			Тест «отдергивание хвоста»		
Контроль	12,92 (-6,05; 26,83)	1,9 (-6,93; 5,84)	3,58 (-3,18; 9,53)	15,53 (-22,91; 29,78)	15,69 (-5,07; 28,69)	-17,81 (-46,16; 25,12)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 0,5 мкг/кг ($n = 11$)	4,41 (-16,20; 7,73)	-18,11 (-38,62; -0,72)	-18,73 (-31,94; -7,92)	17,08 (6,06; 50,00)	0,05 (-30,59; 23,43)	-14,31 (-41,03; 5,79)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 1,5 мкг/кг ($n = 11$)	8,98 (-0,59; 19,74)	16,28 (8,43; 23,68)	-9,05 (-26,00; 11,33)	11,68 (8,08; 38,79)	22,42 (-3,37; 54,11)	-5,95 (-7,98; 19,13)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 5 мкг/кг ($n = 11$)	45,44* (23,88; 54,69)	28,05 (-1,46; 42,62)	31,11* (27,57; 36,58)	-7,73 (-28,83; 16,98)	-8,76 (-19,43; 12,29)	8,6 (-8,97; 41,44)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 15 мкг/кг ($n = 11$)	16,48 (11,57; 48,20)	11,75 (-0,76; 29,79)	10,83 (-11,48; 46,64)	0,62 (-8,11; 22,87)	-6,11 (-17,38; 12,50)	1,96 (-3,77; 22,24)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 50 мкг/кг ($n = 11$)	3,57 (-9,45; 23,48)	-4,09 (-32,97; 7,96)	-10,42 (-23,20; 2,20)	11,65 (-13,77; 40,37)	19,97 (9,45; 40,40)	15,73 (-5,16; 20,34)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 150 мкг/кг ($n = 11$)	41,02* (16,37; 66,96)	10,06 (2,88; 29,73)	30,40* (19,13; 37,31)	-18,04 (-44,05; 6,37)	-31,67* (-36,45; -21,85)	-20,85 (-43,43; 8,58)
АКГГ ₆₋₉ -PGP 450 мкг/кг ($n = 11$)	24,15 (9,36; 26,39)	6,61 (-7,00; 17,15)	4,56 (-2,13; 6,92)	3,77 (-21,28; 23,96)	11,16 (-28,31; 40,84)	-5,78 (-22,03; 38,22)
АКГГ ₄₋₇ -PGP 50 мкг/кг ($n = 11$)	0,45 (-14,1; 37,27)	11,01 (-18,57; 23,17)	10,23 (-0,03; 42,15)	1,21 (-22,86; 38,97)	22,7 (-58,53; 32,46)	-4,63 (-47,24; 25,36)
АКГГ ₄₋₇ -PGP 150 мкг/кг ($n = 11$)	12,07 (-5,06; 34,59)	12,48 (0,64; 31,16)	1,52 (-5,75; 16,44)	10 (-43,69; 26,44)	0,1 (-44,11; 27,93)	-3,91 (-40,36; 21,57)
АКГГ ₄₋₇ -PGP 450 мкг/кг ($n = 11$)	20,37 (8,63; 27,69)	12,19 (-9,18; 32,12)	21,9 (-9,19; 35,83)	25,78 (1,54; 80,88)	-16,71 (-35,19; 25,67)	11,83 (-27,97; 26,38)

Примечание: * — достоверные различия ($p \leq 0,05$) по сравнению с аналогичным временным интервалом контрольной группы с использованием критерия Манна-Уитни (U -тест) с поправкой Бенджамини-Хохберга.

изменениями болевой чувствительности после введения АКГГ₆₋₉-PGP, что характерно для регуляторных пептидов как особого класса биологически активных веществ [11, 12].

Установленная в ряде случаев разнонаправленность эффектов АКГГ₆₋₉-PGP также согласуется с данными литературы о противоречивости влияния фрагментов и аналогов АКГГ на формирование боли [3, 13]. При этом можно предположить, что механизмы влияния на боль АКГГ₆₋₉-PGP могут иметь сходство с таковыми для его структурно близкого аналога — АКГГ₄₋₇-PGP (семакса), который при периферическом введении снижает болевую чувствительность, реализуя свои эффекты в том числе через опиоидные и серотониновые рецепторы [3].

В связи с тем, что последовательность АКГГ₆₋₉ необходима для активации всех видов меланокортиновых рецепторов [4], отмеченное в работе влияние АКГГ₆₋₉-PGP на болевую чувствительность в сравнении с АКГГ₄₋₇-PGP может быть следствием возможности его взаимодействия со всеми типами MCR в структурах ЦНС, участвующих в ноцицептивных и антиноцицептивных механизмах. При этом обращают на себя внимание полученные в нашей работе данные об отсутствии противоболевых эффектов у АКГГ₄₋₇-PGP, описанных ранее другими авторами [3]. Учитывая, что межлинейные и межпородные особенности

могут оказывать значительное влияние на характер болевой реакции [14, 15], одной из причин указанных выше различий в полученных эффектах может служить использование в предыдущих исследованиях беспородных животных, тогда как настоящее исследование выполнено на крысах Вистар.

ВЫВОДЫ

В тесте «горячая пластина» введение АКГГ₆₋₉-PGP в дозах 5 и 150 мкг/кг вызывало выраженное снижение температурной болевой чувствительности с участием супраспинальных механизмов через 15 и 45 мин после внутрибрюшного введения. В остальных использованных дозах эффекты отсутствовали. В тесте «отдергивание хвоста» в дозе 150 мкг/кг пептид повышал температурную болевую чувствительность с участием сегментарных спинальных механизмов. Влияния АКГГ₄₋₇-PGP на исследованные механизмы болевой чувствительности установлено не было. Результаты проведенных исследований расширяют данные о физиологических эффектах N-концевых аналогов АКГГ и могут служить теоретическим обоснованием для создания на их основе фармакологических препаратов с нейротропным спектром действия.

Литература

1. Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S. The melanocortin system in control of inflammation. *Scientific World Journal*. 2010; (10): 1840–53.
2. Catania A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci*. 2008. 31 (7): 353–60.
3. Koroleva SV, Myasoedov NF. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research. *Biology Bulletin*. 2018; 45 (6): 589–600.
4. Clark AJ, Forfar R, Hussain M, Jerman J, McIver E, Taylor D, et al. ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; (7): 101.
5. Андреева Л. А., Гривенников И. А., Гаврилова С. А., Долотов О. В., Каменский А. А., Кошелев В. Б., Левицкая Н. Г., Мясоедов Н. Ф., авторы. Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, патентообладатель. Пептид, обладающий нейротропными свойствами. Патент РФ № 2443711. 27.02.2012.
6. Миронов А. Н., редактор. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; 944 с.
7. Ковалицкая А. Ю., Фунтикова А. Н., Садовников В. Б., Наволоцкая Е. В. Действие АКГГ-подобных пептидов на миграцию и расплавление перитонеальных макрофагов мыши *in vitro*. *Российский иммунологический журнал*. 2011; 5 (1): 3–10.
8. Hill JW, Faulkner LD. The Role of the Melanocortin System in Metabolic Disease: New Developments and Advances.

9. Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res*. 2000; 42 (5): 393–420.
10. Fridmanis D, Roga A, Klovins J. ACTH Receptor (MC2R) Specificity: What Do We Know About Underlying Molecular Mechanisms? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; (8): 13.
11. Акмаев И. Г., Гривенчик В. В. От нейроэндокринологии к нейроиммуноэндокринологии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001; 131 (1): 22–32.
12. Ашмарин И. П., Каразеева Е. П., Лелекова Т. В. Эффективность ультрамальных доз эндогенных биорегуляторов и иммуноактивных соединений. *Журнал микробиологии*. 2005; (3): 109–16.
13. Левицкая Н. Г., Каменский А. А. Меланокортиновая система. *Успехи физиол. наук*. 2009; 40 (1): 44–65.
14. Hestehave S, Abelson KSP, Pedersen TB, Munro G. The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model: implications for target validation efforts in pain drug discovery. *Eur J Pain*. 2019; 23 (3): 539–54. PubMed PMID: 30318662.
15. Hestehave S, Abelson KSP, Pedersen TB, Munro G. Stress sensitivity and cutaneous sensory thresholds before and after neuropathic injury in various inbred and outbred rat strains. *Behavioural Brain Research*. 2019; (375): 112149.

References

1. Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S. The melanocortin system in control of inflammation. *Scientific World Journal*. 2010; (10): 1840–53.
2. Catania A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci*. 2008. 31 (7): 353–60.
3. Koroleva SV, Myasoedov NF. Semax as a Universal Drug for Therapy and Research. *Biology Bulletin*. 2018; 45 (6): 589–600.
4. Clark AJ, Forfar R, Hussain M, Jerman J, McIver E, Taylor D, et al. ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016; (7): 101.
5. Andreeva LA, Grivennikov IA, Gavrilova SA, Dolotov OV, Kamenskij AA, Koshelev VB, Levickaya NG, Myasoedov NF, avtory. Uchrezhdenie

- Rossijskoj akademii nauk Institut molekulyarnoj genetiki RAN, patentoobladatel'. Peptid, obladayushchij nejrotroponymi svojstvami. Patent RF № 2443711. 27.02.2012. Russian.
6. Mironov AN, redaktor. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. CHast' pervaya. M.: Grif i K, 2012; 944 s. Russian.
7. Kovalitskaya YuA, Funtikova AN, Sadovnikov VB, Navolotskaya EV. The influence of ACTH-like peptides on migration, adhesion and spreading of mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2011; 5 (1): 3–10. Russian.
8. Hill JW, Faulkner LD. The Role of the Melanocortin System

- in Metabolic Disease: New Developments and Advances. Neuroendocrinology. 2017; 104 (4): 330–46.
9. Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. Pharmacol Res. 2000; 42 (5): 393–420.
 10. Fridmanis D, Roga A, Klovins J. ACTH Receptor (MC2R) Specificity: What Do We Know About Underlying Molecular Mechanisms? Front Endocrinol (Lausanne). 2017; (8): 13.
 11. Akmaev IG, Grinevich VV. Ot nejroendokrinologii k nejroimmunoendokrinologii. Byul eksperim biologii i mediciny. 2001; 131 (1): 22–32. Russian.
 12. Ashmarin IP, Karazeeva EP, Lelekova TV. Effektivnost' ul'tramalyh doz endogennyh bioregulyatorov i immunoaktivnyh soedinenij. Zhurn mikrobiol. 2005; (3): 109–116. Russian.
 13. Levitskaya NG, Kamensky AA. Melanocortin System. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2009; 40 (1): 44–65. Russian.
 14. Hestehave S, Abelson KSP, Pedersen TB, Munro G. The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model: implications for target validation efforts in pain drug discovery. Eur J Pain. 2019; 23 (3): 539–54. PubMed PMID: 30318662.
 15. Hestehave S, Abelson KSP, Pedersen TB, Munro G. Stress sensitivity and cutaneous sensory thresholds before and after neuropathic injury in various inbred and outbred rat strains. Behavioural Brain Research. 2019; (375): 112149.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА HERPESVIRUS SAIMIRI ПУТЕМ СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТИВАЦИИ ТРАНСФИЦИРОВАННОЙ И ПЕРМИССИВНОЙ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

А. Хамад¹, С. П. Чумаков² ✉¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Рекombинантные герпесвирусы можно применять в качестве терапевтических агентов-онколитиков, а также в качестве векторов большой емкости для доставки протяженных экспрессионных конструкций в клетки. Гамма-герпесвирус беличьих обезьян *Herpesvirus saimiri* обладает уникальной способностью инфицировать человеческие лимфоциты и вызывать их immortalization при сохранении зрелого фенотипа и функциональной активности. Проведение рекомбинации генома *Herpesvirus saimiri* в перmissive клеточной культуре затруднено из-за ее устойчивости к химической трансфекции и электропорации. Целью работы являлась разработка эффективного способа введения экспрессионных кассет в геном *Herpesvirus saimiri* без проведения трансфекции перmissive клеточной культуры. Для этого мы использовали совместную культивацию трансфицированных клеток HEK-293T, экспрессирующих также гликопротеины вакцинного штамма вируса кори, и инфицированных *Herpesvirus saimiri* перmissive клеток линии ОМК. Слияние клеток и образование синцитиев привели к запуску рекомбинации между вирусным геномом и экспрессионной кассетой, что позволило получить рекомбинантный вариант *Herpesvirus saimiri* без необходимости проведения химической трансфекции перmissive клеток. Трансгенный вариант вируса характеризовался стабильной экспрессией селективного маркера и сохранял способность персистировать в клеточной культуре в латентной форме, а также вызывать immortalization первичных лимфоидных клеток. Примененный метод позволяет в короткие сроки получать рекомбинантные варианты *Herpesvirus saimiri* с введенными в геном разнообразными экспрессионными кассетами.

Ключевые слова: герпесвирус, вирусный вектор, рекомбинантный штамм, химерный антигенный рецептор, ХАР

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (уникальный код проекта RFMEFI60418X0205).

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в методах исследования.

Информация о вкладе авторов: А. Хамад — работа с клеточными культурами, молекулярное клонирование; С. П. Чумаков — планирование исследования, работа с вирусными препаратами, трансфекция, титрование, анализ данных и подготовка рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Петрович Чумаков
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997; hathkul@gmail.com

Статья получена: 11.11.2019 **Статья принята к печати:** 25.11.2019 **Опубликована онлайн:** 11.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.079

ENGINEERING A RECOMBINANT HERPESVIRUS SAIMIRI STRAIN BY CO-CULTURING TRANSFECTED AND PERMISSIVE CELLS

Hamad A¹, Chumakov SP² ✉¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Recombinant herpesviruses can be used as oncolytic therapeutic agents and high packaging capacity vectors for delivering expression cassettes into the cell. *Herpesvirus saimiri* is a gamma-herpesvirus that normally infects squirrel monkeys but also has a unique ability to infect and immortalize human lymphocytes while allowing them to retain their mature phenotype and functional activity. Recombination of the *Herpesvirus saimiri* genome in permissive cells is impeded by its resistance to chemical transfection and electroporation. The aim of this study was to develop an effective method for incorporating expression cassettes into the genome of *Herpesvirus saimiri* without having to transfect a permissive cell culture. Transfected HEK-293T cells expressing glycoproteins of the measles virus vaccine strain were co-cultured with permissive OMK cells infected with *Herpesvirus saimiri*. Cell fusion and formation of syncytia stimulated recombination between the viral genome and the expression cassette; this allowed us to obtain a recombinant *Herpesvirus saimiri* variant without chemical transfection in permissive cells. The genetically modified virus expressed a selectable marker and retained its ability to persist in the cell in the latent state; it also caused immortalization of primary lymphoid cells. The proposed approach allows engineering recombinant *Herpesvirus saimiri* strains carrying a variety of expression cassettes in its genome.

Keywords: herpesvirus, viral vector, recombinant strain, chimeric antigen receptor, CAR

Funding: this study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project ID RFMEFI60418X0205).

Acknowledgement: we thank to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Author contribution: Hamad A — manipulations on cell cultures, molecular cloning; Chumakov SP — study plan; manipulations on viral stocks, transfection, titration, data analysis, manuscript preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan P. Chumakov
Miklouho-Maclay, 16/10, Moscow, 117997; hathkul@gmail.com

Received: 11.11.2019 **Accepted:** 25.11.2019 **Published online:** 11.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.079

Герпесвирусы — большое семейство ДНК-содержащих вирусов, которые поражают человека и животных. Вирусы обладают протяженным геномом, кодирующим около 100–200 генов, чья репликация происходит в ядре зараженной клетки. Сборка и выход новых вирусных частиц из клеток

сопровождается цитолизом. Особенностью вирусов семейства является способность к существованию в латентной форме. Полноразмерный геном герпесвируса при этом сохраняется в ядре клетки в форме эписом, реплицирующихся с той же скоростью, что и геном клетки-

хозяина, и распределяющихся между дочерними клетками в процессе деления за счет ассоциации с центромерными участками хроматид. Латентная форма существования герпесвирусов сопровождается экспрессией небольшого числа специализированных генов и протекает бессимптомно [1]. Представители подсемейства гамма-герпесвирусов, обладающие тропизмом к лимфоидным клеткам, нередко обладают онкогенными свойствами: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) [2] и вирус саркомы Капоши (ВСК) [3] ассоциированы с лимфопролиферативными заболеваниями, в частности В-клеточными неоплазиями. ВЭБ часто является причиной спонтанной иммортализации В-клеток, полученных из крови здоровых людей [4].

Филогенетический родственник ВСК, гамма-герпесвирус из подсемейства радиовирусов *Herpesvirus saimiri* (HVS) поражает беличьих обезьянок Нового света. Инфекция чаще всего протекает бессимптомно, и большинство обезьян этого вида являются латентными носителями вируса. Примечательно, что заражение этим вирусом других видов обезьян Нового света приводит к стремительному развитию Т-клеточных лейкозов и быстрой гибели животных. В опытах с мононуклеарными клетками животных было показано, что вирус способен вызывать спонтанную иммортализацию Т-лимфоцитов [5]. Такое же действие обнаружено и при инфицировании штаммами С HVS человеческих лимфоцитов и натуральных киллеров [6]. Клетки приобретали способность к неограниченной IL2-зависимой пролиферации, не теряя фенотипических признаков зрелых Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [7]. Экспрессия сохранялась у трех вирусных генов: ассоциированных с трансформацией *STP* и *TIP* [8], а также у *ORF73* [9] — гомолога ассоциированного с латентностью антигена (LANA) ВСК, который необходим для распределения эписом между дочерними клетками в процессе митоза [10]. Геном вируса оставался в них в латентной форме, а попытки вызвать развитие литической инфекции либо иным способом зафиксировать появление вирулентных частиц в культурах иммортизированных лимфоидных клеток человека или обезьян Старого света оканчивались неудачей. В опытах на макаках было показано, что аутологичная реинфузия Т-лимфоцитов, иммортизированных наиболее агрессивным штаммом HVS C488, не приводит к развитию неоплазий. Вирусная ДНК могла быть обнаружена в образцах периферических мононуклеаров животных в течение как минимум 16 недель, а сами животные приобретали иммунитет к инфекции HVS [11].

Для создания модифицированных вариантов герпесвирусов, способных выступать в качестве векторов для экспрессии трансгенов, была успешно использована гомологичная рекомбинация участков вирусного генома в перmissive клеточных культурах, а также рекомбинирование в бактериальных хромосомах (*bacterial artificial chromosome*, BAC) [12]. В бактериальную хромосому клонировали геном HVS штамма A11-S4. Геном HVS содержит несколько гомологов клеточных генов, большинство из которых встречаются и у других вирусов подсемейства. В отличие от остальных, ген *vCD59* не встречается в геноме других гамма-герпесвирусов, а рецептор, последовательность которого он кодирует, отвечает за подавление опосредованной комплектом цитотоксичности [13]. Этот ген экспрессируется только в литической фазе и не нужен для наработки вирусных частиц в условиях *in vitro*. В работах, посвященных созданию векторов на основе HVS, последовательность *vCD59* успешно замещали экспрессионными кассетами [14].

Совокупность имеющихся данных позволяет сделать предположение, что HVS можно использовать для создания новых клеточных иммунотерапевтических агентов [15]. HVS-трансформированные Т-лимфоциты и НК-клетки сохраняют свои эффекторные функции и могут быть таргетированы против опухолевых антигенов за счет экспрессии химерных рецепторов. Основное преимущество такого подхода в возможности получения неограниченного количества эффекторных клеток из относительно небольших объемов периферической крови пациента либо проведения аллогенных трансплантаций клеточных препаратов. Большой размер генома HVS и его высокая емкость как вектора [14] делают возможным проведение иммортализации и трансдукции экспрессионной кассетой в один этап. Целью настоящей работы было создание быстрого способа получения рекомбинантных вариантов HVS на основе штамма C488, которые могут быть использованы для введения в геном вируса разнообразных трансгенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток и наработка вирусных препаратов

Использованные в работе линии клеток НЕК-293Т (культура человеческих трансформированных клеток), ОМК (культура клеток почки ночной обезьяны *Aotus trivirgatus*), А549 (культура клеток легочной карциномы) были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC; США). Их культивировали в среде DMEM-F12 (PAA; Австрия), в которую добавляли 10%-ю эмбриональную сыворотку телят, 2 мМ аланилглутамин (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (ПанЭко; Россия).

Периферические мононуклеарные клетки (PBMC) культивировали в среде RPMI-1640 (PAA; Австрия) с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки телят, 2 мМ аланилглутамин (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина, а также 70 нг/мл IL2 (Peprotech; США). Все клетки содержали в условиях 5%-го CO₂ при 37 °C.

Вирус штамма HVS-C488 (VR-1414) был получен из ATCC. Для наработки вирусных препаратов субконфлюэнтную культуру клеток линии ОМК заражали небольшим количеством вируса (MOI < 0,1) и культивировали в соответствующей питательной среде в течение 5–15 дней до наступления полного цитолиза. Затем собирали вирусосодержащую жидкость и центрифугировали 15 мин при 5000 g на центрифуге Eppendorf 5920R (Eppendorf; ФРГ) для удаления клеточного дебриса. Собирали супернатант, разделяли на рабочие порции и хранили при –20 °C.

Плазмидные конструкции

Плазмиды с экспрессорами поверхностных гликопротеинов кори pCG-4AHCΔ24 и pMD2-FΔ30 были получены ранее. Для введения в геном HVS экспрессионной кассеты создали конструкцию pUC-HVS-OFP. Участок вирусного генома, кодирующий *vCD59*, использовали как сайт для проведения рекомбинации. В качестве гомологичных участков были выбраны 600-нуклеотидные последовательности, соответствующие 3'- и 5'-концам *vCD59*. Фрагменты ДНК получали при помощи ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной из концентрированного препарата HVS. Между

фланкирующими участками в экспрессионную кассету был помещен промотор вируса некроза селезенки мышей (SFFV) и последовательности генов устойчивости к пуромицину (*pac*) и оранжевого флуоресцентного белка (OFP), экспрессируемые полицистронно за счет помещенной между ними последовательности сигнального пептида T2A. Последовательность, состоящая из фланкирующих участков по 600 п.н. каждый, гомологичных области *vCD59* генома HVS, и расположенной между ними экспрессионной кассеты, клонировали в плазмидо-носитель pUC18 (рис. 1) по рестриктивным сайтам *NotI* и *BamHI*. Клонированный фрагмент собрали из трех частей методом перекрывающего ПЦР [16]. Праймеры, использованные для амплификации участков генома HVS и экспрессионной кассеты, представлены в табл. 1. Последовательности готовых конструкций и препараты ДНК рекомбинантного HVS верифицировали при помощи секвенирования по Сэнгеру (Евроген; Россия).

Трансфекция

Для определения наиболее эффективного способа трансфекции клеток линии ОМК использовали катионный полимер полиэтиленимина 25 кДа (PEI-25) (Polysciences; США), катионный липид Lipofectamine 2000 (Invitrogen; США), а также электропорацию. За сутки до проведения трансфекции клетки рассеивали на культуральные чашки диаметром 10 см (SPL; Корея) в количестве 2×10^6 клеток на чашку. Для трансфекции использовали либо кольцевую форму плазмиды pUC-HVS-OFP, либо линейаризованную непосредственно перед проведением трансфекции путем рестрикции по сайтам расщепления эндонуклеазами *NotI* и *BamHI*. Для трансфекции с помощью PEI-25 использовали описанные ранее условия и буферы [17]: плазмидную ДНК смешивали с PEI-25 (5 мкг/мкл) в соотношении 6 : 1 в лактатном буфере с pH 4, смесь инкубировали в течение 15 мин, после чего добавляли среду OptiMEM (Invitrogen; США) и вносили в культуральную среду на чашки с клетками. Для определения оптимальных условий трансфекции проводили трансфекцию с 3, 5, 10, 15 и

20 мкг кольцевой плазмиды, либо с 1, 3, 5, 10 или 15 мкг линейаризованной плазмиды. Трансфекцию при помощи катионного липида Lipofectamine 2000 (Invitrogen; США) проводили в соответствии с рекомендациями производителя; использовали по 7, 10 и 15 мкг плазмидной ДНК в кольцевой либо линейаризованной форме и 17,5, 25 и 37,5 мкл реагента соответственно. Через 3 ч после постановки трансфекции обоими методами проводили смену среды на обычную, используемую для культивации клеток ОМК. Для проведения электропорации клетки открепляли от чашек при помощи раствора TrypLE (Gibco; США), центрифугировали при 1100 об./мин в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf 5702 (Eppendorf; ФРГ), осажденные клетки ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера. Саму электропорацию проводили при помощи электропоратора GenePulser (Bio-Rad; США) в кюветках с межэлектродным расстоянием 4 мм, с параметрами 300 в / 500 мФ, либо 200 в / 250 мФ, перед электропорацией к клеткам добавляли по 5 либо 10 мкг кольцевой или линейной плазмидной ДНК. После электропорации клетки немедленно высевали чашки диаметром 10 см с добавлением 10 мл полной питательной среды. Через 48 ч после постановки трансфекции, долю трансфицированных клеток измеряли на проточном цитометре FACS Vantage SE (Beckton-Dickinson; США). Оценку жизнеспособности клеточных культур производили путем подсчета клеток в образцах после их открепления при помощи TrypLE и окрашивания раствором трипанового синего (Панэко; Россия) при помощи Cytosmart Cell Counter (Corning; США).

Трансфекцию проводили на 6-луночных планшетах в среде для культивирования OptiMEM с использованием PEI-25 на клетках HEK-293T в плотности 40–60% от монослоя, рассеянных накануне. Использовали плазмиды pUC-HVS-OFP, содержащие экспрессионную кассету, фланкированную гомологичными участками из генома HVS, и плазмиды, экспрессирующие поверхностные гликопротеины F (от англ. *fusion protein* — белок слияния) и H (от англ. *haemagglutinin* — гемагглютинин) вакцинного штамма (ЭШЧ) вируса кори. Для экспрессии белков F и H использовали плазмиды pMD2-FΔ30 и pCG-4HΔ24 соответственно;

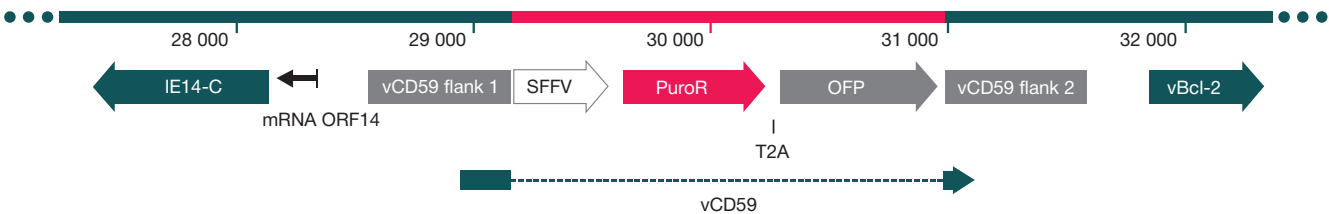


Рис. 1. Схематичная организация участка генома HVS в области гена *vCD59* после интеграции экспрессионной кассеты. «*vCD59 flank 1*» и «*vCD59 flank 2*» — области генома, использованные в качестве участков гомологии для рекомбинации

Таблица 1. Последовательности праймеров, использовавшиеся для сборки экспрессионной кассеты

Название	Нуклеотидная последовательность
vCD59 F1 dir	AGAGAGGCGGCCGACAGGCTGCTCTTCAGGAGCACCAG
vCD59 F1 rev	CAATTGATTTGAGATGCGTTTGAAGC
vCD59 F1 bridge	GCAAATGGCGTTACCTCGAGCAATTGATTTGAGATGCGTTTGAAGC
SFFV dir	CTCGAGGTAACGCCATTTTGC
OFP rev	CCTGCAGGTCAAGCTTCGAA
vCD59 F2 bridge	TTCGAAGCTTGACCTGCAGGTCTGAAACACAGTTAAAGTATCATTGTTG
vCD59 F2 dir	TCTGAAACACAGTTAAAGTATCATTGTTG
vCD59 F2 BamHI rev	TCTCTCGGATCCGCTGGCAGATATTTCTTTTATAAACAGG
vCD59 F1 diag dir	GCACAGGCTGCTCTTCAGGAGCACCAG
vCD59 F2 diag rev	GCTGGCAGATATTTCTTTTATAAACAGG

pMD2-FΔ30 кодировала последовательность белка F с укороченным на 30 аминокислотных остатков С-концевым цитоплазматическим доменом, а pCG-4АНсΔ24 кодировала последовательность белка Н, в которой первые 24 аминокислоты N-концевого цитоплазматического домена были замещены четырьмя остатками аланина, белки экспрессировались под контролем цитомегаловирусного промотора. При проведении котрансфекции плазмиды pUC-HVS-OFP, pMD2-FΔ30 и pCG-4АНсΔ24 смешивали в соотношении 8 : 7 : 1 соответственно. После трехчасовой инкубации клеток с трансфекционной смесью клетки диссоциировали раствором трипсина (ПанЭко; Россия) и культивировали совместно с инфицированными HVS-C488 клетками линии ОМК в соотношениях, представленных в табл. 2.

Титрование и клонирование вирусных препаратов

Для определения инфекционного титра вируса осуществляли инфекцию последовательными пятикратными разведениями вирусного препарата клеток ОМК в 96-луночных планшетах (Greiner; Австрия) в четырех повторностях. После наступления цитопатического действия (ЦПД) рассчитывали инфекционный титр методом Рида–Менча. Для клонирования рекомбинантного HVS-OFP на лунки 96-луночного планшета, в которые за 24 ч до этого были рассеяны свежие клетки линии ОМК в субкофлюэнтном количестве, добавляли культуральную среду, содержащую предварительно отсортированные на проточном клеточном сортировщике FACS Vantage SE (Beckton-Dickinson; США) инфицированные флуоресцирующие клетки ОМК в известной концентрации, из расчета 10, 1, 0,1 и 0,01 инфицированной клетки на лунку. Через 5–7 дней в лунках определяли наличие единичных флуоресцирующих фокальных очагов ЦПД.

Определение рекомбинантов

Для подтверждения события рекомбинации клонированные препараты HVS-OFP концентрировали при помощи центрифужных концентраторов Amicon Ultra 3 kDa (Merck; Германия), после чего определяли наличие целевой вставки в геноме HVS при помощи ПЦР с праймерами vCD59 F1 diag dir и vCD59 F2 diag rev. Продукт реакции длиной ~3000 п.н. указывал на присутствие целевой вставки, а длиной ~1200 п.н. — на вирус «дикого» фенотипа.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ Prism 6.0 (GraphPad Software; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения рекомбинации и получения трансгенного варианта HVS-C488 была создана экспрессионная кассета, содержащая два селективных маркера — ген оранжевого флуоресцентного белка OFP и ген устойчивости к пуромицину, кодирующий пуромицин-N-ацетилтрансферазу (Pac). Поиск оптимальных условий трансфекции вируспермиссивных клеток линии ОМК показал, что наибольшей эффективности можно добиться при использовании PEI-25 и линейного фрагмента экспрессионной кассеты (соотношение PEI : ДНК составляет 6 : 1; 10 мкг ДНК на 2 × 10⁶ клеток; табл. 3), однако доля трансфицированных клеток не превышала 5% от общей численности популяции (рис. 2). Увеличение количества ДНК и трансфекционного агента приводило к сильному снижению жизнеспособности клеточной культуры; при использовании электропорации снижения жизнеспособности не наблюдалось, однако доля трансфицированных клеток оставалась крайне малой. Чтобы оценить, может ли трансфекция с максимальной достигнутой эффективностью приводить к образованию рекомбинантных вирусных частиц, вызывающих экспрессию селективных маркеров в инфицированных клетках, мы собрали осветленные вирусосодержащие культуральные жидкости с предварительно инфицированных HVS-C488 клеток линии ОМК, которые были трансфицированы при помощи PEI-25 и линейного фрагмента экспрессионной кассеты. Культуральные жидкости были использованы для инфицирования свежих ОМК, последующее наблюдение за которыми не выявило наличия клеток, экспрессирующих флуоресцентный маркер.

Чтобы повысить вероятность рекомбинации HVS и экспрессионной кассеты, был разработан альтернативный способ доставки модифицированной ДНК в пермиссивные клетки. Мы предположили, что способность поддерживать литический цикл развития вируса у клеток линии ОМК сохранится после слияния с некоторым количеством непермиссивных клеток HEK-293T, которые непосредственно перед этим могут быть трансфицированы экспрессионной кассетой. Для проведения рекомбинации в смешанной клеточной системе клетки линии HEK-293T трансфицировали линеаризованной экспрессионной кассетой либо нелинеаризованной плазмидой, ее содержащей, совместно с плазмидами, кодирующими поверхностные гликопротеины вакцинного штамма вируса кори (белки F и Н с укороченными цитоплазматическими доменами), появление которых на клеточной мембране вызывает слияние контактирующих клеток в синцитии за счет связывания с рецептором CD46 (рис. 3Г, Д). Через 3 ч после трансфекции клетки переводили в суспензию и рассеивали на лунки совместно с клетками ОМК, которые

Таблица 2. Количества клеток и их соотношения, использованные при совместной культивации, и инфекционный вирусный титр, зафиксированный в супернатантах

№	ОМК (тыс.)	HEK-293T (тыс.)	Соотношение	Вирусный титр
1	450	1333	0,34	1,60E + 03
2	100	1333	0,08	8,00E + 02
3	23	1333	0,02	0
4	68	200	0,34	2,56E + 04
5	27	200	0,14	1,28E + 04
6	10	200	0,05	0
7	450	133	3,38	2,56E + 04
8	225	266	0,85	2,56E + 04

за 2 дня до трансфекции были заражены HVS-C488 (MOI = 4) в различных соотношениях и плотностях посадки (см. табл. 2).

Через 4 дня после начала совместной культивации с клеток собирали вирусосодержащий супернатант и определяли инфекционный титр вируса. После сравнения концентраций инфекционных частиц образец № 5 был выбран в качестве оптимального для селекции моноклонального рекомбинантного вируса, поскольку в нем зафиксировали максимальный инфекционный титр относительно общего содержания вируспермиссивных клеток и их соотношения с клетками HEK-293T.

Вирусосодержащую среду, собранную с образца № 5, использовали для инфицирования ОМК (MOI = 0,01), через 7 дней в конфлюэнтной клеточной культуре начали образовываться фокальные участки развития цитолитической инфекции, среди которых были обнаружены отдельные бляшки, сформированные преимущественно флуоресцентными клетками (рис. 3Б). Популяцию флуоресцирующих клеток отсортировали и использовали для инфицирования пермиссивных клеток на 96-луночной планшете из расчета 10, 1, 0,1 и 0,01 инфицированных клеток на лунку. Через 10 дней после инфицирования в образцах, подвергшихся заражению с множественностью 0,1 клеток на лунку были зафиксированы 3 (из 96) единичные флуоресцентные бляшки, образованные, по-видимому, индивидуальными рекомбинировавшими вирусными частицами. Вирусосодержащую среду из лунки № 2, в которой был зафиксирован наиболее активно развивающийся литический процесс, использовали для наработки препаративных количеств рекомбинантного вирусного препарата и его анализа.

Секвенирование участка vCD59 ДНК препарата рекомбинантного герпесвируса HVS-ORF показало наличие в нем целевой экспрессионной кассеты. Трансдукция периферических мононуклеарных клеток и клеток линии A549 вирусом HVS-ORF (MOI = 5) привела к образованию фракций флуоресцирующих клеток (рис. 3В, Г); для линии A549 их доля сохранялась постоянной в течение 5 недель после инфицирования, а для PBMC — постоянно увеличивалась (рис. 3А). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что полученный рекомбинантный вариант герпесвируса HVS-ORF не утратил способности находиться в клетках в латентной форме и вызывать иммортализацию нормальных лимфоидных клеток. Экспрессия введенной кассеты при этом сохраняется как в литической, так и в латентной фазе существования герпесвируса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании был разработан и успешно испытан новый подход для генетической инженерии герпесвирусов методом рекомбинации. Использование экспрессионной кассеты, содержащей два селективных маркера, было обусловлено результатами испытания разных способов повышения вероятности прохождения рекомбинации — предполагалось, что проведение селекции с пурамицином либо сортировки флуоресцентных ОМК непосредственно после трансфекции позволит удалить из популяции нетрансфицированные клетки. Попытки реализовать такую схему селекции показали, что времени, проходящего с момента введения экспрессионной кассеты до проявления цитопатического действия и выхода вируса в среду, недостаточно для селекции с помощью пурамицина, а

Таблица 3. Условия трансдукции пермиссивных клеток линии ОМК экспрессионной кассетой для рекомбинации HVS и достигнутые значения эффективности

Метод трансдукции	Условия	Доля трансдуцированных клеток	Снижение жизнеспособности
PEI-25	3 мкг кольцевой ДНК	0,7% ± 0,15%	–
	5 мкг кольцевой ДНК	1,82% ± 0,15%	–
	10 мкг кольцевой ДНК	3,73% ± 0,15%	+/-
	15 мкг кольцевой ДНК	3,13% ± 0,15%	+
	20 мкг кольцевой ДНК	1,77% ± 0,15%	+
	1 мкг линейной ДНК	< 0,15% ± 0,15%	–
	3 мкг линейной ДНК	0,85% ± 0,15%	–
	5 мкг линейной ДНК	1,91% ± 0,15%	–
	10 мкг линейной ДНК	4,76% ± 0,15%	+/-
	15 мкг линейной ДНК	3,2% ± 0,15%	+
Lipofectamine 2000	7 мкг кольцевой ДНК	3,11% ± 0,15%	–
	10 мкг кольцевой ДНК	4,11% ± 0,15%	–
	15 мкг кольцевой ДНК	4,09% ± 0,15%	+
	7 мкг линейной ДНК	3,18% ± 0,15%	–
	10 мкг линейной ДНК	4,63% ± 0,15%	–
	15 мкг линейной ДНК	4,54% ± 0,15%	+
Электропорация	5 мкг кольцевой ДНК, 200V/250uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	10 мкг кольцевой ДНК, 200V/250uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	5 мкг линейной ДНК, 200V/250uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	10 мкг линейной ДНК, 200V/250uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	5 мкг кольцевой ДНК, 300V/500uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	10 мкг кольцевой ДНК, 300V/500uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	5 мкг линейной ДНК, 300V/500uF	< 0,15% ± 0,15%	–
	10 мкг линейной ДНК, 300V/500uF	< 0,15% ± 0,15%	–

стресс, сопутствующий флуоресцентной сортировке трансдуцированных клеток, приводит к подавлению продукции вируса. Вместе с тем, наличие двух селективных маркеров позволяет с большим удобством проводить отбор и мониторинг доли клеточной популяции, трансдуцированной рекомбинантным HVS. Применительно к использованному вирусному штамму HVS-C488 разработанный подход позволяет обойти главное препятствие — низкую эффективность трансфекции перmissiveй клеточной популяции трансгенной кассетой

[18], в то время как для других описанных на настоящий момент методик рекомбинации HVS этот этап является ключевым [15, 19]. Эффективность прохождения рекомбинации зависит от длины рекомбинируемого участка, поэтому введение экспрессоров нескольких генов с большой общей протяженностью потребует либо нескольких последовательных стадий рекомбинирования, либо масштабирования трансфекции и селекции на большее количество клеток. При выполнении подобных задач разработанный метод уступает по своей эффективности

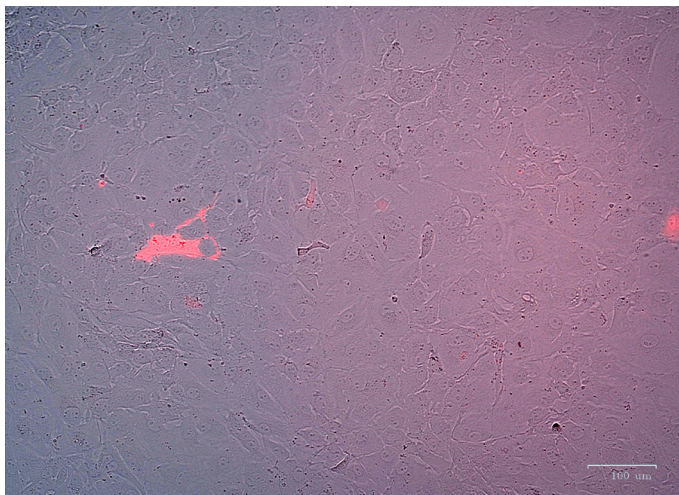


Рис. 2. Популяция вируспермиссивных клеток линии ОМК, трансдуцированных экспрессионной кассетой SFFV-PUR-OFF

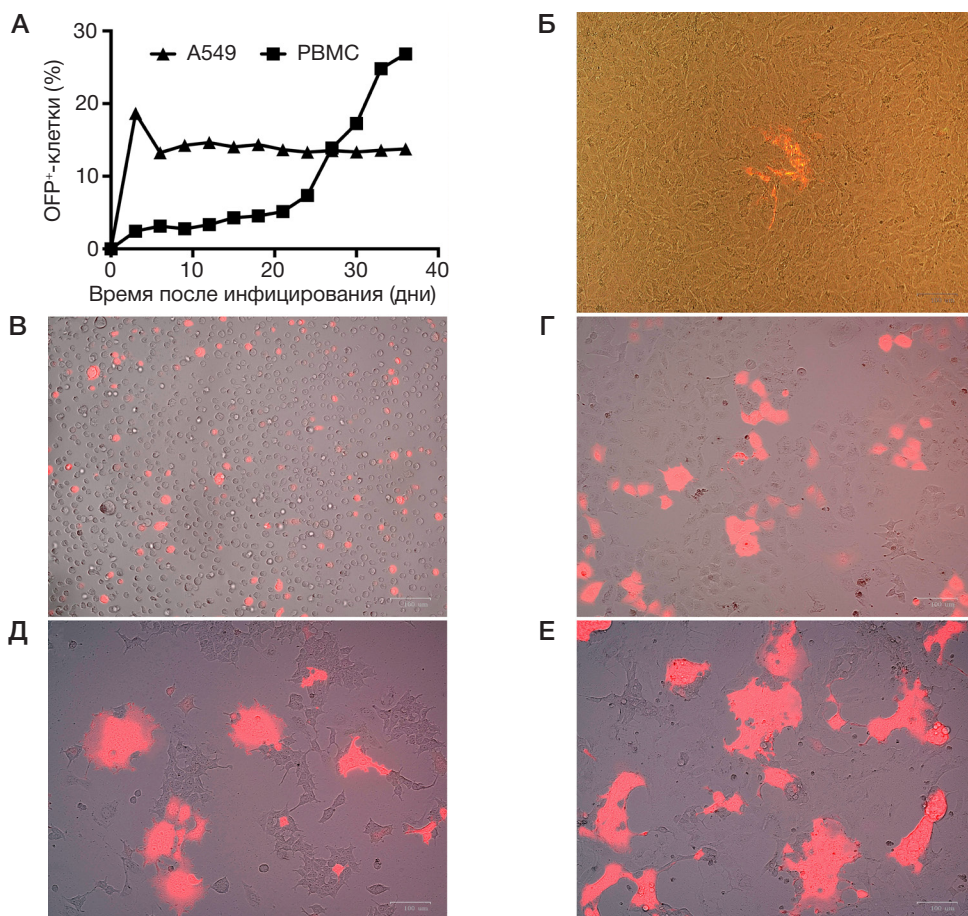


Рис. 3. А. Динамика изменения численности флуоресцентных популяций после инфицирования HVS-OFF. Б. Флуоресцентная бляшка, образованная при инфицировании рекомбинантным HVS-OFF культуры клеток ОМК. В, Г. PBMC (В) и A549 (Г), трансдуцированные HVS-OFF. Д, Е. Совместная культивация трансфицированных рекомбинантной кассетой и экспрессорами гликопротеинов вакцинного штамма кори HEK-293T и инфицированных HVS ОМК в низкой (Д) и высокой (Е) плотностях

методам рекомбинирования в бактериальной хромосоме, которые показали свою эффективность, в том числе при манипулировании геномом HVS [20, 21]. Хотя рекомбинирование в эукариотической системе в целом отличается большей трудоемкостью, чем проведение аналогичных манипуляций в бактериальной хромосоме, этот метод может быть предпочтительным, когда требуется создание единичных трансгенных вариантов, либо для подготовки вирусного генома к клонированию в ВАС, например добавления селективной кассеты для облегчения рекомбинирования. Такое применение представляется нам особенно интересным в связи с тем, что геном штамма C488, который способен с наибольшей эффективностью вызывать трансформацию человеческих Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [22], пока не был клонирован в ВАС.

В перспективе разработанный метод может позволить получать химерные вирусные частицы, лишённые генов, необходимых при развитии литической инфекции, и пригодные для препаративного получения immortalized лимфоидных клеток с целью проведения иммунотерапии. Стоит отметить, что большая клонирующая емкость герпесвирусного вектора [23] позволяет использовать его для одновременной доставки практически всего инструментария CAR-T клеточной терапии — моно- и биспецифичных химерных антигенных рецепторов либо даже их полноразмерных пар для точного нацеливания на специфический фенотип опухолевых клеток; средств подавления экспрессии рецепторов иммунных контрольных точек для снижения чувствительности к иммуносупрессивным сигналам; индуцируемых экспрессионных кассет для секреции цитокинов, стимулирующих опухолевое микроокружение, а

также защитных механизмов, позволяющих индуцировать «самоубийство» модифицированных лимфоцитов и быстро элиминировать их из организма пациента в случае развития побочных эффектов терапии либо успешного окончания лечения. В сочетании со способностью к иммортализации периферических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров такой вектор можно использовать в целях создания серии готовых препаратов для аллогенной клеточной иммунотерапии, которые могут быть практически неограниченно наработаны *ex vivo*.

ВЫВОДЫ

Использование совместной культивации трансфицированных экспрессионной кассетой и экспрессорами поверхностных гликопротеинов кори Fd30 и Hd24 в соотношении 8 : 1 : 7 клеток линии HEK-293T и инфицированных за 48 ч до эксперимента диким вариантом HVS-C488 пермиссивных клеток линии ОМК (MOI = 4) в соотношении 27 : 200 привело к высокой частоте возникновения рекомбинантных вирусных частиц (~3%) и позволило за три пассажа получить готовый вирусный препарат с интегрированной экспрессионной кассетой. Полученный рекомбинантный герпесвирус HVS-OFP сохранял способность вызывать литическую инфекцию только в пермиссивных клетках линии ОМК и самоподдерживаться в латентной фазе в клетках линии A549. Вирус вызвал иммортализацию человеческих периферических мононуклеарных клеток, также сохраняясь в них в латентной форме. Введенная в геном вируса экспрессионная кассета оставалась работоспособной как в процессе литической инфекции, так и в латентной форме существования герпесвируса.

Литература

1. Davison AJ. Overview of classification. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge, 2007.
2. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. Cancer Res. 2008; 68 (19): 7693–706. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3301. PubMed PMID: 18829521.
3. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science. 1994; 266 (5192): 1865–9. DOI: 10.1126/science.7997879. PubMed PMID: 7997879.
4. Fu Z, Cannon MJ. Functional analysis of the CD4(+) T-cell response to Epstein-Barr virus: T-cell-mediated activation of resting B cells and induction of viral BZLF1 expression. J Virol. 2000; 74 (14): 6675–9. DOI: 10.1128/jvi.74.14.6675-6679.2000. PubMed PMID: 10864684.
5. Fickenscher H, Fleckenstein B. Herpesvirus saimiri. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001; 356 (1408): 545–67. DOI: 10.1098/rstb.2000.0780. PubMed PMID: 11313011.
6. Biesinger B, Muller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, et al. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89 (7): 3116–9. DOI: 10.1073/pnas.89.7.3116. PubMed PMID: 1313581.
7. Vogel B, Tennert K, Full F, Ensser A. Efficient generation of human natural killer cell lines by viral transformation. Leukemia. 2014; 28 (1): 192–5. DOI: 10.1038/leu.2013.188. PubMed PMID: 23787393.
8. Duboise SM, Guo J, Czajak S, Desrosiers RC, Jung JU. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. J Virol. 1998; 72 (2): 1308–13. PubMed PMID: 9445031.
9. Griffiths R, Whitehouse A. Herpesvirus saimiri episomal persistence is maintained via interaction between open reading frame 73 and the cellular chromosome-associated protein MeCP2. J Virol. 2007; 81 (8): 4021–32. DOI: 10.1128/JVI.02171-06. PubMed PMID: 17267510.
10. Verma SC, Robertson ES. ORF73 of herpesvirus Saimiri strain C488 tethers the viral genome to metaphase chromosomes and binds to cis-acting DNA sequences in the terminal repeats. J Virol. 2003; 77 (23): 12494–506. DOI: 10.1128/jvi.77.23.12494-12506.2003. PubMed PMID: 14610173.
11. Knappe A, Feldmann G, Dittmer U, Meinel E, Nisslein T, Wittmann S, et al. Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. Blood. 2000; 95 (10): 3256–61. PubMed PMID: 10807797.
12. Menotti L, Avitabile E, Gatta V, Malatesta P, Petrovic B, Campadelli-Fiume G. HSV as A Platform for the Generation of Retargeted, Armed, and Reporter-Expressing Oncolytic Viruses. Viruses. 2018; 10 (7). DOI: 10.3390/v10070352. PubMed PMID: 29966356.
13. Albrecht JC, Nicholas J, Biller D, Cameron KR, Biesinger B, Newman C, et al. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. J Virol. 1992; 66 (8): 5047–58. PubMed PMID: 1321287.
14. White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. J Gen Virol. 2003; 84 (Pt 12): 3393–403. DOI: 10.1099/vir.0.19387-0. PubMed PMID: 14645920.
15. Hiller C, Wittmann S, Slavin S, Fickenscher H. Functional long-term thymidine kinase suicide gene expression in human T cells using a herpesvirus saimiri vector. Gene Ther. 2000; 7 (8): 664–74. DOI: 10.1038/sj.gt.3301158. PubMed PMID: 10800089.

16. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 1989; 77 (1): 61–8. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90359-4. PubMed PMID: 2744488.
 17. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
 18. Turrell SJ, Whitehouse A. Mutation of herpesvirus Saimiri ORF51 glycoprotein specifically targets infectivity to hepatocellular carcinoma cell lines. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 785158. DOI: 10.1155/2011/785158. PubMed PMID: 21197456.
 19. Duboise SM, Guo J, Desrosiers RC, Jung JU. Use of virion DNA as a cloning vector for the construction of mutant and recombinant herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (21): 11389–94. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11389. PubMed PMID: 8876145.
 20. White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J Gen Virol*. 2003; 84 (Pt 12): 3393–403. DOI: 10.1099/vir.0.19387-0. PubMed PMID: 14645920.
 21. Collins CM, Medveczky MM, Lund T, Medveczky PG. The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *J Gen Virol*. 2002; 83 (Pt 9): 2269–78. DOI: 10.1099/0022-1317-83-9-2269. PubMed PMID: 12185282.
 22. Ensser A, Thureau M, Wittmann S, Fickenscher H. The genome of herpesvirus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. *Virology*. 2003; 314 (2): 471–87. DOI: 10.1016/s0042-6822(03)00449-5. PubMed PMID: 14554077.
 23. Macnab S, White R, Hiscox J, Whitehouse A. Production of an infectious Herpesvirus saimiri-based episomally maintained amplicon system. *J Biotechnol*. 2008; 134 (3–4): 287–96. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.01.012. PubMed PMID: 18328588.
- References**
1. Davison AJ. Overview of classification. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge, 2007.
 2. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Res*. 2008; 68 (19): 7693–706. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3301. PubMed PMID: 18829521.
 3. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994; 266 (5192): 1865–9. DOI: 10.1126/science.7997879. PubMed PMID: 7997879.
 4. Fu Z, Cannon MJ. Functional analysis of the CD4(+) T-cell response to Epstein-Barr virus: T-cell-mediated activation of resting B cells and induction of viral BZLF1 expression. *J Virol*. 2000; 74 (14): 6675–9. DOI: 10.1128/jvi.74.14.6675-6679.2000. PubMed PMID: 10864684.
 5. Fickenscher H, Fleckenstein B. Herpesvirus saimiri. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356 (1408): 545–67. DOI: 10.1098/rstb.2000.0780. PubMed PMID: 11313011.
 6. Biesinger B, Muller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, et al. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89 (7): 3116–9. DOI: 10.1073/pnas.89.7.3116. PubMed PMID: 1313581.
 7. Vogel B, Tennert K, Full F, Ensser A. Efficient generation of human natural killer cell lines by viral transformation. *Leukemia*. 2014; 28 (1): 192–5. DOI: 10.1038/leu.2013.188. PubMed PMID: 23787393.
 8. Duboise SM, Guo J, Czajak S, Desrosiers RC, Jung JU. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J Virol*. 1998; 72 (2): 1308–13. PubMed PMID: 9445031.
 9. Griffiths R, Whitehouse A. Herpesvirus saimiri episomal persistence is maintained via interaction between open reading frame 73 and the cellular chromosome-associated protein MeCP2. *J Virol*. 2007; 81 (8): 4021–32. DOI: 10.1128/JVI.02171-06. PubMed PMID: 17267510.
 10. Verma SC, Robertson ES. ORF73 of herpesvirus Saimiri strain C488 tethers the viral genome to metaphase chromosomes and binds to cis-acting DNA sequences in the terminal repeats. *J Virol*. 2003; 77 (23): 12494–506. DOI: 10.1128/jvi.77.23.12494-12506.2003. PubMed PMID: 14610173.
 11. Knappe A, Feldmann G, Dittmer U, Mehl E, Nisslein T, Wittmann S, et al. Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. *Blood*. 2000; 95 (10): 3256–61. PubMed PMID: 10807797.
 12. Menotti L, Avitabile E, Gatta V, Malatesta P, Petrovic B, Campadelli-Fiume G. HSV as A Platform for the Generation of Retargeted, Armed, and Reporter-Expressing Oncolytic Viruses. *Viruses*. 2018; 10 (7). DOI: 10.3390/v10070352. PubMed PMID: 29966356.
 13. Albrecht JC, Nicholas J, Biller D, Cameron KR, Biesinger B, Newman C, et al. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J Virol*. 1992; 66 (8): 5047–58. PubMed PMID: 1321287.
 14. White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J Gen Virol*. 2003; 84 (Pt 12): 3393–403. DOI: 10.1099/vir.0.19387-0. PubMed PMID: 14645920.
 15. Hiller C, Wittmann S, Slavin S, Fickenscher H. Functional long-term thymidine kinase suicide gene expression in human T cells using a herpesvirus saimiri vector. *Gene Ther*. 2000; 7 (8): 664–74. DOI: 10.1038/sj.gt.3301158. PubMed PMID: 10800089.
 16. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 1989; 77 (1): 61–8. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90359-4. PubMed PMID: 2744488.
 17. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
 18. Turrell SJ, Whitehouse A. Mutation of herpesvirus Saimiri ORF51 glycoprotein specifically targets infectivity to hepatocellular carcinoma cell lines. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 785158. DOI: 10.1155/2011/785158. PubMed PMID: 21197456.
 19. Duboise SM, Guo J, Desrosiers RC, Jung JU. Use of virion DNA as a cloning vector for the construction of mutant and recombinant herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (21): 11389–94. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11389. PubMed PMID: 8876145.
 20. White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J Gen Virol*. 2003; 84 (Pt 12): 3393–403. DOI: 10.1099/vir.0.19387-0. PubMed PMID: 14645920.
 21. Collins CM, Medveczky MM, Lund T, Medveczky PG. The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *J Gen Virol*. 2002; 83 (Pt 9): 2269–78. DOI: 10.1099/0022-1317-83-9-2269. PubMed PMID: 12185282.
 22. Ensser A, Thureau M, Wittmann S, Fickenscher H. The genome of herpesvirus saimiri C488 which is capable of transforming human T cells. *Virology*. 2003; 314 (2): 471–87. DOI: 10.1016/s0042-6822(03)00449-5. PubMed PMID: 14554077.
 23. Macnab S, White R, Hiscox J, Whitehouse A. Production of an infectious Herpesvirus saimiri-based episomally maintained amplicon system. *J Biotechnol*. 2008; 134 (3–4): 287–96. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.01.012. PubMed PMID: 18328588.

МУТАНТ ФОТОТОКСИЧНОГО БЕЛКА KILLERRED, НЕ ФОРМИРУЮЩИЙ DSRED-ПОДОБНОГО ХРОМОФОРА

Д. А. Горбачев, К. С. Саркисян ✉

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Генетически кодируемые фотосенсибилизаторы на основе флуоресцентных белков способны производить активные формы кислорода при облучении светом, и потому их широко используют в качестве оптогенетических инструментов. Разработанные на сегодняшний день фотосенсибилизаторы с зеленой флуоресценцией обладают неоптимальными свойствами. Целью настоящей работы был поиск новых вариантов флуоресцентных белков с эффективным созреванием хромофора и высокой фототоксичностью. С помощью случайного мутагенеза фототоксичного флуоресцентного белка KillerRed и направленной эволюции в *E. coli* получен белок с хромофором на основе тирозина, флуоресцирующий в зеленой области спектра. Новый белок, несущий мутации I64L, D114G и T115S, не формирует DsRed-подобного хромофора и может быть использован как базовый генотип для разработки новых спектрально отличных от KillerRed генетически кодируемых фотосенсибилизаторов.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, флуоресцентный белок, KillerRed, мутагенез, гипсохромный сдвиг, оптогенетика

Финансирование: работа не была бы опубликована без поддержки грантом РФФИ 18-04-01173 и грантом Президента РФ 075-15-2019-411. Исследования частично выполнены на оборудовании ЦКП ИБХ РАН.

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в методах исследования.

Информация о вкладе авторов: К. С. Саркисян, Д. А. Горбачев — планирование проекта, проведение экспериментов, анализ данных, подготовка рукописи статьи. Вклад авторов в работу равнозначен на всех этапах.

Соблюдение этических стандартов: в настоящей работе не проводили экспериментов на животных или людях, результаты не представляют интерес для создания технологий двойного назначения.

✉ **Для корреспонденции:** Карен Сергеевич Саркисян
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, оф. 34/632, г. Москва, 117997; karen.s.sarkisyan@gmail.com

Статья получена: 08.12.2019 **Статья принята к печати:** 18.12.2019 **Опубликована онлайн:** 20.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.084

A MUTANT OF THE PHOTOTOXIC PROTEIN KILLERRED THAT DOES NOT FORM DSRED-LIKE CHROMOPHORE

Gorbachev DA, Sarkisyan KS ✉

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Genetically encodable photosensitizers based on fluorescent proteins produce reactive oxygen species when illuminated with light. Although widely used as optogenetic tools, existing photosensitizers with green fluorescence possess suboptimal properties motivating for a search of new protein variants with efficient chromophore maturation and high phototoxicity. Here we report a mutant of the phototoxic fluorescent protein KillerRed protein with fluorescence in the green part of the spectrum. The mutant variant carries mutations I64L, D114G, and T115S and does not form a DsRed-like chromophore. The protein can be used as a template to create new genetically encodable photosensitizers that are spectrally different from KillerRed.

Keywords: photosensitizer, fluorescent protein, KillerRed, mutagenesis, hypsochromic shift, optogenetics

Funding: this work would not have been published without the generous support and the strict publication requirements of the Russian Foundation for Basic Research grant 18-04-01173. KSS is supported by the president fellowship 075-15-2019-411. Experiments were partially carried out using the equipment provided by the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences Core Facility (CKP IBCH; supported by Russian Ministry of Education and Science Grant RFMEFI62117X0018).

Acknowledgements: we thank to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Author contribution: Sarkisyan KS, Gorbachev DA — conceived and planned the project, performed the experiments, analysed data and prepared the manuscript.

Compliance with ethical standards: no animal or human subjects were used in this study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Karen S. Sarkisyan
Miklukho-Maklaya, 16/10, of. 34/632, Moscow, 117997; karen.s.sarkisyan@gmail.com

Received: 08.12.2019 **Accepted:** 18.12.2019 **Published online:** 20.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.084

Флуоресцентные белки широко используют как генетически кодируемые метки в технологиях оптического мечения живых систем [1]. Поскольку хромофор в таких белках находится внутри глобулы и защищен от окружающего растворителя, большинство существующих флуоресцентных белков являются пассивными репортерными молекулами — облучение их светом незначительно влияет на физиологию клетки.

В то же время на основе белка anm2CP было разработано уникальное семейство генетически кодируемых фотосенсибилизаторов — фототоксичных флуоресцентных белков, производящих при облучении активные формы кислорода, способные убить клетку [2].

В фототоксичных флуоресцентных белках обнаруживается заполненный молекулами воды канал, соединяющий находящийся в центре глобулы белка хромофор с молекулами растворителя и являющийся структурным механизмом, обеспечивающим эффективную генерацию активных форм кислорода этими белками [3, 4].

Созданный первым, генетически кодируемый фотосенсибилизатор — белок KillerRed — при освещении зеленым или оранжевым светом производит активные формы кислорода и демонстрирует на три порядка более высокий уровень фототоксичности, чем другие флуоресцентные белки [2]. В зависимости от клеточной локализации и дозы светового облучения активные

формы кислорода, генерируемые KillerRed, могут приводить к различным физиологическим последствиям, от инактивации белка слияния [2] до остановки клеточного деления [5, 6] и гибели клеток через некроз или апоптоз [2, 7].

Благодаря этим свойствам KillerRed используют в качестве оптогенетического инструмента в клеточной биологии для инактивации белков светом, изучения внутриклеточного окислительного стресса, а также для уничтожения интересующих экспериментатора клеточных популяций. KillerRed был также использован в качестве фотосенсибилизатора для лечения опухолей в модельных системах [7–9].

На основе KillerRed были созданы другие генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, генерирующие активные формы кислорода: SuperNova, спектрально близкий к KillerRed мономерный вариант белка [10], и спектрально отличные от них оранжевый флуоресцентный белок KillerOrange [11] и зеленый флуоресцентный белок SuperNova Green [12]. Кроме того, на основе неродственных флуоресцентным белкам флавопротеинов были разработаны фотосенсибилизаторы miniSOG и Pr2FbFP и другие, генерирующие синглетный кислород при облучении синим светом [13, 14].

К сожалению, ни один из созданных на сегодняшний день фотосенсибилизаторов с флуоресценцией в зеленой области спектра нельзя назвать универсальным для широкого круга задач из-за неполного или медленного созревания хромофора, различных типов генерируемых активных форм кислорода, или зависимости работы белка от доступности внешнего хромофора [15]. Целью настоящей работы было найти мутантный вариант KillerRed, который не формировал бы DsRed-подобный «красный» хромофор и мог служить основой для разработки нового поколения фотосенсибилизаторов с флуоресценцией в зеленой области спектра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Амплификация ДНК и анализ продуктов амплификации

Амплификацию ДНК проводили с использованием набора Encyclo PCR Kit (Евроген; Россия) на приборе PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research; США). Анализ продуктов амплификации проводили в 1–2%-м агарозном геле. В качестве красителя использовали бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл.

Создание библиотек случайных мутантов для направленной эволюции

При создании библиотеки мутантов белка KillerRed использовали протокол мутагенеза, основанный на методе ПЦР с ошибками. В реакционную смесь добавляли соли марганца и определенное соотношение

нуклеотидтрифосфатов, что в среднем приводило к 8 нуклеотидным ошибкам на 1000 амплифицированных нуклеотидов за 25 циклов ПЦР.

Перед проведением электротрансформации с целью удаления солей реакцию лигирования очищали с использованием набора для очистки ДНК Cleanup Mini (Евроген; Россия). Продукты лигирования смывали с колонки с помощью 10 мкл mQ. Электрокомпетентные клетки в количестве 40 мкл размораживали при 0 °C и в размороженные клетки вносили 5 мкл реакции лигирования. Клетки переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации (BioRad; США) и производили электропорацию в приборе MicroPulser (BioRad; США). Сразу после этого в кювету добавляли 3 мл среды SOB, полученную бактериальную суспензию переносили в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали 1 ч в термостате при температуре 37 °C. Бактериальную суспензию высевали на агар, приготовленный на основе среды LB, и инкубировали при температуре 37 °C в течение 18 ч. Средняя плотность колоний *E. coli* составляла 5000 на чашку Петри, общее разнообразие мутантов в библиотеке составило около 100 000 клонов. Количество флуоресцентных колоний — 22%.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

E. coli штамма XL1 Blue выращивали в колбах объемом 800 мл, индуцировали изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом до конечной концентрации 0,5 mM и инкубировали при перемешивании в течение 3 ч. Далее все операции по выделению белка проводили на льду. Культуру клеток центрифугировали, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 4 мл фосфатного буфера (pH 7,4). Клетки разрушали ультразвуком, используя соникатор Sonics Vibra Cell (Sonics & Materials; США), и снова центрифугировали. Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 400 мкл металл-аффинной смолы Talon (Clontech; США), уравновешенной фосфатным буфером. Пробирку помещали в шейкер на 1 ч 200 об./мин при комнатной температуре, после чего металл-аффинную смолу с белком несколько раз промывали фосфатным буфером. Затем элюировали белок раствором фосфатного буфера, содержащего 250 mM имидазола.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для поиска мутантного варианта KillerRed с флуоресценцией в зеленой области спектра мы провели случайный мутагенез. Библиотека мутантов KillerRed была клонирована в бактериальный экспрессионный вектор под контроль промотора с высокой фоновой экспрессией, трансформирована в *E. coli* и выращена на чашках Петри без индукции. Мы визуальное скринировали бактериальные колонии при облучении светом 400 нм и 480 нм для

Таблица. Аминокислотные последовательности описанных в работе белков. Остатки, формирующие хромофор, выделены фиолетовым цветом, а позиции, содержащие мутации, оранжевым

Последовательность белка KillerRed I64L D114G T115S, идентифицированного в настоящей работе	MRGSHHHHHHSGEGGALFQSDMTFKIFIDGEVNGQKFTIVADGSSKFPHGDFNVHAVCETGKLPMSWKPICHLLQYGEFFARYPDGISHFAQECFPEGLSIDRTVRFENDGMTSHHTYELDGSCVVSRTVNCDFGQPDGPIMRDQLVDILPNETHMFPHPGNVAVRQLAFIGFTTADGGLMMGHFDSKMTFNGSRAIEIPGFHVFTIITKQMRDTSDKRDHVCQREVAYAHVSPRITSAGSDED
Последовательность белка KillerRed	MRGSHHHHHHSGEGGALFQSDMTFKIFIDGEVNGQKFTIVADGSSKFPHGDFNVHAVCETGKLPMSWKPICHLLQYGEFFARYPDGISHFAQECFPEGLSIDRTVRFENDGMTSHHTYELDGTVCVVSRTVNCDFGQPDGPIMRDQLVDILPNETHMFPHPGNVAVRQLAFIGFTTADGGLMMGHFDSKMTFNGSRAIEIPGFHVFTIITKQMRDTSDKRDHVCQREVAYAHVSPRITSAGSDED

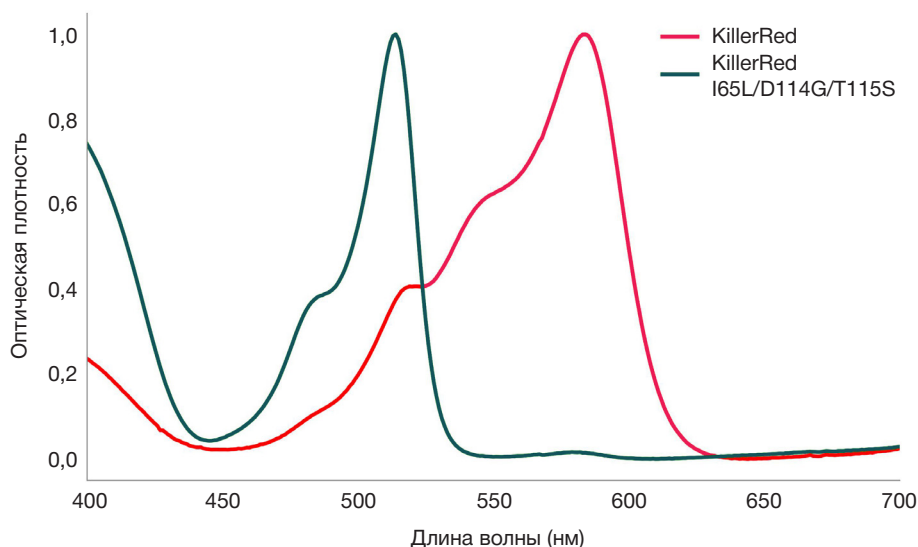


Рис. 1. Спектры поглощения очищенных препаратов белков KillerRed и KillerRed I64L/D114G/T115S

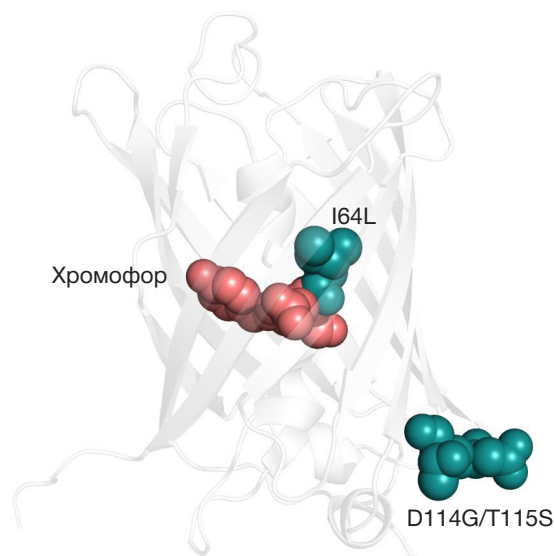


Рис. 2. Положение хромофора и мутаций I64L/D114G/T115S в структуре белка KillerRed

идентификации мутантов, обладающих значительной флуоресценцией в зеленой области спектра.

В результате скрининга был отобран мутант KillerRed I64L/D114G/T115S (см. табл.), который практически не обладал флуоресценцией в красной области спектра, зато обладал заметной зеленой флуоресценцией при облучении светом 480 нм (здесь и далее нумерация позиций в белке указана по традиционной нотации, согласно которой хромофор формируют аминокислоты в позициях 65–67 [1]). Подобные спектральные свойства свидетельствовали в пользу формирования «классического» GFP-подобного хромофора вместо DsRed-подобного хромофора, формируемого родительским KillerRed.

Поскольку белки с GFP- и DsRed-подобными хромофорами формируют легко отличимые друг от друга характерные спектры поглощения, мы получили препараты очищенного белка для мутантного белка KillerRed I64L/D114G/T115S и родительского KillerRed (рис. 1). Спектр поглощения очищенного KillerRed I64L D114G T115S действительно существенно отличался от спектра поглощения KillerRed и демонстрировал пик с максимумом в зеленой области спектра (514 нм) и характерным для GFP-подобных хромофоров гипсохромно сдвинутым плечом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отсутствие пика в области 550–600 нм на спектре поглощения KillerRed I64L/D114G/T115S свидетельствует о том, что внесенные мутации почти полностью предотвращают формирование DsRed-подобного хромофора, образующегося в родительском белке. Формируемый вместо этого пик с максимумом в области 514 нм и характерным плечом в области 480–485 нм позволяет предполагать, что катализ хромофора останавливается на «классическом» GFP-подобном хромофоре [1].

Представляются интересными мутации, обнаруженные в отобранном нами варианте KillerRed. Так, мутации в позиции 64 ранее уже были описаны как влияющие на созревание хромофора: например, в *Aequorea victoria* GFP мутация F64L улучшает созревание хромофора при экспрессии при 37 °C, а в хромобелке из *Acropora millepora* мутация S64C меняет цвет белка [16]. Мутации D114G и T115S находятся в соседних остатках на петле, соединяющей β-слои 5 и 6 (рис. 2), и, предположительно, могут участвовать в адаптации структуры β-бочонка белка к замене изолейцина на лейцин в позиции 64.

ВЫВОДЫ

Описанный в настоящей работе мутант KillerRed представляет собой перспективный вариант для дальнейшей направленной эволюции с целью создания нового поколения генетически кодируемых

фотосенсибилизаторов с флуоресценцией в зеленой области спектра. В отличие от других разработанных на сегодняшний день спектральных вариантов KillerRed, мутант KillerRed I64L/D114G/T115S формирует хромофор на основе тирозина и обладает флуоресценцией в зеленой области спектра.

Литература

1. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.* 2010; (9)0: 1103–63. DOI:10.1152/physrev.00038.2009/=.
2. Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, et al. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol.* 2006; (24): 95–9. DOI:10.1038/nbt1175.
3. Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, Gorbachev DA, Egorov ES, Mishin AS, et al. Crystal Structure of Phototoxic Orange Fluorescent Proteins with a Tryptophan-Based Chromophore. *PLoS One.* 2015; (10): e0145740. DOI:10.1371/journal.pone.0145740.
4. Pletnev S, Gurskaya NG, Pletneva NV, Lukyanov KA, Chudakov DM, Martynov VI, et al. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biol Chem.* 2009; (284): 32028–39. DOI:10.1074/jbc.M109.054973.
5. Serebrovskaya EO, Gorodnicheva TV, Ermakova GV, Solovieva EA, Sharonov GV, Zagaynova EV, et al. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem J.* 2011; (435): 65–71. DOI:10.1042/BJ20101217.
6. Lan L, Nakajima S, Wei L, Sun L, Hsieh C-L, Sobol RW, et al. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 2014; (42): 2330–45. DOI:10.1093/nar/gkt1233.
7. Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Snopova LB, Sirotkina MA, Prodanetz NN, et al. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *J Biophotonics.* 2013; (6): 283–90. DOI:10.1002/jbio.201200056.
8. Kuznetsova DS, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Subochev PV, Turchin IV, Zagaynova EV, et al. Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination. *J Biophotonics.* 2015; 9999. DOI:10.1002/jbio.201400130.
9. Yan L, Kanada M, Zhang J, Okazaki S, Terakawa S. Photodynamic Treatment of Tumor with Bacteria Expressing KillerRed. *PLoS One.* 2015; (10): e0131518. DOI:10.1371/journal.pone.0131518.
10. Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, et al. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci Rep.* 2013; (3): 2629. DOI:10.1038/srep02629.
11. Sarkisyan KS, Zlobovskaya OA, Gorbachev DA, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, et al. KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light. *PLoS One.* 2015; (10): e0145287. DOI:10.1371/journal.pone.0145287.
12. Riani YD, Matsuda T, Takemoto K, Nagai T. Green monomeric photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation. *BMC Biol.* 2018; (16): 50. DOI:10.1186/s12915-018-0514-7.
13. Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, et al. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* 2011; (9): e1001041. DOI:10.1371/journal.pbio.1001041.
14. Torra J, Burgos-Caminal A, Endres S, Wingen M, Drepper T, Gensch T, et al. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent protein Pp2FbFP L30M, a novel derivative of *Pseudomonas putida* flavin-binding Pp2FbFP. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; (14): 280–7. DOI:10.1039/c4pp00338a.
15. Acharya A, Bogdanov AM, Grigorenko BL, Bravaya KB, Nemukhin AV, Lukyanov KA, et al. Photoinduced Chemistry in Fluorescent Proteins: Curse or Blessing? *Chem Rev.* 2017; (117): 758–95. DOI:10.1021/acs.chemrev.6b00238.
16. Alieva NO, Konzen KA, Field SF, Meleshkevitch EA, Hunt ME, Beltran-Ramirez V, et al. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PLoS One.* 2008; (3): e2680. DOI:10.1371/journal.pone.0002680.

References

1. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.* 2010; (9)0: 1103–63. DOI:10.1152/physrev.00038.2009/=.
2. Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, et al. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol.* 2006; (24): 95–9. DOI:10.1038/nbt1175.
3. Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, Gorbachev DA, Egorov ES, Mishin AS, et al. Crystal Structure of Phototoxic Orange Fluorescent Proteins with a Tryptophan-Based Chromophore. *PLoS One.* 2015; (10): e0145740. DOI:10.1371/journal.pone.0145740.
4. Pletnev S, Gurskaya NG, Pletneva NV, Lukyanov KA, Chudakov DM, Martynov VI, et al. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *J Biol Chem.* 2009; (284): 32028–39. DOI:10.1074/jbc.M109.054973.
5. Serebrovskaya EO, Gorodnicheva TV, Ermakova GV, Solovieva EA, Sharonov GV, Zagaynova EV, et al. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein. *Biochem J.* 2011; (435): 65–71. DOI:10.1042/BJ20101217.
6. Lan L, Nakajima S, Wei L, Sun L, Hsieh C-L, Sobol RW, et al. Novel method for site-specific induction of oxidative DNA damage reveals differences in recruitment of repair proteins to heterochromatin and euchromatin. *Nucleic Acids Res.* 2014; (42): 2330–45. DOI:10.1093/nar/gkt1233.
7. Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Snopova LB, Sirotkina MA, Prodanetz NN, et al. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *J Biophotonics.* 2013; (6): 283–90. DOI:10.1002/jbio.201200056.
8. Kuznetsova DS, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Subochev PV, Turchin IV, Zagaynova EV, et al. Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination. *J Biophotonics.* 2015; 9999. DOI:10.1002/jbio.201400130.
9. Yan L, Kanada M, Zhang J, Okazaki S, Terakawa S. Photodynamic Treatment of Tumor with Bacteria Expressing KillerRed. *PLoS One.* 2015; (10): e0131518. DOI:10.1371/journal.pone.0131518.
10. Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, et al. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci Rep.* 2013; (3): 2629. DOI:10.1038/srep02629.
11. Sarkisyan KS, Zlobovskaya OA, Gorbachev DA, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, et al. KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light. *PLoS One.* 2015; (10): e0145287. DOI:10.1371/journal.pone.0145287.
12. Riani YD, Matsuda T, Takemoto K, Nagai T. Green monomeric

- photosensitizing fluorescent protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation. *BMC Biol.* 2018; (16): 50. DOI:10.1186/s12915-018-0514-7.
13. Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, et al. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* 2011; (9): e1001041. DOI:10.1371/journal.pbio.1001041.
 14. Torra J, Burgos-Caminal A, Endres S, Wingen M, Drepper T, Gensch T, et al. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent protein Pp2FbFP L30M, a novel derivative of *Pseudomonas putida* flavin-binding Pp2FbFP. *Photochem Photobiol Sci.* 2015; (14): 280–7. DOI:10.1039/c4pp00338a.
 15. Acharya A, Bogdanov AM, Grigorenko BL, Bravaya KB, Nemukhin AV, Lukyanov KA, et al. Photoinduced Chemistry in Fluorescent Proteins: Curse or Blessing? *Chem Rev.* 2017; (117): 758–95. DOI:10.1021/acs.chemrev.6b00238.
 16. Alieva NO, Konzen KA, Field SF, Meleshkevitch EA, Hunt ME, Beltran-Ramirez V, et al. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PLoS One.* 2008; (3): e2680. DOI:10.1371/journal.pone.0002680.

АССОЦИАЦИЯ SNP ГЕНОВ БЕЛКОВ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ С РАЗВИТИЕМ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Д. Б. Ревина¹✉, А. В. Балацкий^{1,2}, Е. Б. Ларина³, Н. А. Олейникова¹, Г. А. Мишуровский¹, П. Г. Мальков¹, Л. М. Самоходская¹, О. Б. Панина¹, В. А. Ткачук^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Россия

³ Клинический госпиталь Лапино «Мать и дитя», Москва, Россия

Плацентарная недостаточность (ПН) и ее осложнения — многофакторные заболевания, ведущие к перинатальной заболеваемости и смертности. Урокиназная система задействована в формировании плаценты и может быть рассмотрена как участник патогенеза ПН. Целью работы было исследовать ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов белков урокиназной системы с развитием ПН, их влияние на экспрессию соответствующих белков в плаценте и ее строение. Обследованы 114 женщин с физиологическим течением беременности и родов и 48 пациенток с преэклампсией и/или задержкой роста плода (ЗРП), 95 новорожденных детей (беременность с преэклампсией и/или ЗРП — 60, физиологическое течение беременности и родов — 35). Проведено генотипирование при помощи ПЦР в реальном времени, морфометрическое и иммуногистохимическое исследования фрагментов плацент. Выявлены ассоциации между развитием ПН и наличием у матери — аллеля C rs4065 (в группе ПН — CC-CT 64,1%, TT 35,9%, в контрольной группе — CC-CT 25,6%, TT 74,49%, ОШ (95% ДИ) — 6,83 (2,63–17,79)), аллеля A rs2302524 (GG-GA 20,5%, AA 79,5% против GG-GA 48,1%, AA 51,9%, ОШ (95% ДИ) — 0,27 (0,1–0,71)), у плода — аллеля C rs4065 (CC-CT 76,4 %, TT 23,6% против CC-CT 69,6%, TT 30,4%, ОШ (95% ДИ) — 1,37 (0,45–4,17)), аллеля C rs344781 (TT-TC 69,1%, CC 30,9% против TT-TC 95,7%, CC 4,3%, ОШ (95% ДИ) — 5,02 (1,07–23,6)). Многофакторный анализ подтвердил значимость генотипа плода по rs4065. Экспрессия uPA была ниже при ПН (медиана (95% ДИ) — 116,45 (100,5; 128,74) против 126,09 (113,76; 139,19); $p < 0,05$). Ассоциации SNP с экспрессией белков выявлено не было. Васкуляризация зависела от генотипа матери по rs4065 (stroma-to-vessel ratio при генотипе CC — 0,17 (0,15; 0,19), CT — 0,18 (0,15; 0,21), TT — 0,23 (0,2; 0,27); $p < 0,05$). Таким образом, высокий уровень uPA в плаценте и наличие генотипа rs4065 TT у плода носят протективный характер в отношении развития ПН.

Ключевые слова: преэклампсия, задержка роста плода, плацентарная недостаточность, активатор плазминогена урокиназного типа, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, однонуклеотидный полиморфизм, ангиогенез

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова и с использованием оборудования, приобретенного по программе научного развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

Благодарности: ассистенту кафедры акушерства и гинекологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени Ломоносова, к. м. н. Николаю Назимовичу Мамедову за помощь в создании коллекции биоматериалов (фрагментов последов, образцов крови).

Информация о вкладе авторов: Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Л. М. Самоходская, О. Б. Панина и В. А. Ткачук — дизайн исследования; Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий, Е. Б. Ларина, Н. А. Олейникова, Г. А. Мишуровский — сбор и обработка биоматериала, клинических данных; Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий, Г. А. Мишуровский — статанализ; Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий — интерпретация результатов; Д. Б. Ревина, А. В. Балацкий, Г. А. Мишуровский, Н. А. Олейникова — написание рукописи; П. Г. Мальков, Л. М. Самоходская, О. Б. Панина, В. А. Ткачук — редактирование рукописи. Вклады Д. Б. Ревин и А. В. Балацкого равноценны.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова (протокол № 4 от 4 июня 2018 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на включение в исследование.

✉ Для корреспонденции: Дарья Борисовна Ревина
Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1, г. Москва, 119192; lozinskaya.daria@gmail.com

Статья получена: 31.10.2019 Статья принята к печати: 18.11.2019 Опубликована онлайн: 07.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.076

ASSOCIATIONS BETWEEN SNPs IN THE GENES ENCODING UROKINASE SYSTEM PROTEINS AND THE RISK OF PLACENTAL INSUFFICIENCY

Revina DB¹✉, Balatskiy AV^{1,2}, Larina EB³, Oleynikova NA¹, Mishurovsky GA¹, Malkov PG¹, Samokhodskaya LM¹, Panina OB¹, Tkachuk VA^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

³ Lapino Clinical Hospital "Mother and Child", Moscow, Russia

Placental insufficiency (PI) and its complications are multifactorial conditions that cause perinatal morbidity and mortality. Since the urokinase system is involved in placentation, it should have a role in PI pathogenesis. The aim of this work was to study the associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes coding for protein components of the urokinase system and PI, as well as investigate their effect on the expression of these proteins in the placenta and placental structure. We examined 114 women with uncomplicated pregnancy and delivery, 48 female patients with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction (IUGR), and 95 newborns, (pre-eclampsia and/or IUGR: $n = 60$; uncomplicated pregnancy and delivery: $n = 35$). Maternal and fetal DNAs were genotyped using real-time PCR. Placenta fragments were subjected to morphometry and immunohistochemistry. We discovered the associations between PI and the maternal C allele of rs4065 (PI group: CC-CT 64.1%, TT 35.9%; controls: CC-CT 25.6%, TT 74.49%; OR (95%CI): 6.83 (2.63–17.79)), the maternal A allele of rs2302524 (GG-GA 20.5%, AA 79.5% vs. GG-GA 48.1%, AA 51.9%, OR (95%CI): 0.27 (0.1–0.71)), the fetal C allele of rs4065 (CC-CT 76.4 %, TT 23.6% vs. CC-CT 69.6%, TT 30.4%, OR (95%CI): 1.37 (0.45–4.17)), and the fetal C allele of rs344781 (TT-TC 69.1%, CC 30.9% vs. TT-TC 95.7%, CC 4.3%, OR (95% CI): 5.02 (1.07–23.6)). The multivariate analysis confirmed the significance of the fetal rs4065 genotype. In patients with PI, uPA expression was lower (ME (95%CI): 116.45 (100.5; 128.74) vs. 126.09 (113.76; 139.19); $p < 0.05$). No associations were established between SNPs and protein expression. The degree of vascularization depended on the maternal rs4065 genotype (the stroma-to-vessel ratio for the CC genotype was 0.17 (0.15; 0.19); for the CT genotype, 0.18 (0.15; 0.21) and for the TT genotype, 0.23 (0.2; 0.27); $p < 0.05$). We conclude that high placental uPA and the presence of the fetal TT rs4065 genotype are protective against the risk of PI.

Keywords: pre-eclampsia, intrauterine growth restriction, placental insufficiency, urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, single nucleotide polymorphism, angiogenesis

Funding: this study was conducted under the state assignment for Lomonosov MSU using the equipment acquired as part of the Scientific Development Program of Lomonosov MSU.

Acknowledgement: the authors thank Mamedov NN, PhD Med, an Assistant Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology (Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU) for his help in creating the collection of biosamples (umbilical cord and placenta fragments, blood samples).

Author contribution: Revina DB, Balatskiy AV, Larina EB, Samokhodskaya LM, Panina OB, Tkachuk VA — study design; Revina DB, Balatskiy AV, Larina EB, Oleynikova NA, Mishurovsky GA — collection and processing of biosamples and clinical data; Revina DB, Balatskiy AV, Mishurovsky GA — statistical analysis; Revina DB, Balatskiy AV — interpretation of the results; Revina DB, Balatskiy AV, Oleynikova NA, Mishurovsky GA — manuscript preparation; Malkov PG, Samokhodskaya LM, Panina OB, Tkachuk VA — manuscript revision; Revina DB and Balatskiy AV equally contributed to the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Lomonosov MSU (Protocol 4 dated June 4 2018). All patients gave informed consent to participate.

✉ Correspondence should be addressed: Daria B. Revina
Lomonosovsky prospect, 27, k.1, Moscow, 119192; lozinskaya.daria@gmail.com

Received: 31.10.2019 Accepted: 18.11.2019 Published online: 07.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.076

Плацентарная недостаточность (ПН) и связанные с ней осложнения беременности (задержка роста плода (ЗРП) и преэклампсия) являются клиническим проявлением патологии плацентарного кровообращения. Патогенез ПН основан на нарушениях ангиогенеза в плаценте и аномалии созревания ворсинчатого дерева, которые обусловлены рядом патологических процессов: 1) неполноценной инвазией трофобласта; 2) отсутствием ремоделирования спиральных артерий; 3) дисбалансом про- и антиангиогенных факторов; 4) изменениями реологических свойств крови матери [1]. Таким образом, особое внимание при изучении этиологии ПН следует обращать на многофункциональные регуляторные системы, потенциально задействованные на каждом этапе формирования синдрома. К ним относится система урокиназы (активатор плазминогена урокиназного типа, uPA), состоящая из самого урокиназного активатора плазминогена, ее основного субстрата — плазминогена, ингибиторов активатора (PAI-1, PAI-2), а также рецептора урокиназы (uPAR), при условии взаимодействия с которым протеолиз, опосредованный урокиназой, происходит более эффективно [2]. Урокиназный комплекс, благодаря возможности запускать различные сигнальные каскады, способен не только изменять клеточное окружение путем протеолиза внеклеточного матрикса, но и инициировать в ответ на эти изменения процессы миграции и пролиферации клеток [3].

Почти все белки урокиназной системы имеют в своих генах полиморфные маркеры, влияющие на активность фермента или уровень его экспрессии, и для некоторых из них уже накоплены данные, подтверждающие их роль в развитии акушерской патологии. С точки зрения связи генетической вариативности и клинических проявлений ПН из всех белков урокиназной системы наиболее изучен PAI-1. Уже доказана ассоциация инсерционно-делеционной мутации в промотере -675 5G/4G *SERPINE1* с невынашиванием беременности, преэклампсией [4, 5].

В меньшей степени изучен полиморфизм гена урокиназы и ее рецептора. В настоящей работе были выбраны две однонуклеотидные замены в гене *PLAU* (rs2227564, rs4065) и две — в гене *PLAUR* (rs344781, rs2302524) для исследования связи между ними и развитием ПН. Полиморфизм гена *PLAU* rs4065 C/T 3'-UTR — замена C/T в некодирующей области, приводящая к изменению уровня uPA за счет увеличения стабильности мРНК [6]. Полиморфизм гена *PLAU* rs2227564 Pro141Leu обуславливает увеличение гидрофобности крингл-домена, что приводит к снижению аффинности к фибрину и, возможно, компонентам внеклеточного матрикса [7]. Хотя роль крингл-домена урокиназы не до конца ясна, данный полиморфизм может оказывать влияние на ее активность. Полиморфизм *PLAUR* rs2302524 (A659G) также представляет собой миссенс-мутацию и потенциально может оказывать влияние на активность урокиназной системы [8]. Полиморфизм *PLAUR* rs344781 отражается на активности промотера гена, причем аллель Т приводит к усилению экспрессии [9]. Учитывая необходимость оценки как материнского, так и плодового компонентов системы «мать–плацента–плод», был исследован и генотип матери, и генотип плода. Данные генотипирования впоследствии были соотнесены с результатами гистологического исследования микропрепаратов плацент с целью оценки влияния полиморфизмов на морфометрические показатели и экспрессию соответствующих белков. Таким образом, целью работы было исследовать ассоциацию SNP

генов белков uPA–uPAR-системы с развитием ПН, их влияние на интенсивность иммуногистохимической экспрессии соответствующих белков в плаценте и ее строение.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в 2018 г. в Медицинском научно-образовательном центре МГУ имени М. В. Ломоносова. Образцы венозной крови, ткани плаценты, пуповины и клинические данные были получены из биобанка Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М. В. Ломоносова. Перечисленный материал был собран у 162 пациенток (20–49 лет) и 95 новорожденных детей непосредственно после завершения родов.

Контрольную группу составили 114 здоровых женщин. Критерии включения в контрольную группу: физиологическое течение беременности и родов. В группу ПН включили 48 пациенток. Критерии включения в группу ПН: ранняя преэклампсия (до 34 недель гестации) и/или ранняя ЗРП (до 32 недель) II–III степени. Диагноз ЗРП II–III степени устанавливали при отставании фетометрических показателей более чем на 2 недели от фактического срока гестации, определенного по первому дню последней менструации и ранним УЗИ. Диагноз преэклампсии был установлен при уровне систолического АД ≥ 140 мм рт. ст. и диастолического АД ≥ 90 мм рт. ст., зафиксированном не менее 2 раз после 20-й недели, и наличии одного и более следующих признаков: протеинурии ≥ 300 мг/сут., почечного повреждения (гиперкреатинемии ≥ 90 мкмоль/л), нарушения функции печени (АЛТ или АСТ > 40 МЕ/л), нарушения кровотока в системе мать–плацента–плод по данным доплерометрии, тромбоцитопении $< 150\,000$ /мкл, неврологических симптомов. Критерии исключения пациенток из исследования: наличие многоплодной беременности; Rh-сенситизация; гестационный сахарный диабет, тяжелая экстрагенитальная патология; наркомания; табакокурение; пороки развития и генетические аномалии плода. Все беременности наступили самопроизвольно. С целью исключения феномена конституционально маленького плода (small for gestational age) проводили доплерометрию кровотока в артерии пуповины, из исследования были исключены пациентки с нормальными характеристиками кровотока.

Образцы пуповины были получены от 60 новорожденных детей группы ПН (беременность матери была осложнена преэклампсией и/или ЗРП), и от 35 новорожденных контрольной группы (с физиологическим течением беременности и родов). Для анализа отбирали фрагмент пуповины на расстоянии 8–10 см от плаценты и фиксировали в 10%-м формалине или замораживали при -80 °C. В 53 случаях были отобраны и образец крови матери, и фрагмент пуповины новорожденного, и ткань плаценты (25 случаев с ПН, 28 случаев из контрольной группы). Для каждой пары мать–новорожденный собирали по три фрагмента ткани плаценты размерами $1 \times 0,5 \times 0,5$ см из краевой, парацентральной и центральной зон визуальной неизменной плаценты; фрагменты фиксировали 10%-м забуференным раствором формальдегида в течение 12 ч, далее осуществляли гистологическую проводку и заливку в парафиновые блоки. Роды всех пациенток, для которых проводили гистологическое исследование плаценты, происходили путем операции кесарева сечения на сроке от 28 недель в группе ПН (2 пациентки — до 34-й недели, 6 — после 34-й недели), на доношенном сроке — в контрольной группе.

Генотипирование

Выделение ДНК из цельной периферической крови матери с консервантом ЭДТА K₂ проводили с помощью набора «QIAmp DNA Blood Mini Kit», из ткани пуповины — при помощи набора «DNeasy Blood and Tissue Kit» (QIAGEN; Германия) по стандартной методике, рекомендованной производителем (с минимальной массой образца пуповины 25 мг и пролонгированным лизисом в течение ночи).

Определение полиморфизмов C/T 3'-UTR (rs4065) гена *PLAU* и T(-516)C (rs344781) гена *PLAUR* проводили при помощи ПЦР с детекцией в реальном времени. Амплификацию осуществляли в детектирующем термоциклере «RotorGene Q» (QIAGEN; Германия). Применяли аллельспецифичные гидролизуемые зонды. Праймеры и зонды:

rs4065_F: 5'-TGGTTGTCATTTTGCAGTAGAGTC-3';
rs4065_R: 5'-GGCCTATGCCTGAGGGTAAAG-3';
rs4065_prC: FAM-5'-AAGCTATTGTCGTTCCGCCCTGGTGG-3'-BHQ1;
rs4065_prT: HEX-5'-AAGCTATTGTCGTTCCACCCTGGTGGG-3'-BHQ1;
rs344781_F: 5'-ATCCTGAAATATGCATCTCTTAAACACT-3';
rs344781_R: 5'-TTAACATTTACCAAGGACCTACTTCCG-3';
rs344781_prC: FAM-5'-CACAGCGGGAAGCAAAGCAAGGGT-3'-BHQ1;
rs344781_prT: HEX-5'-CACAGCAGGAAGCAAAGCAAGGGT-3'-BHQ1).

Определение C/T 7240 (rs2227564) гена *PLAU*, A659G (rs2302524) гена *PLAUR*, -675 5G/4G *SERPINE1* проводили при помощи ПЦР с детекцией в реальном времени и готовых наборов для определения SNP («ДНК-Технология»; Россия).

Морфометрическое и иммуногистохимическое исследования

Из парафиновых блоков изготавливали срезы 4 мкм, которые затем монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием «Polysine Slides» (Menzel GmbH & Co KG; Германия). Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов проводили при помощи буфера «Dewaxand HIER BufferM» (pH 8,0) (Thermo; Великобритания) при температуре 95–98 °C, в течение 20 мин в модуле предобработки к «PT-Module» (Thermo; Великобритания). Иммуногистохимические реакции проводили в автоматизированном режиме с помощью автостейнера «Thermo Scientific LabVision Autostainer 480S» (Thermo; Великобритания). Для проведения иммуногистохимического исследования использовали кроличьи моноклональные антитела к урокиназе (ab133563) в разведении 1 : 150 и кроличьи поликлональные антитела к рецептору урокиназы (ab103791) в разведении 1 : 100 (Abcam; Великобритания), время инкубации — 30 мин. В качестве системы детекции применяли систему «Ultra Vision Quanto Detection System» (Thermo; Великобритания) с DAB-хромогеном. После этого срезы докрашивали гематоксилином (1–3 мин) и заключали под покровное стекло. Результаты реакции учитывали с помощью микроскопа «Leica DM 1000»: объектив HI PLAN 40x/0.65 ∞/0.17/OFN25 с цифровой камерой высокого разрешения «Leica DMC 2900»; программное обеспечение «Leica Application Suite 8.0» (Leica; Германия). Суммарно было получено 1060 микрофотографий: 530 для uPAR-окрашенных стекол, 530 — для uPA-окрашенных.

Обработка изображений

В каждом изображении выбирали участок фона размерами 7 × 7 пикселей и присваивали ему среднее значение цвета всех пикселей, которые в нем содержатся. По данному цвету корректировали баланс белого так, чтобы полученный цвет становился белым. В результате на всех микрофотографиях цвет фона очень близок к белому, а цветовое пространство стало однородным. После этого в каждой фотографии вручную выделяли и удаляли крупные скопления эритроцитов и артефакты. Все изображения приводили к размеру 1024 × 768 пикселей.

Измеряемые параметры

В программе ImageJ, v1.51s (National Institutes of Health; США) для каждого изображения рассчитывали площадь ворсин (мм²) и площадь межворсинчатого пространства (мм²). При помощи выделения сосудов на микрофотографиях вручную оценивали площадь сосудов (% от площади ворсин), стромально-сосудистое соотношение и интенсивность иммуногистохимической экспрессии uPA и uPAR ворсинами. Стромально-сосудистое соотношение рассчитывали по формуле: площадь сосудов ворсин / (площадь ворсин — площадь сосудов ворсин). Все параметры вычисляли как геометрическое среднее показателей, полученных после обработки 10 изображений для каждого среза.

Оценка интенсивности иммуногистохимической экспрессии

В соответствующих ворсинкам участках отбирали пиксели со значениями цвета в следующих диапазонах: hue [0;37], saturation [46;255], brightness [62;251]. Данные параметры позволяют определить большое количество оттенков коричневого цвета. Отобранные участки изображений переводили в черно-белый спектр для определения интенсивности окрашивания пикселей. Абсолютно черным пикселям присваивали значение 255, абсолютно белым — 0. Все пиксели, не входившие в состав ворсин, либо не отобранные по цветовому диапазону, также получили значение 0. Было посчитано среднее значение цвета пикселей в изображении без учета белых (со значением 0). Интенсивность экспрессии рассчитывали по формуле:

$$INT = \frac{\sum_{c=0}^{255} c \times N_c}{V_i \times 1024 \times 768},$$

где INT — интенсивность; c — среднее значение цвета не белых пикселей; N — количество не белых пикселей на обработанном изображении; V — доля площади изображения, занятая ворсинами, от 0 до 1. Результат расчета по указанной формуле можно интерпретировать как интенсивность экспрессии маркера от 0 (нет экспрессии) до 255 (максимальная экспрессия) в ворсине при условии ее равномерного окрашивания.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием программы RStudio v1.1.453 и веб-версии SNP Stats [10], разработанной для анализа исследований генетического полиморфизма генов. Информационный критерий Акаике (ИКА) использовали для определения модели наследования (кодминантная, доминантная, рецессивная,

сверхдоминантная или лог-аддитивная). Предпочтение отдавали моделям с наименьшими значениями ИКА, указывающими на хорошее соответствие данным при использовании меньшего числа параметров. Отличие распределения непрерывных переменных от нормального определяли при помощи теста Шапиро–Уилка. При сравнении групп в зависимости от вида распределения и числа групп использовали *t*-тест, тест Тьюки, однофакторный дисперсионный анализ, критерий суммы рангов Уилкоксона,

критерий Краскела–Уоллиса. Категориальные переменные оценивали при помощи χ^2 -теста. В работе представляли также отношения шансов (ОШ) возникновения ПН. Для построения 95%-х доверительных интервалов (ДИ) и точечной оценки ОШ применяли модель однофакторной бинарной логистической регрессии. Для исследования веса и статистической значимости отдельных генотипов использовали логистическую регрессию. Статистически достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Таблица 1. Частота генотипов полиморфных вариантов генов урокиназной системы с доказанной для развития ПН значимостью

	Модель наследования	Генотип	ПН, % (<i>n</i>)	Контроль % (<i>n</i>)	ОШ (ДИ95%)*	<i>p</i>	ИКА
SNP матери							
PLAU rs4065	Кодоминантная	C/C	23,1 (9)	3,8 (3)	12,90 (2,68–51,68)	0,0001	120,9
		C/T	41 (16)	21,8 (17)	5,46 (1,94–15,37)		
		T/T	35,9 (14)	74,4 (58)	1		
	Доминантная	C/T–C/C	64,1 (25)	25,6 (20)	6,83 (2,63–17,79)	<0,0001	120,1
		T/T	35,9 (14)	74,4 (58)	1		
	Рецессивная	C/C	23,1 (9)	3,8 (3)	6,97 (1,58–30,68)	0,006	130
		T/T–C/T	76,9 (30)	96,2 (75)	1		
	Сверхдоминантная	C/C–T/T	59 (23)	78,2 (61)	1	0,01	131
		C/T	41 (16)	21,8 (17)	3,46 (1,33–9,03)		
	Аддитивная	–	–	–	4,14 (2,02–8,51)	<0,0001	119,5
PLAUR rs2302524	Кодоминантная	A/A	79,5 (31)	51,9 (42)	1	0,02	133,7
		A/G	15,4 (6)	38,3 (31)	0,27 (0,09–0,77)		
		G/G	5,1 (2)	9,9 (8)	0,30 (0,05–0,68)		
	Доминантная	A/A	79,5 (31)	51,9 (42)	1	0,005	131,8
		A/G–G/G	20,5 (8)	48,1 (39)	0,27 (0,1–0,71)		
	Рецессивная	A/A–A/G	94,9 (37)	90,1 (73)	1	0,31	138,5
		G/G	5,1 (2)	9,9 (8)	0,43 (0,08–2,41)		
	Сверхдоминантная	A/A–G/G	84,6 (33)	61,7 (50)	1	0,018	134
		A/G	15,4 (6)	38,3 (31)	0,31 (0,11–0,87)		
	Аддитивная	–	–	–	0,39 (0,18–0,85)	0,01	132,9
SNP плода							
PLAU rs4065	Кодоминантная	C/C	30,9 (17)	4,3 (1)	8,25 (0,88–77,21)	0,031	92,8
		C/T	45,5 (25)	65,2 (15)	0,91 (0,29–2,87)		
		T/T	23,6 (13)	30,4 (7)	1		
	Доминантная	C/T–C/C	76,4 (42)	69,6 (16)	1,37 (0,45–4,17)	0,58	97,4
		T/T	23,6 (13)	30,4 (7)	1		
	Рецессивная	C/C	30,9 (17)	4,3 (1)	8,82 (1,09–71,67)	0,009	90,8
		T/T–C/T	69,1 (38)	95,7 (22)	1		
	Сверхдоминантная	C/T	45,5 (25)	65,2 (15)	0,47 (0,17–1,31)	0,14	95,5
		C/C–T/T	54,5 (30)	34,8 (8)	1		
	Аддитивная	–	–	–	1,99 (0,92–4,29)	0,073	94,5
PLAUR rs344781	Кодоминантная	T/T	23,6 (13)	30,4 (7)	1	0,014	117,9
		T/C	45,5 (25)	65,2 (15)	0,28 (0,11–0,71)		
		C/C	30,9 (17)	4,3 (1)	2,71 (0,53–13,76)		
	Доминантная	T/T	23,6 (13)	30,4 (7)	1	0,098	131,4
		T/C–C/C	76,4 (42)	69,6 (16)	0,49 (0,21–1,16)		
	Рецессивная	T/T–T/C	69,1 (38)	95,7 (22)	1	0,018	128,5
		C/C	30,9 (17)	4,3 (1)	5,02 (1,07–23,6)		
	Сверхдоминантная	C/C–T/T	54,5 (30)	34,8 (8)	1	7e–4	122,7
		T/C	45,5 (25)	65,2 (15)	0,22 (0,09–0,54)		
	Аддитивная	–	–	–	1,00 (0,57–1,77)	0,99	134,1

Примечание: * — ОШ (95% ДИ) с поправкой на возраст матери.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 представлены показатели частот полиморфных маркеров матери и новорожденного со статистически доказанной значимостью в отношении развития ПН с поправкой на возраст матери как фактор риска возникновения ПН. Полученные результаты свидетельствуют о наличии ассоциации между развитием ПН и наличием у матери аллеля С гена *PLAU* rs4065, аллеля А гена *PLAUR* rs2302524, у новорожденного — аллеля С гена *PLAU* rs4065, аллеля С гена *PLAUR* rs344781. Для исследования совместного влияния генотипов матери и плода была построена модель, в которой зависимой переменной являлось наличие ПН, предикторами — генотипы матери и плода (наличие двух мутантных аллелей приравнивали к двум баллам, гетерозиготы — к одному, двух референсных — к нулю), далее оценивали статистическую значимость предикторов, их веса и влияние (положительное или отрицательное). Характеристики полученной модели представлены в табл. 2: достоверное влияние было подтверждено для rs4065 новорожденного — замена С/Т обладает протективным эффектом в отношении развития ПН, т. е. уменьшает вероятность ее развития, наиболее прогностически благоприятным является наличие генотипа ТТ.

В контрольной группе обнаружено нормальное строение ворсинчатого древа: преобладание терминальных ворсин с синусоидально расширенными капиллярами, тесный контакт клеток трофобласта с подлежащей сосудистой стенкой. В группе ПН выявлено большое разнообразие гистопатологических феноменов. В ряде случаев наблюдали преобладание неразветвляющегося ангиогенеза в виде дефицита терминальных ворсин, их

малого диаметра, отсутствия синцитиальных почек. В 16 случаях выявлены выраженные компенсаторные реакции ткани плаценты: ангиоматоз ворсин, большое количество синцитиальных почек в сгруппированных терминальных ворсинах, сужение межворсинчатого пространства. Перечисленные различия подтверждает количественная оценка площади ворсин и площади межворсинчатого пространства (табл. 3). Различий между группами по показателю удельной площади сосудистого русла, стромально-сосудистому соотношению выявлено не было (табл. 3), что может быть вызвано гетерогенностью морфологической картины при преэклампсии и ЗРП, а также разными сроками родоразрешения.

Полученные при генотипировании матери и плода данные были соотнесены с результатами микроскопического исследования плаценты, в том числе морфометрии, и количественной оценкой иммуногистохимической экспрессии uPA и uPAR. Интенсивность иммуногистохимической экспрессии uPA и uPAR синцитиотрофобластом превосходила таковую стромы и клеток эндотелия сосудов ворсин (рис. 1А–Г). При сравнении групп по показателю иммуногистохимической экспрессии uPA интенсивность была достоверно ниже в ткани плацент пациенток с ПН ($p = 0,033$) (табл. 3; рис. 1А–Б), различий в экспрессии uPAR выявлено не было (табл. 3; рис. 1Б–Г).

Ассоциации между наличием SNP в генах *PLAU* и *PLAUR* и интенсивностью экспрессии в ткани плаценты соответствующих белков обнаружено не было.

Протективное влияние замены С/Т rs4065 у матери подтверждено взаимосвязью со степенью васкуляризации ворсин: в зависимости от генотипа удельная площадь сосудистого русла (доля от площади ворсин) и величина стромально-сосудистого соотношения были различными

Таблица 2. Параметры регрессионной модели, характеризующей зависимость риска развития ПН от наличия SNP в генах белков системы урокиназы

	Коэффициенты факторов	Стандартная ошибка	z-значение	p
Свободный коэффициент	–0,6347	1,4248	–0,445	0,656
SNP плода				
<i>PLAU</i> rs2227564	4,0476	2,4788	1,778	0,075
<i>SERPINE-1</i> rs1799889	0,1157	1,2417	0,093	0,926
<i>PLAU</i> rs4065	–3,3538	1,3791	–2,432	0,015
<i>PLAUR</i> rs344781	2,7448	1,5893	1,727	0,084
<i>PLAUR</i> rs2302524	0,3755	1,4117	0,266	0,79
SNP матери				
<i>PLAU</i> rs2227564	–1,9485	1,3233	–1,472	0,141
<i>SERPINE-1</i> rs1799889	–2,276	1,387	–1,641	0,101
<i>PLAU</i> rs4065	1,8566	0,985	1,885	0,059
<i>PLAUR</i> rs344781	–0,7773	1,3769	–0,564	0,572
<i>PLAUR</i> rs2302524	2,0156	1,3489	1,494	0,135

Таблица 3. Морфометрические характеристики и интенсивность иммуногистохимической экспрессии uPA/uPAR в ткани плаценты

	Медиана (95% ДИ)		p
	ПН	Контроль	
Площадь ворсин (мм ²)	7,445 (6,852; 7,863)	6,464 (6,213; 7,157)	0,005
Площадь межворсинчатого пространства (мм ²)	6,621 (6,22; 7,17)	7,611 (6,887; 7,84)	0,007
Площадь сосудов ворсин (% от площади ворсин)	19,55 (16,45; 24,85)	18,2 (14,2; 22,6)	0,326
Стромально-сосудистое соотношение	0,206 (0,166; 0,26)	0,178 (0,147; 0,253)	0,462
Экспрессия uPA	116,449 (100,496; 128,74)	126,087 (113,761; 139,191)	0,033
Экспрессия uPAR	117,59 (96,24; 138,94)	130,42 (107,93; 152,91)	0,351

(рис. 2). Площадь сосудистого русла и величина стромально-сосудистого соотношения достигали наибольших значений при генотипе ТТ (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система uPA–uPAR многофункциональна. Наряду с фибринолитической активностью и участием в деградации внеклеточного матрикса она определяет доступность ростовых факторов, влияет на процессы миграции и пролиферации клеток. С момента имплантации эмбриона возрастает синтез урокиназы клетками трофобласта [11], повышается экспрессия uPAR на полюсе клетки, осуществляющем инвазию, параллельно активность uPA контролируют ингибиторы PAI-1,2. Таким образом, при активном участии урокиназной системы идет процесс модулируемой инвазии клеток трофобласта. Кроме клеток трофобласта источниками uPA в плаценте являются НК-клетки и макрофаги. С трофобласт-независимых стадий они обеспечивают ремоделирование спиральных артерий

эндометрия, и только в ассоциации с ними uPAR-позитивные гладкомышечные и эндотелиальные клетки приобретают миграционный фенотип [12, 13]. Под контролем урокиназной системы, а именно экспрессирующих данные белки клеток, находится и процесс образования и деградации фибриноида фибринового типа [14]. Протеолиз внеклеточного матрикса, в том числе сериновыми протеазами, приводит к высвобождению из его скаффолда ангиогенных факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Взаимодействие VEGF с его рецептором 2 класса в свою очередь приводит к экспонированию протеолитического комплекса uPA–uPAR с интегринами [15], что подтверждает роль урокиназной системы как посредника эффектов ангиогенных факторов и участника ангиогенеза, в том числе и в плаценте.

В ходе нашей попытки оценить риск развития плацентоассоциированных осложнений беременности в зависимости от наличия однонуклеотидных замен в генах матери и плода было показано, что наиболее низкому риску развития ПН соответствует ТТ генотип *PLAU* rs4065.

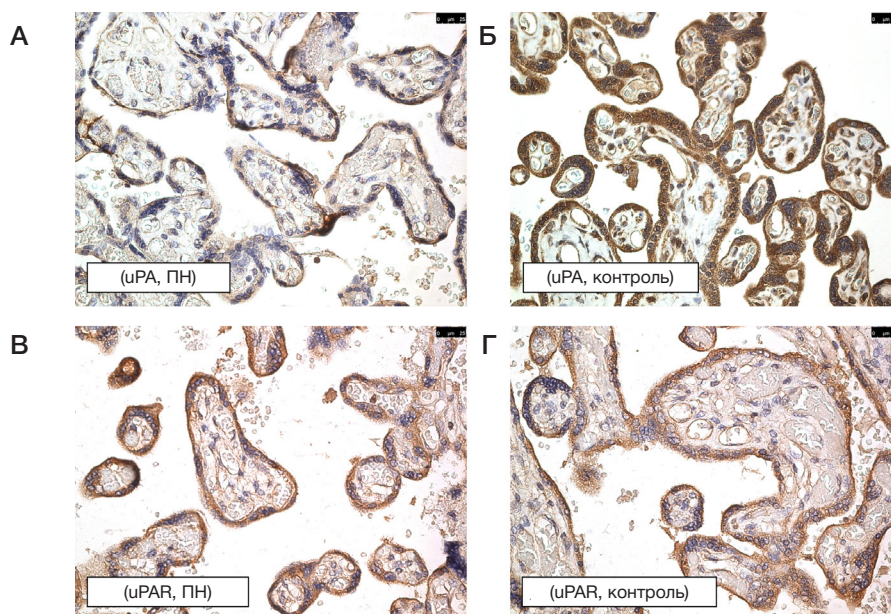


Рис. 1. Экспрессия uPA (А, Б) и uPAR (В, Г) ворсинами хориона в контрольной группе (А, В) и группе ПН (Б, Г) при иммуногистохимическом выявлении. В норме и при ПН отмечают интенсивное окрашивание синцитиотрофобласта антителами к uPA и uPAR (А–Г). В ткани плаценты при ПН (А) выявлено менее интенсивное uPA-окрашивание синцитиотрофобласта по сравнению с контрольной группой (Б). Разницы в экспрессии uPAR при ее иммуногистохимической оценке между группами выявлено не было (В, Г). Масштабная линейка — 25 мкм

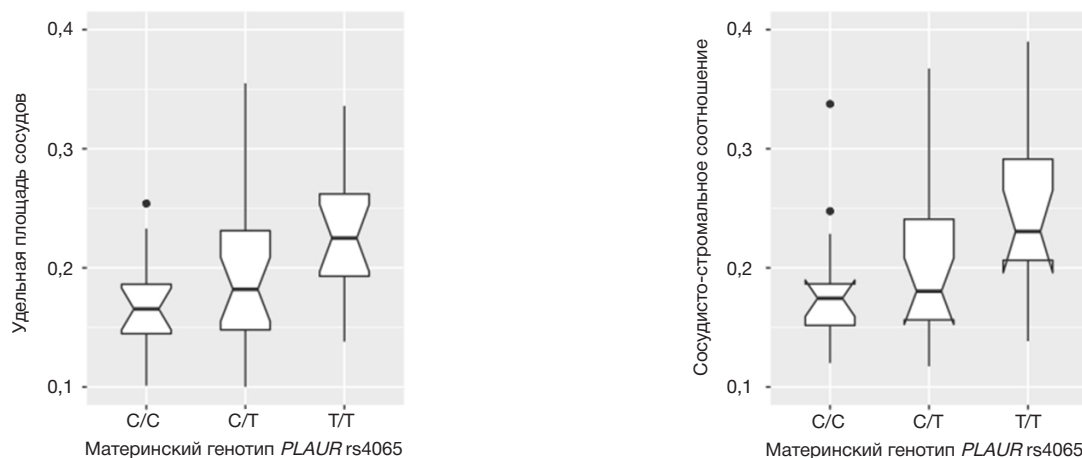


Рис. 2. Удельная площадь сосудистого русла ворсин и стромально-сосудистое соотношение в зависимости от генотипа матери по *PLAU* rs4065. Границами ящика служат первый и третий квартили, линия в середине ящика — медиана. Концы усов — разность первого квартиля и полутора межквартильных расстояний; сумма третьего квартиля и полутора межквартильных расстояний. Выбросы отображаются на графике в виде точек. Зарубками обозначены доверительные интервалы для медианы

Таблица 4. Площадь сосудистого русла и стромально-сосудистое соотношение в зависимости от генотипа матери по rs4065 *PLAU*

Генотип по rs4065	Площадь сосудистого русла, мм²			Стромально-сосудистое соотношение		
	Медиана	95% ДИ	p**	Медиана	95% ДИ	p**
CC	0,1655	[0,1461; 0,1849]	0,0305	0,1715	[0,1524; 0,1907]	0,0265
CT	0,182	[0,1528; 0,2112]		0,1804	[0,1485; 0,2123]	
TT	0,225	[0,1969; 0,2531]		0,2306	[0,1959; 0,2652]	

Примечание: ** — сравнение с использованием критерия Краскела–Уоллиса.

Учитывая, что в большинстве случаев, генотип плаценты совпадает с генотипом плода, закономерным было определить наличие аллеля Т у плода как более значимого. К сожалению, нам не удалось доказать, что изменения уровня uPA в плаценте обусловлены наличием исследованных однонуклеотидных замен в ее гене, что может быть обусловлено небольшим количеством изученных образцов. Однако ассоциация генотипа ТТ с большей площадью сосудистого компонента ворсин подтверждает выявленный при оценке риска развития ПН феномен.

Ранее было продемонстрировано, что экспрессия uPAR ворсинами хориона у пациенток с нормально протекающей беременностью выше, чем у тех, чья беременность осложнена угрозой ее прерывания [16]. В нашем исследовании уровни uPAR при иммуногистохимической оценке экспрессии белка не отличались в норме и у пациенток с плацентоассоциированными осложнениями беременности, однако были выявлены различия при сравнении групп по интенсивности экспрессии самой урокиназы.

Влияние rs4065 SNP напрямую на уровень экспрессии uPA не было доказано ранее. По полученным нами результатам можно предположить, что наличие генотипа

ТТ усиливает процессы миграции и пролиферации клеток, носит проангиогенный характер, снижая риск развития ПН. Данный факт подтверждает влияние этого полиморфизма на опухолевую прогрессию и аналогичное потенцирование опухолевого ангиогенеза. Существуют данные о значительном увеличении риска развития злокачественных новообразований при наличии аллеля Т и генотипа ТТ [17–19]. В то же время общепринят факт, что высокий уровень uPA в ткани ряда опухолей служит предпосылкой неблагоприятного исхода [20]. Кроме того, Т-аллель rs4065 связан с развитием синдрома Квебека — состояния, обусловленного избыточным фибринолизом вследствие повышенного содержания uPA в тромбоцитах [21].

ВЫВОДЫ

Высокий уровень uPA в плаценте и наличие генотипа ТТ у плода по rs4065 гена uPA носят протективный характер в отношении развития ПН. Мы предполагаем, что результаты проведенного исследования позволят расширить возможности неинвазивной пренатальной диагностики и прогнозировать развитие ПН путем генотипирования фетальной ДНК по rs4065 *PLAU*.

Литература

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the Human Placenta, 6th ed. Springer, 2012; p. 411.

2. Poettler M, Unseld M, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Koban F, Binder BR, et al. The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration. *Thromb Haemost.* 2012; 108 (8): 357–66.

3. Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova YV. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87 (4): 231–51.

4. Khosravi F, Zarei S, Ahmadvand N, Akbarzadeh-Pasha Z, Savadi E, Zarnani A, et al. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene mutation and different subgroups of recurrent miscarriage and implantation failure. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31 (1): 121–4.

5. Zhao L, Bracken MB, DeWan AT, Chen S. Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Human Reproduction.* 2013; 19 (3): 136–43.

6. Tran H, Maurer F, Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (20): 7177–88.

7. Xu J, Li W, Bao X, Ding H, Chen J, Zhang W, et al. Association of putative functional variants in the PLAU gene and the PLAU gene with myocardial infarction. *Clin Sci (Lond).* 2010; 119 (8): 353–9.

8. Yosrlimoto M, Youichi, Ushiyama Y, Sakaia M, Tamakia S, Hara H, et al. Characterization of single chain urokinase-type plasminogen

activator with a novel amino-acid substitution in the kringle structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1996; 1293 (1): 83–9.

9. Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, Persico AM, Levitt P. Genetic evidence implicating multiple genes in the met receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Res.* 2008; 1 (3): 159–68.

10. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22 (15): 1928–29.

11. Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Castillo-Trápala A, Armant DR. Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: Urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction.* 2011; 141 (2): 227.

12. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Percival K, Searle RF, Robson SC, et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum Reprod.* 2010; 25 (5): 1137–45.

13. Naruse K, Lash GE, Bulmer JN, Innes BA, Otun HA, Searle RF, et al. The Urokinase Plasminogen Activator (uPA) System in Uterine Natural Killer Cells in the Placental Bed During Early Pregnancy. *Placenta.* 2009; 30 (5): 398–404.

14. Pierleoni C, Castellucci M, Kaufmann P, Lund LR, Schnack Nielsen B. Urokinase receptor is up-regulated in endothelial cells and macrophages associated with fibrinoid deposits in the human placenta. *Placenta.* 2003; 24 (6): 677–85.

15. Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/ uPAR system. *Cell adhesion & migration.* 2012; 6 (6): 535–40.

16. Liu S, Zheng Q, Cui XY, Dai KX, Yang XS, Li FS, et al. Expression

ВЕСТНИК РГМУ | 6, 2019 | VESTNIKRGMU.RU

59

of uPAR in human trophoblast and its role in trophoblast invasion. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2015; 8 (11): 14325–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713534/>.

17. Xu Z, Meng L-L, Lin J, Ling Y, Chen S, Lin N. Association between the polymorphisms of urokinase plasminogen activation system and cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* [Internet]. Dove Medical Press. 2015; 9 (8): 2493–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574847/>.
18. Andreasen P, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.

Int J Cancer. 1997; 72 (1): 1–22.

19. Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol*. 1999; 71 (2): 130–5.
20. Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Ireland; 2012 May; 222 (1): 8–14.
21. Diamandis M, Paterson AD, Rommens JM, Veljkovic DK, Blavignac J, Bulman DE, et al. Quebec platelet disorder is linked to the urokinase plasminogen activator gene (PLAU) and increases expression of the linked allele in megakaryocytes. *Blood*. 2009; 113 (7): 1543–6.

References

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the Human Placenta*, 6th ed. Springer, 2012; p. 411.
2. Poettler M, Unseld M, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Koban F, Binder BR, et al. The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration. *Thromb Haemost*. 2012; 108 (8): 357–66.
3. Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova YV. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009; 87 (4): 231–51.
4. Khosravi F, Zarei S, Ahmadvand N, Akbarzadeh-Pasha Z, Savadi E, Zarnani A, et al. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene mutation and different subgroups of recurrent miscarriage and implantation failure. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31 (1): 121–4.
5. Zhao L, Bracken MB, DeWan AT, Chen S. Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Human Reproduction*. 2013; 19 (3): 136–43.
6. Tran H, Maurer F, Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol*. 2003; 23 (20): 7177–88.
7. Xu J, Li W, Bao X, Ding H, Chen J, Zhang W, et al. Association of putative functional variants in the PLAU gene and the PLAUR gene with myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 119 (8): 353–9.
8. Yosrlimoto M, Youichi, Ushiyama Y, Sakaia M, Tamakia S, Hara H, et al. Characterization of single chain urokinase-type plasminogen activator with a novel amino-acid substitution in the kringle structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1996; 1293 (1): 83–9.
9. Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, Persico AM, Levitt P. Genetic evidence implicating multiple genes in the met receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Res*. 2008; 1 (3): 159–68.
10. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–29.
11. Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Castillo-Trápala A, Armant DR. Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: Urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction*. 2011; 141 (2): 227.
12. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Percival K, Searle RF, Robson SC, et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum Reprod*. 2010; 25 (5): 1137–45.
13. Naruse K, Lash GE, Bulmer JN, Innes BA, Otun HA, Searle RF, et al. The Urokinase Plasminogen Activator (uPA) System in Uterine Natural Killer Cells in the Placental Bed During Early Pregnancy. *Placenta*. 2009; 30 (5): 398–404.
14. Pierleoni C, Castellucci M, Kaufmann P, Lund LR, Schnack Nielsen B. Urokinase receptor is up-regulated in endothelial cells and macrophages associated with fibrinoid deposits in the human placenta. *Placenta*. 2003; 24 (6): 677–85.
15. Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell adhesion & migration*. 2012; 6 (6): 535–40.
16. Liu S, Zheng Q, Cui XY, Dai KX, Yang XS, Li FS, et al. Expression of uPAR in human trophoblast and its role in trophoblast invasion. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2015; 8 (11): 14325–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713534/>.
17. Xu Z, Meng L-L, Lin J, Ling Y, Chen S, Lin N. Association between the polymorphisms of urokinase plasminogen activation system and cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* [Internet]. Dove Medical Press. 2015; 9 (8): 2493–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574847/>.
18. Andreasen P, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 1997; 72 (1): 1–22.
19. Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol*. 1999; 71 (2): 130–5.
20. Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Ireland; 2012 May; 222 (1): 8–14.
21. Diamandis M, Paterson AD, Rommens JM, Veljkovic DK, Blavignac J, Bulman DE, et al. Quebec platelet disorder is linked to the urokinase plasminogen activator gene (PLAU) and increases expression of the linked allele in megakaryocytes. *Blood*. 2009; 113 (7): 1543–6.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ДЕВОЧЕК, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К ЧАСТЫМ РЕСПИРАТОРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

А. В. Казакова¹, Е. В. Уварова², Л. В. Лимарева¹✉, О. И. Линева¹, Г. Н. Светлова¹, А. А. Трупакова¹¹ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва, Россия

Респираторные заболевания (ОРЗ) относят к числу наиболее распространенных заболеваний детского возраста и служат поводом частого обращения за медицинской помощью. Повышенная заболеваемость детей определяется целым рядом факторов, в том числе наличием дисбаланса в системе цитокинов, уровень синтеза которых генетически детерминирован. Целью работы было проанализировать особенности распределения шести клинически значимых полиморфных локусов в генах провоспалительных цитокинов у девочек с частыми респираторными заболеваниями. Среди девочек 7–17 лет, проходящих плановый профилактический осмотр, на основании анамнеза была выделена группа часто болеющих детей. Проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов генов провоспалительных цитокинов *IL1β T-31C* (rs1143627), *IL1β T-511C* (rs16944), *IL1β C-3953T* (rs1143634), *IL1β G-1473C* (rs1143623) в гене интерлейкина-1β; *IL6 C-174G* (rs1800795) — в гене интерлейкина-6 и *TNFα G-308A* (rs1800629) — в гене фактора некроза опухоли альфа с предрасположенностью к частым респираторным заболеваниям. Полиморфные варианты генов выявляли методом ПЦР с электрофоретической детекцией. Показано, что с повышенным риском рецидивирующих респираторных заболеваний у девочек 7–17 лет ассоциированы аллели *C-31* (rs1143627) (ОШ = 2,05; ДИ: 1,16–3,64; $p = 0,013$) и *C-511* гена *IL-1β* (rs16944) (ОШ = 3,11; ДИ: 1,25–7,76; $p = 0,013$).

Ключевые слова: часто болеющие дети, провоспалительные цитокины, полиморфизм генов

Информация о вкладе авторов: А. В. Казакова — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статобработка, написание и редактирование текста; Е. В. Уварова — концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Л. В. Лимарева — концепция и дизайн исследования, статобработка, написание и редактирование текста; А. А. Трупакова — сбор и обработка материала; Г. Н. Светлова, О. И. Линева — написание текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом СамГМУ (протокол № 5 от 20 апреля 2018 г.). Родителями участников исследования были подписаны добровольные информированные согласия на участие в исследовании и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Лариса Владимировна Лимарева
ул. Гагарина, д. 20, г. Самара, 443079; larisa-limareva@yandex.ru**Статья получена:** 02.12.2019 **Статья принята к печати:** 18.12.2019 **Опубликована онлайн:** 25.12.2019**DOI:** 10.24075/vrgmu.2019.087

POLYMORPHISM OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN GIRLS PREDISPOSED TO RECURRENT RESPIRATORY INFECTIONS

Kazakova AV¹, Uvarova EV², Limareva LV¹✉, Lineva OI¹, Svetlova GN¹, Trupakova AA¹¹ Samara State Medical University, Samara² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow

Acute respiratory infections (ARI) are very common in children and often prompt parents to seek medical advice. Increased susceptibility to ARI is caused by a number of factors, including genetically determined imbalances in cytokine production. The aim of this study was to analyze the frequency of 6 clinically relevant polymorphisms of proinflammatory cytokine genes in girls predisposed to recurrent respiratory infections. The study was conducted in girls aged 7–17 years who were undergoing a routine medical checkup. A group of children with frequent respiratory infections was identified. The following polymorphisms were analyzed for possible associations with predisposition to frequent respiratory infections: *IL1β T-31C* (rs1143627), *IL1β T-511C* (rs16944), *IL1β C-3953T* (rs1143634), *IL1β G-1473C* (rs1143623), *IL6 C-174G* (rs1800795), and *TNFα G-308A* (rs1800629). For polymorphism detection, PCR and gel electrophoresis were used. The following alleles were found to be associated with an increased risk for recurrent respiratory infections in girls aged 7–17 years: *C-31* (rs1143627) (OR = 2.05; CI: 1.16–3.64; $p = 0.013$) and *C-511* (rs16944) (OR = 3.11; CI: 1.25–7.76; $p = 0.013$) of the *IL-1β* gene.

Keywords: recurrent respiratory infections in children, pro-inflammatory cytokines, gene polymorphism

Author contribution: Kazakova AV — conception and design of the study; data acquisition and statistical analysis; Uvarova EV — conception and design of the study; manuscript preparation; Limareva LV — conception and design of the study; statistical analysis; manuscript preparation; Trupakova AA — data acquisition; Svetlova GN, Lineva OI — manuscript preparation.

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.

✉ **Correspondence should be addressed:** Larisa V. Limareva
Gagarina, 20, Samara, 443079; larisa-limareva@yandex.ru**Received:** 02.12.2019 **Accepted:** 18.12.2019 **Published online:** 25.12.2019**DOI:** 10.24075/brsmu.2019.087

В настоящее время убедительно доказана ведущая роль иммунитета в развитии и течении заболеваний. Важнейшими медиаторами межклеточных взаимоотношений в иммунной системе являются цитокины, регулирующие иммуногенез в норме и при патологии [1, 2]. Дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов приводит к нарушению противомикробной защиты, а также к хронизации патологического процесса [3]. Активность синтеза

цитокинов определяется экспрессией соответствующих генов, которая обусловлена не только влиянием персистирующих микроорганизмов, но и генетическими особенностями организма хозяина [4]. Существование однонуклеотидных замен (SNP) в генах человека, кодирующих иммунокомпетентные молекулы, определяет различные уровни их синтеза в ответ на инфекцию, что влияет на развитие и клиническое течение заболевания [5–7].

Верифицирован ряд полиморфных локусов промоторных регионов генов, связанных с продукцией провоспалительных цитокинов — *IL1β*, *IL6*, *TNFα* и др. [8–12].

Острые респираторные заболевания (ОРЗ) относят к числу наиболее распространенных заболеваний детского возраста. В настоящее время к часто болеющим (более шести эпизодов в год) относят детей с повторной или рецидивирующей респираторной вирусной, бактериальной или смешанной инфекционной патологией ЛОР-органов (аденоидит, тонзиллит, отит), верхних (ларингит) или нижних (трахеит, бронхит, пневмония) дыхательных путей, развивающейся на фоне сниженного иммунитета или неадекватного лечения острого респираторного заболевания [13–15]. Повышенная заболеваемость детей обусловлена целым рядом факторов, в том числе генетическими. В настоящее время идет поиск возможных иммуногенетических маркеров этой предрасположенности.

Целью исследования было выявить ассоциации полиморфизма генов ключевых провоспалительных цитокинов с предрасположенностью к частым респираторным заболеваниям у девочек-школьниц в возрасте от 7 до 17 лет.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Всего были обследованы 116 девочек-школьниц в возрасте 7–17 лет, проживающих в городе Самаре, обратившихся к детскому гинекологу в рамках медицинских (профилактических) осмотров в течение 2014–2016 гг. Критерии включения в группу: возраст от 7 до 17 лет; отсутствие тяжелых органических патологий; соответствие физического, полового и психического развития возрастным нормативам. Критерии исключения: иной возраст; наличие тяжелых органических патологий; несоответствие развития возрастным нормативам. Были изучены особенности анамнеза (частота и характер течения острых респираторных заболеваний) и особенности распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов провоспалительных цитокинов методом ПЦР с электрофоретической детекцией результата с помощью тест-систем SNP-ЭКСПРЕСС («ЛИТЕХ»; Россия). Выявляли следующие точечные мутации генов: *IL1β T-31C* (rs1143627); *IL1β T-511C* (rs16944), *IL1β C-3953T* (rs1143634), *IL1β G-1473C* (rs1143623) в гене интерлейкина-1β; *IL6 C-174G* (rs1800795) в гене интерлейкина-6, *TNFα G-308A* (rs1800629) в гене фактора некроза опухоли альфа. ДНК для исследования выделяли из буккального эпителия с помощью набора реагентов для экспресс-выделения ДНК из буккального соскоба того же производителя. Все исследуемые замены SNP связаны с характеристикой иммунного статуса человека и входят в список рекомендованных для изучения в клинко-диагностических целях на XXV-м Международном совещании по гистосовместимости и иммуногенетике, Бразилия, 2008 г. [16].

Для амплификации использовали детектирующий термоциклер DTLite в комплектации 4S1 («ДНК-Технология»; Россия). Оценку соответствия выявленных частот генотипов закону Харди–Вайнберга в сравнении с ожидаемыми частотами генотипов равновесного распределения по критерию Пирсона χ^2 -квадрат, а также выявление ассоциаций и значимость различий в частоте встречаемости качественных признаков (расчет отношения шансов (ОШ) с указанием 95%-го доверительного интервала (ДИ)) осуществляли *online* с

помощью программы DeFinetti на сайте института генетики человека (Мюнхен, Германия) [17]. Анализировали данные, полученные при гипотезе доминирования минорной аллели, предполагающей оценку риска носительства данной аллели в любых сочетаниях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ клинко-анамнестических данных показал, что у 56,9% обследованных девочек острые респираторные заболевания возникали до 6–10 раз в год, что позволило отнести их к группе часто болеющих детей. У 10,6% из них диагностирована хроническая патология ЛОР-органов (тонзиллит, фаринголарингит) с частыми обострениями (до 4–6 раз в год), которые проявлялись на фоне острой вирусной и/или бактериальной инфекции. В связи с этим все обследованные девочки были разделены на две группы: 65 девочек составили группу детей с частыми острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) и 51 девочка вошла в группу детей без частых ОРЗ.

Частота встречаемости генотипов полиморфных вариантов пяти из шести проанализированных полиморфизмов генов иммунной системы соответствовала равновесию Харди–Вайнберга, за исключением полиморфизма гена *TNFα (G-308A)*. В связи с этим указанный полиморфизм был исключен из дальнейшего анализа (см. табл.).

Анализ частот встречаемости аллелей и генотипов генов провоспалительных цитокинов в общей популяции девочек выявил преобладание носителей аллелей *T-31*, *G-1473*, *C-3953* гена *IL1β* ($p < 0,05$), определяющих высокие уровни синтеза соответствующего цитокина. В случае полиморфизма *IL1β (T-511C)* и *IL6 (C-174G)* имело место относительно равномерное распределение аллелей, ассоциированных с высоким и низким уровнями синтеза цитокина.

Сравнительная оценка отдельных полиморфизмов в клинически значимых локусах генов цитокинов, связанных с высокими и низкими уровнями их экспрессии, показала, что в группе часто болеющих девочек статистически значимо чаще встречаются аллели *C* в позициях *31* и *511* гена *IL1β* в гомозиготном и гетерозиготном состояниях. Наличие аллеля *C-31* повышало риск частых респираторных заболеваний в два раза (ОШ = 2,05; ДИ: 1,16–3,64) по сравнению с носительством аллеля *T-31*. Наибольший риск попадания в группу часто болеющих детей имеют девочки с генотипом *CC* по сравнению с гетерозиготами *CT* (ОШ = 2,58; ДИ: 1,14–5,85), а также по сравнению с объединенной группой генотипов *CT+TT* (ОШ = 2,65; ДИ: 1,25–5,63). Наличие аллеля *C-511* в любых вариантах также с высокой долей вероятности несло риски возникновения частых респираторных заболеваний (ОШ = 1,68; ДИ: 0,99–2,83; $p = 0,053$). Риск частых респираторных заболеваний статистически значимо повышался в три раза и более у носителей гомозиготы *CC* по сравнению с гетерозиготами *CT* (ОШ = 3,28; ДИ: 1,22–8,79), наличием гомозиготы *TT* (ОШ = 2,9; ДИ: 1,03–8,17) и по сравнению с объединенной группой генотипов *CT + TT* (ОШ = 3,11; ДИ: 1,25–7,76) в локусе *-511C/T* гена *IL1β*.

Гипотеза наличия ассоциаций развития частых респираторных заболеваний с полиморфизмом в локусе гена *IL6 (C-174G)* не получила статистически значимых подтверждений, однако у часто болеющих девочек носительство аллеля *G*, связанного с высоким уровнем синтеза цитокина, встречалось в состоянии гомозиготы

Таблица. Частота аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов провоспалительных цитокинов у девочек 7–17 лет

Ген, полиморфизм	Аллель, генотип	Частота встречаемости, абс./%			
		Все девочки <i>n</i> = 116	Без частых ОРЗ <i>n</i> = 51	Часто болеющие ОРЗ <i>n</i> = 65	Отношение шансов (доверительный интервал) при условии доминирования минорной аллели
IL1B (T–31C)	T	100/67,0 ± 3,3*	46/75,0 ± 4,7	54/60,0 ± 4,4	[1]<-->[2]**: 2.05 (1.16–3.64), $\chi^2 = 6.18$, $p = 0.013$ [11]<-->[12]**: 2.58 (1.14–5.85), $\chi^2 = 5.28$, $p = 0.022$ [11]<-->[22]: 2.84 (0,87–9,28), $\chi^2 = 5.28$, $p = 0.077$ [11]<-->[12 + 22]**: 2.65 (1.25–5.63), $\chi^2 = 6.53$, $p = 0.011$
	C	61/33,0 ± 3,3	20/25,0 ± 4,7	41/40,0 ± 4,4	
	TT	55/47,4	31/60,8	24/36,9	
	CT	45/38,8	15/29,4	30/46,2	
	CC	16/13,8	5/9,8	11/16,9	
IL1B (T–511C)	T	78/45,0 ± 3,4	36/52 ± 5,5	42/39 ± 4,1	[1]<-->[2]: 1,68 (0,99–2,83), $\chi^2 = 3,74$, $p = 0.053$ [11]<-->[12]**: 3.28 (1.22–8.79), $\chi^2 = 5.80$, $p = 0.016$ [11]<-->[22]**: 2.90 (1.03–8.17), $\chi^2 = 3,13$, $p = 0.042$ [11]<-->[12+22]**: 3.11(1.25–7.76), $\chi^2 = 6.24$, $p = 0.013$
	C	90 / 55,0 ± 3,4	34/48 ± 5,5	56/61 ± 4,1	
	TT	26 / 22,4	17/33,3	9/13,8	
	CT	52 / 44,8	19/37,3	33/50,8	
	CC	38 / 32,8	15/29,4	23/35,4	
IL1B (G–1473C)	G	94 / 57,0 ± 3,3*	40/59,0 ± 5,3	54/55 ± 4,1	[1]<-->[2]: 1,15 (0,68–1,94), $\chi^2 = 0,28$, $p = 0,600$ [11]<-->[12]: 2,00 (0,86–4,63), $\chi^2 = 2,65$, $p = 0,104$ [11]<-->[22]: 1,11 (0,39–3,18), $\chi^2 = 0,04$, $p = 0.844$ [11]<-->[12 + 22]: 1,69(0,77–3,68), $\chi^2 = 1,72$, $p = 0.189$
	C	78 / 43,0 ± 3,3	31/41±5,3	47/45 ± 4,1	
	GG	38 / 32,7	20/39,2	18/27,7	
	GC	56 / 48,3	20/39,2	36/55,4	
	CC	22 / 19,0	11/21,6	11/16,9	
IL1β (C–3953T)	C	109/78,0 ± 2,8*	48/80 ± 4,2	51/77,0 ± 3,8	[1]<-->[2]: 0,28 (0,65–2,33), $\chi^2 = 0,41$, $p = 0,524$ [11]<-->[12]: 1,37 (0,61–3,09), $\chi^2 = 0,58$, $p = 0.447$ [11]<-->[22]: 1,16 (0,24–5,57), $\chi^2 = 0,04$, $p = 0.851$ [11]<-->[12 + 22]: 1,33 (0,62–2,87), $\chi^2 = 0,54$, $p = 0.461$
	T	43 / 22,0 ± 2,8	17/20,0 ± 4,2	26/23,0 ± 3,8	
	CC	73 / 62,9	34/66,7	39/60,0	
	TC	36 / 31,0	14/27,5	22/33,9	
	TT	7 / 6,0	3/5,9	4/6,2	
IL6 (C –174G)	C	79 / 45,0 ± 3,4	31/40,0 ± 5,2	48/48,0 ± 4,3	[1]<-->[2]: 0,72 (0,42–1,21), $\chi^2 = 1,58$, $p = 0.209$ [11]<-->[12]: 1,05 (0,40–2,76), $\chi^2 = 0,01$ $p = 0.925$ [11]<-->[22]: 0,57 (0,20–1,59), $\chi^2 = 1,18$, $p = 0.277$ [11]<-->[12 + 22]: 0,81 (0,33–2,00), $\chi^2 = 0,20$, $p = 0.652$
	G	91 / 55,0 ± 3,4	41/60,0 ± 5,2	50/52,0 ± 4,3	
	CC	25 / 21,5	10/19,6	15/23,1	
	CG	54 / 46,5	21/41,2	33/50,8	
	GG	37 / 31,9	20/39,2	17/26,2	
TNFα (G–308A)	G	32 / 18,0 ± 2,9	Не соответствует закону распределения Харди–Вайнберга ($p = 0,0001$)		
	A	106/92,0 ± 2,9			
	GG	10 / 8,6			
	GA	22 / 19,0			
	AA	84 / 72,4			

Примечание: ОРЗ — острые респираторные заболевания; * — статистически значимые отличия частоты встречаемости аллели в локусе ($p < 0,05$); ** — статистически значимые ассоциации с повышенным риском рецидивирующих респираторных заболеваний.

в 1,5 раза реже, чем у девочек без частых простудных заболеваний (ОШ = 0,57; ДИ: 0,20–1,59; $p = 0,277$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Частые и длительные респираторные заболевания, особенно в раннем возрасте — нерешенная медицинская проблема, создающая, в свою очередь, значительные социальные и экономические проблемы для детей, их семей и общества. Согласно современным представлениям, основной причиной высокой восприимчивости детей к инфекции является незрелость иммунной системы и наследственная предрасположенность к инфекционным заболеваниям [18, 19]. Важную роль в противоинфекционной защите организма играют цитокины, регулирующие защитные реакции не только в рамках иммунной системы, но и на уровне всего организма. К настоящему времени накоплено большое количество данных о наличии функционального полиморфизма генов цитокинов, связанного с заменами

единичных нуклеотидов (полиморфизм вследствие различия единичных нуклеотидов), которые приводят к количественным изменениям функционирования соответствующих генов. Такой функциональный полиморфизм генов цитокинов обуславливает индивидуальные наследственные колебания уровня их продукции, влияющие на развитие и исход инфекционных заболеваний и иммунопатологических процессов [20]. Провоспалительные цитокины играют центральную роль в формировании и регуляции воспалительных реакций, как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. В связи с этим изучение полиморфизма генов ключевых провоспалительных цитокинов может привести к новым направлениям в диагностике и лечении заболеваний [21, 22]. В нашем исследовании был проведен анализ ассоциаций полиморфизма генов ключевых провоспалительных цитокинов с предрасположенностью к частым респираторным заболеваниям у девочек-школьниц в возрасте от 7 до 17 лет. Оценивались клинически значимые

функциональные полиморфизмы *IL1β* (T-31C), *IL1β* (T-511C), *IL1β* (C-3953T), *IL1β* (G-1473C) в гене интерлейкина-1β, *IL6* (C-174G) в гене интерлейкина-6, *TNFα* (G-308A) в гене фактора некроза опухоли альфа.

На первом этапе была проанализирована частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов провоспалительных цитокинов, а также проверено соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга среди всех обследованных девочек-школьниц без учета предрасположенности к респираторным заболеваниям. Необходимость данного этапа объяснялась тем, что именно соответствие полученных в наблюдении частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга позволяет судить об адекватности выбора субъектов для проведения генетических исследований. Исследование показало, что частота встречаемости генотипов пяти из шести проанализированных полиморфных вариантов соответствовала равновесию Харди–Вайнберга, за исключением полиморфизма *TNFα* (G-308A). Для полиморфизма G-308A гена *TNFα* наблюдаемая гетерозиготность в общей группе обследованных девочек отличалась от ожидаемой, что может быть связано как с недостаточным количеством числа наблюдений, так и с особенностями распределения аллелей данного локуса в исследуемой группе. В связи с этим указанный полиморфизм был исключен из дальнейшего анализа.

Анализ характера распределения аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *IL1β* и *IL6* выявил преобладание носителей аллелей T-31, G-1473, C-3953 гена *IL1β* и G-174 в гене *IL6* в общей группе обследованных школьниц. Распределение аллелей полиморфизма *IL1β* (T-511C) было относительно равномерным. Выявленный характер распределения аллелей и генотипов совпадал с описанным для европейской популяции женщин [23], а также русских женщин, проживающих в городе Москва [24], что, по-видимому, свидетельствует об эволюционном преимуществе аллелей, определяющих высокий уровень синтеза провоспалительных цитокинов, по крайней мере, в европеоидной популяции.

Последующий анализ ассоциаций между носительством аллелей/генов в полиморфных локусах провоспалительных цитокинов показал, что наличие аллелей C-31 и C-511 в гене *IL1β* статистически значимо повышало риск возникновения частых респираторных заболеваний в 2–3 раза, особенно при гомозиготном варианте. У часто болеющих девочек также в 1,5 раза реже встречался аллель G в локусе 174 гена интерлейкина-6 ($p > 0,05$). Обнаруженная нами связь между полиморфными аллелями C-31, C-511 локусов гена *IL1β* и частыми респираторными заболеваниями согласуется с данными литературы, согласно которым данный интерлейкин играет центральную роль в генерации и регуляции противоинфекционного иммунитета, а носительство полиморфных вариантов в позициях 31T и 511T в большинстве случаев определяет увеличение выработки цитокина *in vivo* и *in vitro* по сравнению с

аллелями C, носительство которых увеличивает частоту и тяжесть респираторных заболеваний у детей и взрослых [25–27].

Для ряда европеоидных популяций показано, что SNP *IL1β* (T-31C) находится в 100%-м неравновесном сцеплении с SNP *IL1β* (T-511C) [28], что, по-видимому, и объясняет выявление сходных рисков именно для данной пары полиморфизмов.

Вместе с тем тот факт, что нами была выявлена статистически значимая связь частых респираторных заболеваний только для двух полиморфизмов гена *IL1β*, свидетельствует, на наш взгляд, о необходимости выделения среди часто болеющих детей подгрупп с преобладанием вирусных или бактериальных инфекций, наличием/отсутствием аллергических заболеваний и т. д., а также увеличения числа обследованных в группах. В то же время система цитокинов — это полиморфная регуляторная сеть медиаторов с высокой надежностью, плейотропным действием, биологические эффекты которой характеризуются каскадностью, разнообразием и нередко избыточностью [29]. Поэтому снижение экспрессии одного или нескольких генов цитокинов и уменьшение продукции соответствующих пептидных медиаторов не всегда будут сопровождаться наличием ярко выраженной патологии. Все это говорит о том, что при изучении влияния полиморфизма генов цитокинов на патологические состояния недостаточно анализа носительства отдельных полиморфных вариантов в нескольких генах цитокиновой сети. Необходимо учитывать сцепленное наследование, взаимное влияние, взаимодействие с рецепторами и другие факторы, влияющие на цитокиновый статус в норме и при развитии патологии.

ВЫВОДЫ

1. В исследованной группе девочек 7–17 лет, проживающих в г. Самаре, преобладают носители аллелей T-31, G-1473, C-3953 гена *IL1β* и G-174 в гене *IL6*.
2. Наличие аллелей C-31 и C-511 в гене *IL1β* ассоциировано с повышенным риском возникновения частых респираторных заболеваний.
3. В связи с выявлением связи между аллельными вариантами генов цитокинов и респираторными заболеваниями необходимо дальнейшее комплексное изучение функционального полиморфизма генов цитокинов для разработки новых направлений в диагностике, профилактике и персонализации лечения заболеваний.
4. При оценке индивидуальных иммуногенетических особенностей и поиске генетических маркеров для прогнозирования, профилактики и персонализации терапии недостаточно анализа носительства отдельных полиморфных вариантов в нескольких генах цитокиновой сети — необходимо учитывать сцепленное наследование, взаимное влияние, взаимодействие с рецепторами и другие факторы, влияющие на цитокиновый статус в норме и при развитии патологии.

Литература

1. Сепиашвили Р. И., Славянская Т. А. Стратегия и тактика комплексной иммунореабилитации больных с заболеваниями иммунной системы. Аллергология и иммунология. 2015; 16(1): 51–7.
2. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008; 552 с.
3. Гуломов З. С., Симбирцев А. С., Янов Ю. К., Варюшина Е. А., Тырнова Е. В. Роль цитокинов при лечении острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей (Обзор литературы). Российская оториноларингология. 2008; 37 (6): 200–05.

4. Прилепская В. Н., Летуновская А. Б., Донников А. Е. Микробиоценоз влагалища и полиморфизм генов цитокинов как маркер здоровья женщины (обзор литературы). Гинекология. 2015; 17 (2): 4–13.
5. Бодяенкова Г. М., Титова Ж. В. Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии (Обзор). Успехи современного естествознания. 2015; (1): 616–20.
6. Нестерова И. В., Ковалева С. В., Клещенко Е. И., Шинкарева О. Н., Малиновская В. В., Выжлова Е. Н. Ретроспективный анализ клинической эффективности коротких курсов интерферонов в лечении ОРВИ у иммунокомпрометированных часто и длительно болеющих детей. Педиатрия. Журнал имени Г. Н. Сперанского. 2014; 93 (2): 62–7. DOI:10.24110/0031-403X-2014-93-2-62-67
7. Шевченко А. В., Голованова О. В., Коненков В. И. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 и TNF- α у европеоидного населения Западной Сибири. Иммунология. 2010; (4): 176–81.
8. Абрамов Д. Д., Кофиади И. А., Хаитов М. Р., Сергеев И. В., Трофимов Д. Ю., Гудима Г. О. и др. Особенности полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа, в русской популяции. Российский аллергологический журнал. 2012; (6): 72–5.
9. Прокофьев В. Ф., Шевченко А. В., Голованова О. В., Зонина Е. В., Королев М. А., Леонова Ю. Б. Комплексный анализ полиморфизма в промоторных участках генов цитокинов IL-1B T-31C, IL-6 G-174C, TNFA G-238A, TNFA G-308A, TNFA C-863A, IL-4 C-590T и IL-10 C-592 α в прогнозе эффекта от лечения ревматоидного артрита. Медицинская иммунология. 2010; (4): 361–74.
10. Смольникова М. В., Смирнова С. В., Тютинина О. С. Полиморфизм генов цитокинов при atopической бронхиальной астме. Сибирское медицинское обозрение. 2013; (2) 63–9.
11. Kutikhin AG, Brusina EB, Volkov AN, Yuzhalin AE, Zhivotovskiy AS. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1B and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study. Tumor Biol. 2014; 35 (5): 4821–30.
12. Zhu Q, Sun J, Chen Y. Preterm birth and single nucleotide polymorphisms in cytokine genes. Transl Pediatr. 2014; 3 (2): 120–34. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.02.
13. Абрамова Н. А., Савенкова М. С. Роль социальных и экологических факторов в формировании группы часто болеющих детей в социально благополучных семьях г. Москвы. Детские инфекции. 2013; (4): 52–7.
14. Юлиш Е. И., Ярошенко С. Я. Часто болеющие дети и тактика педиатра. Здоровье ребенка. 2013; 49 (6): 70–6.
15. Хлынина Ю. О., Крамарь Л. В. Современные подходы к профилактике и лечению ОРЗ у часто болеющих детей. Лекарственный вестник. 2015; 59 (4): 40–5.
16. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. An update to HLA nomenclature. 2010. 2010; 45 (5): 846–8.
17. Доступно по ссылке: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
18. Левина А. С., Бабаченко И. В., Скрипченко Н. В., Имянитов Е. Н. Этиологическая структура заболеваний у часто болеющих детей в зависимости от возраста. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017; 62 (2): 72–7.
19. Esposito S, Bianchini S, Bosis S, Tagliabue C, Coro I, Argentiero A. et al. A randomized, placebo-controlled, double-blinded, single-centre, phase IV trial to assess the efficacy and safety of OM-85 in children suffering from recurrent respiratory tract infections. J Transl Med. 2019 Aug 23; 17 (1): 284. DOI: 10.1186/s12967-019-2040-y. PMID: 31443716 Free PMC Article.
20. Симбирцев А. С., Тотолян А. А. Цитокины в лабораторной диагностике. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2015; (2): 82–98.
21. Казакова А. В., Уварова Е. В., Лимарева Л. В., Трупакова А. А., Мишина А. И. Способ прогнозирования бактериального вульвовагинита у девочек в зависимости от стадии полового развития согласно шкале Таннера. Вестник РГМУ. 2019; (5): 116–22. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.070.
22. Khazim K, Azulay EE, Kristal B, Cohen I. Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. Immunol Rev. 2018 Jan; 281 (1): 40–56. DOI: 10.1111/imr.12620.
23. Доступно по ссылке: <http://www.ensembl.org/index.html>.
24. Кофиади И. А., Кадочникова В. В., Абрамов Д. Д., Гончарова Е. В., Донников А. Е., Трофимов Д. Ю. Частота встречаемости 100 клинически значимых однонуклеотидных полиморфизмов у здоровых представителей русской популяции. Физиология и патология иммунной системы. 2011; (2): 3–10.
25. Терскова Н. В., Шнайдер Н. А., Вахрушев С. Г., Иконникова Е. В., Пилюгина М. С. Роль полиморфизма гена интерлейкина-1 β в развитии воспаления глоточной миндалины. Рос. оториноларингология. 2010; (6): 87–93.
26. Chen H, Wilkins LM, Aziz N. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. Hum Mol Genet. 2006; (15): 519–29.
27. Todorović MM, Zvrko EZ. Immunoregulatory cytokines and chronic tonsillitis. Bosn J Basic Med Sci. 2013; 13 (4): 230–6. PMID: 24289758.
28. Громова А. Ю., Симбирцева А. С. Полиморфизм генов семейства IL1 человека. Цитокины и воспаление. 2005; (2): 3–12.
29. Цыган В. Н., Иванов А. М., Камилова Т. А., Протасов О. В., Артюшкин С. А. Генетический полиморфизм цитокинов. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2010; 30 (2): 211–9.

References

1. Sepiashvili RI, Slavyanskaya TA. Strategiya i taktika kompleksnoy immunoreabilitatsii bol'nykh s zabolevaniyami immunnoy sistemy. Allergologiya i immunologiya. 2015; 16 (1): 51–7. Russian.
2. Ketlinskiy SA, Simbirtsev AS. Tsitokiny. SPb.: Foliant, 2008; 552 s. Russian.
3. Gulomov ZS, Simbirtsev AS, Yanov YuK, Varyushina EA, Tyrnova EV. Rol' tsitokinov pri lechenii ostrykh i khronicheskikh zabolevaniy verkhnikh dykhatel'nykh putey (Obzor literatury). Rossiyskaya otorinolaringologiya. 2008; 37 (6): 200–5. Russian.
4. Prilepskaya VN, Letunovskaya AB, Donnikov AE. Mikrobiotsenoz vlagalishcha i polimorfizm genov tsitokinov kak marker zdorov'ya zhenshchiny (obzor literatury). Ginekologiya. 2015; 17 (2): 4–13.
5. Bodiynkova GM, Titova ZhV. Rol' polimorfizma i ekspressii otidel'nykh genov tsitokinov v formirovaniy patologii (Obzor). Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2015; (1): 616–20. Russian.
6. Nesterova IV, Kovaleva SV, Kleshchenko EI, Shinkareva ON, Malinovskaya VV, Vyzhlova EN. Retrospektivnyy analiz klinicheskoy effektivnosti korotkikh kursov interferonov v lechenii ORVI u immunokomprometirovannykh chasto i dlitel'no boleyushchikh detey. Peditriya. ZHurnal imeni G.N. Speranskogo. 2014; 93 (2): 62–7. DOI:10.24110/0031-403X-2014-93-2-62-67. Russian.
7. Shevchenko AV, Golovanova OV, Konenkov VI. Osobennosti polimorfizma promotornykh regionov genov tsitokinov IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 i TNF- α u evropeoidnogo naseleniya Zapadnoy Sibiri. Immunologiya. 2010; (4): 176–81. Russian.
8. Abramov DD, Kofiadi IA, Khaikov MR, Sergeyev IV, Trofimov DYU, Gudima GO, i dr. Osobennosti polimorfizma genov, reguliruyushchikh razlichnyye komponenty immunnogo otveta, v russkoy populyatsii. Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal. 2012; (6): 72–5. Russian.
9. Prokofyev VF, Shevchenko AV, Golovanova OV, Zonova EV, Korolev MA, Leonova YuB. Kompleksnyy analiz polimorfizma v promotornykh uchastkakh genov tsitokinov IL-1B T-31C, IL-6 G-174C, TNFA G-238A, TNFA G-308A, TNFA C-863A, IL-4 C-590T i IL-10 C-592 α v prognoze effekta ot lecheniya revmatoidnogo artrita. Meditsinskaya immunologiya. 2010; (4): 361–74. Russian.
10. Smolnikova MV, Smirnova SV, Tyutina OS. Polimorfizm genov tsitokinov pri atopicheskoy bronkhial'noy astme. Sibirskoye

- meditsinskoye obozreniye. 2013; (2): 63–69. Russian.
11. Kutikhin AG, Brusina EB, Volkov AN, Yuzhalin AE, Zhivotovskiy AS. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1B and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study. *Tumor Biol.* 2014; 35 (5): 4821–30.
 12. Zhu Q, Sun J, Chen Y. Preterm birth and single nucleotide polymorphisms in cytokine genes. *Transl Pediatr.* 2014; 3 (2): 120–134. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.02.
 13. Abramova NA, Savenkova MS. Rol' sotsial'nykh i ekologicheskikh faktorov v formirovaniy gruppy chasto boleyushchikh detey v sotsial'no blagopoluchnykh sem'yakh g. Moskv. Detskiye infektsii. 2013; (4): 52–7. Russian.
 14. Yulish EI, Yaroshenko SyA. Chasto boleyushchiye deti i taktika pediatri. *Zdorov'ye rebenka.* 2013; 49 (6): 70–6. Russian.
 15. Khlynina YuO, Kramar LV. Sovremennyye podkhody k profilaktike i lecheniyu ORZ u chasto boleyushchikh detey. *Lekarstvennyy vestnik.* 2015; 59 (4): 40–5. Russian.
 16. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. An update to HLA nomenclature, 2010. 2010; 45 (5): 846–8.
 17. Available from: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
 18. Levina AS, Babachenko IV, Skripchenko NV, Imyaninov EN. Etiologicheskaya struktura zabolevaniy u chasto boleyushchikh detey v zavisimosti ot vozrasta. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2017; 62 (2): 72–7. Russian.
 19. Esposito S, Bianchini S, Bosis S, Tagliabue C, Coro I, Argentiero A, Principi N. A randomized, placebo-controlled, double-blinded, single-centre, phase IV trial to assess the efficacy and safety of OM-85 in children suffering from recurrent respiratory tract infections. *J Transl Med.* 2019 Aug 23; 17 (1): 284. DOI: 10.1186/s12967-019-2040-y. PMID: 31443716 Free PMC Article.
 20. Simbirtsev AS, Totolyan AA. Tsitokiny v laboratornoy diagnostike. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye.* 2015; (2): 82–98. Russian.
 21. Kazakova AV, Uvarova EV, Limareva LV, Trupakova AA, Mishina AI. Sposob prognozirovaniya bakterial'nogo vul'vovaginita u devochek v zavisimosti ot stadii polovogo razvitiya soglasno shkale Tannera. *Vestnik RGMU.* 2019; (5): 116–22. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.070. Russian.
 22. Khazim K, Azulay EE, Kristal B, Cohen I. Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. *Immunol Rev.* 2018 Jan; 281 (1): 40–56. DOI: 10.1111/imr.12620.
 23. Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>.
 24. Kofiadi IA, Kadochnikova VV, Abramov DD, Goncharova EV, Donnikov AE, Trofimov DYU, i dr. Chastota vstrechayemosti 100 klinicheskikh znachimyykh odnonukleotidnykh polimorfizmov u zdorovykh predstaviteley russkoy populyatsii. *Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy.* 2011; (2): 3–10. Russian.
 25. Terskova NV, Shnayder NA, Vakhrushev SG, Ikonnikova EV, Pilyugina MS. Rol' polimorfizma gena interleykina-1β v razvitii vospaleniya glotochnoy mindaliny. *Ros. otorinolaringologiya.* 2010; (6): 87–93. Russian.
 26. Chen H, Wilkins LM, Aziz N. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet.* 2006; (15): 519–29.
 27. Todorović MM, Zvrko EZ. Immunoregulatory cytokines and chronic tonsillitis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2013; 13 (4): 230–6. PMID: 24289758.
 28. Gromova AYU, Simbirtseva AS. Polimorfizm genov semeystva IL-1 cheloveka. *Tsitokiny i vospaleniye.* 2005; (2): 3–12. Russian.
 29. Tsygan VN, Ivanov AM, Kamilova TA, Protasov OV, Artyushkin SA. Geneticheskiiy polimorfizm tsitokinov. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii.* 2010; 30 (2): 211–9. Russian.

АВТОНОМНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИМИДЖИНГЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

З. М. Осипова^{1,2}, А. С. Щеглов^{1,2} ✉, И. В. Ямпольский^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Биолюминесцентные системы все чаще применяют для разработки высокочувствительных оптических методов имиджинга *in vivo*. Однако при использовании популярных систем необходимо инъекционно вводить дорогие и нестабильные синтетические субстраты (люциферины) перед каждым анализом. Автономные системы бактерий и грибов, которые недавно стали доступны для работы с эукариотическими клетками, по нашему мнению, могут развиваться в полноценный инструмент для создания новых технологий биолюминесцентного имиджинга.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, люциферин, биоимиджинг, биомедицинские исследования, автономная биолюминесценция

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-14-01169).

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в проведении исследования.

Информация о вкладе авторов: З. М. Осипова, А. С. Щеглов — анализ литературы, написание статьи; И. В. Ямпольский — идея публикации, редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Сергеевич Щеглов
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; jukart@mail.ru

Статья получена: 03.12.2019 **Статья принята к печати:** 12.12.2019 **Опубликована онлайн:** 19.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.083

AUTONOMOUS BIOLUMINESCENT SYSTEMS: PROSPECTS FOR USE IN THE IMAGING OF LIVING ORGANISMS

Osipova ZM^{1,2}, Shcheglov AS^{1,2} ✉, Yampolsky IV^{1,2}

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Bioluminescent systems are increasingly being used for the development of highly sensitive optical imaging techniques *in vivo*. However, it is necessary to inject expensive and unstable synthetic substrates (luciferins) before each analysis for most of the systems applied. Autonomous bacterial and fungal bioluminescent systems, that recently have become available for implementation in eukaryotic cells, in our opinion, may be developed into an effective tool in new technologies of bioluminescent imaging.

Keywords: bioluminescence, luciferase, luciferin, bioimaging, biomedical research, autonomous bioluminescence

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Grant №17-14-01169).

Acknowledgements: we thank to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Author contribution: Osipova ZM, Shcheglov AS — literature analysis, article authoring; Yampolsky IV — study planning, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander S. Shcheglov
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997; jukart@mail.ru

Received: 03.12.2019 **Accepted:** 12.12.2019 **Published online:** 19.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.083

Оптический имиджинг *in vivo* все чаще используют в качестве метода визуализации в современных биомедицинских исследованиях [1, 2]. В ходе биоимиджинга происходит неинвазивное изучение животных объектов, в которых свет испускается в результате окисления молекулы люциферина (химическая реакция, катализируемая белком люциферазой), либо в ответ на возбуждение флуоресцентного белка светом из внешнего источника. Наиболее популярными на сегодняшний день оптическими репортерными белками являются флуоресцентные (GFP и подобные ему варианты разных цветов), а также биолюминесцентные из насекомых (FLuc) и морских организмов (RLuc, GLuc). Область применения биолюминесцентного и флуоресцентного имиджинга на их основе в медицине чрезвычайно обширна и включает (но не ограничивается) изучением функций генов, белок-белковых взаимодействий, развития патогенных процессов и онкогенеза, разработкой лекарственных препаратов и т. д. как на уровне отдельных клеток и тканей, так

и у лабораторных животных в режиме реального времени [3].

Среди бесспорных достоинств существующих технологий флуоресцентного имиджинга — огромное разнообразие доступных белков всех спектральных оттенков, а также большой функциональный набор инструментов на их основе (в том числе фотоактивируемые, фотопереклюаемые белки, сенсоры) [4]. Тем не менее при использовании флуоресцентных белков необходимо наличие внешнего излучения, в результате чего чувствительность методов снижается из-за помех автофлуоресценции, фототоксичности и наличия ненулевого фонового сигнала. Получение изображения высокого разрешения *in vivo* обычно сопровождается сложной инвазивной процедурой [5]. Биолюминесцентные системы лишены таких недостатков и поэтому успешно конкурируют с флуоресцентными белками. Для биолюминесцентного имиджинга быстро стал доступен уровень разрешения вплоть до единичной клетки внутри

живого организма. Однако возможная токсичность, низкая стабильность и высокая стоимость синтетических люциферинов (субстратов биолюминесценции), которые необходимо инъекционно вводить в организм перед каждым анализом, усложняют проведение биолюминесцентного имиджинга.

Применение автономных люминесцентных систем, для которых биосинтез люциферина может быть воспроизведен методами генной инженерии в клетках исследуемого организма, может стать полноценной альтернативой существующим технологиям биоимиджинга *in vivo*. К сожалению, среди тысяч ($\sim 10^3$) светящихся видов и около 40 ($\sim 10^2$) различных механизмов свечения на данный момент известны структуры лишь 10 люциферинов (светящихся субстратов) и 7 семейств генов люцифераз ($\sim 10^1$) [6, 7], а полный путь биосинтеза люциферина определен только для бактериальной [3] и, с недавнего времени, для грибной [8] биолюминесцентных систем. Есть сведения о том, что D-люциферин светялка в организме насекомых синтезируется из *p*-бензохинона и L-цистеина [9], однако соответствующие этим процессам белки пока не выделены. Белок LRE, регенерирующий D-люциферин из оксильюциферина [10, 11], не может стать полноценной заменой биосинтезу люминесцентного субстрата из распространенных метаболитов. Таким образом, на данный момент реальными кандидатами для создания новых автономных методов визуализации являются только две люминесцентные системы.

Бактериальная биолюминесценция: от прокариот к эукариотам

Биолюминесцентные бактерии — это самые распространенные светящиеся организмы; встречаются они в море и на суше. Биолюминесценция бактерий хорошо изучена: за их свечение отвечает кассета из пяти генов *luxCDABE*. *LuxAB* кодирует гетеродимерную бактериальную люциферазу, *luxC*, *luxD* и *luxE* — три белка (редуктазу, трансферазу и синтазу), осуществляющие синтез субстрата (додеканала) для реакции биолюминесценции (рис. 1А). Также дополнительно в кассету может быть включен ген *frp*, кодирующий флавинредуктазу, которая отвечает за синтез флавиномононуклеотида FMN_{H₂}, необходимого компонента реакции люминесценции [12]. Таким образом, бактериальная биолюминесцентная система может быть полностью перенесена в новый организм, который будет светиться без добавления люциферина извне. Из недостатков этой системы необходимо отметить зависимость от наличия FMN_{H₂} и жирных альдегидов, невысокую яркость, и, самое главное, синий цвет люминесценции (490 нм), неудобный для имиджинга глубоких тканей *in vivo*.

Гетерологическая экспрессия генов автономной бактериальной люминесцентной системы была быстро и успешно реализована в прокариотических клетках [13], однако принципиальной сложностью для ее переноса в клетки эукариот стали большой размер оперона, его мультигенная организация и токсичность системы для организма-хозяина (вследствие цитотоксичности додеканала). Для решения этой задачи появилась необходимость в проведении масштабной перестройки оперона.

Первым успехом на пути переноса автономной бактериальной люминесценции в эукариоты стало получение трансгенных светящихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Повышение эффективности экспрессии

было достигнуто путем оптимизации кодонов и добавления линкерных участков. Немаловажным стал переход от люциферазы морских бактерий *Vibrio harveyi* к термостабильной люциферазе наземного вида *Photobacterium luminescens*, сохраняющей активность при 37 °C. Тем не менее свечение было неярким и нестабильным. Первые удачные адаптация и оптимизация генов только бактериальной люциферазы *luxAB* для клеток HEK293 были реализованы спустя 2 года [15]. Наконец, в 2010 г. было описано первое применение автономной бактериальной люминесценции в клетках млекопитающих для биоимиджинга *in vivo* с чувствительностью порядка 20 000 клеток [16]. Параллельно были получены первые растения, светящиеся автономно [17].

Несмотря на проделанную работу по дальнейшей оптимизации и сокращению оперона для применения в клетках млекопитающих (например, [18]), существует ограниченное количество примеров применения бактериальной биолюминесценции для биоимиджинга эукариот [19–21] вследствие ее невысокой яркости относительно неавтономных систем, например D-люциферинзависимых. Недавно благодаря дополнительным изменениям в опероне и использованию индивидуальных плазмид для настройки экспрессии генов в оптимальном соотношении удалось разработать новую бактериальную систему «со *Lux*», яркость которой для одноклеточного имиджинга клеток HEK293 сравнима с таковой для люциферазы FLuc [22, 23]. Невысокая концентрация длинноцепочечного альдегида не приводит к неблагоприятным токсическим эффектам. Единственным заметным эффектом стало уменьшение концентрации NADPH в светящихся клетках (вследствие повышенного расхода в ходе реакции биолюминесценции). Также появился первый пример автономного биоимиджинга на основе пары *luxAB* и желтого флуоресцентного белка YFP [24].

Автономная биолюминесценция грибов: альтернатива бактериям

Изучение светящихся грибов имеет многовековую историю, однако впервые структура люциферина грибов 3-гидрокси-гиспидина была установлена в 2015 г. [25], а в 2018 г. была описана люцифераза грибов и полный цикл биосинтеза люциферина из распространенного вторичного метаболита растений — кофейной кислоты и сразу же показан пример применения данной системы для создания автономно светящихся дрожжей [8] (рис. 1Б).

В основе люминесценции грибов лежат гены *hisps*, *h3h*, *luz* (люцифераза) и *cph*. *Hisps*, *h3h* кодируют белки, которые последовательно собирают гиспидин из кофейной кислоты (гиспидинсинтаза) и люциферин (3-гидрокси-гиспидин) соответственно. *Luz* кодирует люциферазу, а *cph* — белок, перерабатывающий продукт окисления люциферина (оксильюциферин) обратно в кофейную кислоту. Недавно было показано, что экспрессии лишь трех генов *hisps*, *h3h* и *luz* в растениях *Nicotiana tabacum* достаточно для создания ярких автономно светящихся растений [26, 27]. В отличие от бактериальной люминесцентной системы, здесь не требуется серьезной оптимизации кодонного состава генов для получения трансгенных растений, поскольку генетический материал изначально берется из эукариот и новый биосинтетический цикл хорошо встраивается в метаболизм организма-хозяина.

Однако первый пример получения автономно светящихся клеток млекопитающих HEK293T на

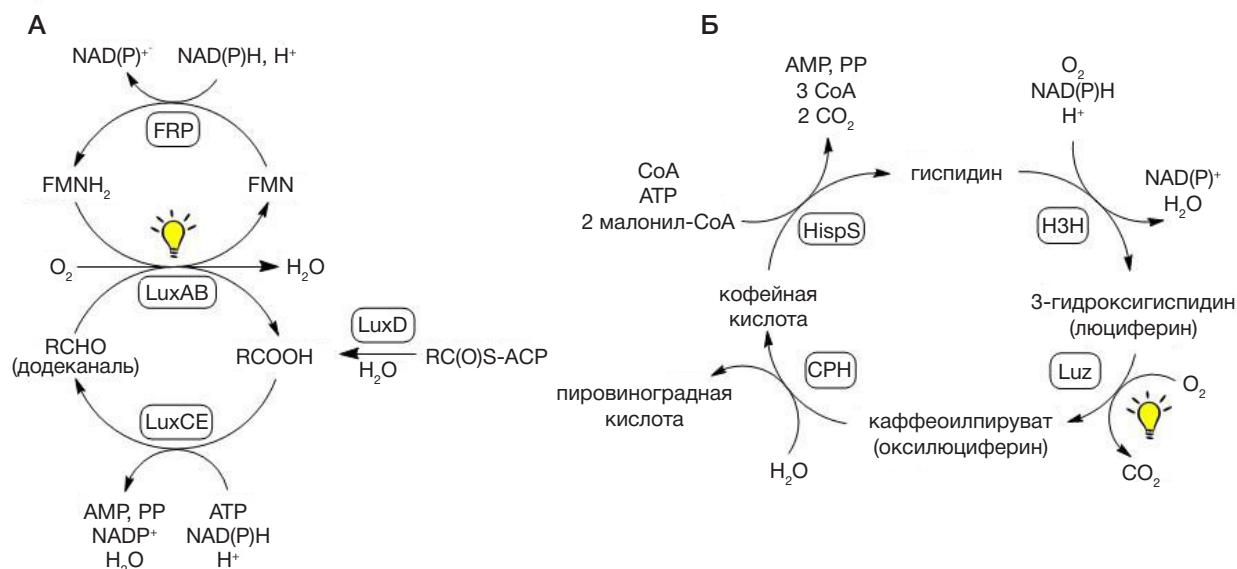


Рис. 1. Биохимические циклы автономной биолюминесценции бактерий (А) и грибов (Б)

основе генов биолюминесценции грибов потребовал использования смеси уже восьми плазмид [26]. Полученные клетки светились нестабильно и не очень ярко, что указывает на очевидную необходимость оптимизации применяемых генетических конструкций для получения более ярких вариантов. Суммарная длина используемых на данный момент кодирующих последовательностей бактериальной системы биолюминесценции составляет 6,2 тыс. пар оснований (т.п.о.), тогда как для последовательностей грибной системы это значение составляет около 12,8 т.п.о., но оно может быть сокращено до 9,6 т.п.о. в случае использования альтернативных ферментов. В то же время существенным отличием автономной

биолюминесценции грибов является максимум свечения в области 540 нм (желтый), что делает эту систему более перспективной для применения в биоимиджинге *in vivo*.

ВЫВОДЫ

Количество инструментов для оптического имиджинга в медицинских исследованиях постоянно увеличивается. По нашему мнению, более чувствительный *in vivo* биолюминесцентный имиджинг в будущем может составить конкуренцию устоявшимся флуоресцентным технологиям. Активно изучаемые в данный момент системы автономной биолюминесценции на основе кассет генов бактерий или грибов способны встать в один ряд с существующими.

Литература

- Kiessling F, Pichler BJ, Hauff P, editors. Small animal imaging: Basics and practical guide. 2nd ed. Cham: Springer International Publishing AG, 2017.
- Kubala E, Menzel MI, Feuerecker B, Glaser SJ, Schwaiger M. Molecular Imaging. In: Canales A, editor. Biophysical techniques in drug discovery. London: Royal Society of Chemistry, 2017; p. 277–306.
- Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. Chem Soc Rev. 2016; 45 (21): 6048–77.
- Specht EA, Braselmann E, Palmer AE. A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cell imaging. Annu Rev Physiol. 2017; (79): 93–117.
- Yeh HW, Ai HW. Development and applications of bioluminescent and chemiluminescent reporters and biosensors. Annu Rev Anal Chem. 2019; (12): 129–50.
- Shimomura O, Yampolsky I. Back matter. In: Shimomura O, Yampolsky I, editors. Bioluminescence: Chemical principles and methods. 3rd ed. Singapore: World Scientific Co. Pte. Ltd., 2019; p. 381–522.
- Kotlobay AA, Dubinnyi MA, Purtov KV, Guglya EB, Rodionova NS, et al. Bioluminescence chemistry of fireworm *Odontosyllis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2019; 116 (38): 18911–6.
- Kotlobay AA, Sarkisyan KS, Mokrushina YA, Marcet-Houben M, Serebrovskaya EO, et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. Proc Natl Acad Sci USA. 2018; 115 (50): 12728–32.
- Kanie S, Nakai R, Ojika M, Oba Y. 2-S-cysteinylhydroquinone is an intermediate for the firefly luciferin biosynthesis that occurs in the pupal stage of the japanese firefly, *Luciola lateralis*. Bioorg Chem. 2018; (80): 223–9.
- Gomi K, Kajiyama N. Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. J Biol Chem. 2001; 276 (39): 36508–13.
- Cheng YY, Liu YJ. Luciferin regeneration in firefly bioluminescence via proton transfer facilitated hydrolysis, condensation and chiral inversion. Chem Phys Chem. 2019; (20): 1719–27.
- Tu SC. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. Photochem Photobiol Sci. 2008; 7 (2): 183–8.
- Close DM, Xu T, Sayler GS, Ripp S. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. Sensors. 2011; 11 (1): 180–206.
- Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Sayler GS. Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 2003; 4 (3): 305–13.
- Patterson SS, Dionisi HM, Gupta RK, Sayler GS. Codon optimization of bacterial luciferase (lux) for expression in mammalian cells. J Ind Microbiol Biotechnol. 2005; 32 (3): 115–23.
- Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, et al. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (lux) in a mammalian cell line. PloS one. 2010; 5 (8): e12441.

17. Krichevsky A, Meyers B, Vainstein A, Maliga P, Citovsky V. Autoluminescent plants. *PloS one*. 2010; 5 (11): e15461.
18. Xu T, Ripp S, Sayler GS, Close DM. Expression of a humanized viral 2A-mediated lux operon efficiently generates autonomous bioluminescence in human cells. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e96347.
19. Class B, Thorne N, Aguisanda F, Southall N, McKew JC, et al. High-throughput viability assay using an autonomously bioluminescent cell line with a bacterial lux reporter. *J Lab Autom*. 2015; 20 (2): 164–74.
20. Xu T, Young A, Marr E, Sayler G, Ripp S, et al. A rapid and reagent-free bioassay for the detection of dioxin-like compounds and other aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists using autobioluminescent yeast. *Anal Bioanal Chem*. 2018; 410 (4): 1247–56.
21. Xu T, Kirkpatrick A, Toperzer J, Ripp S, Close D. Improving estrogenic compound screening efficiency by using self-modulating, continuously bioluminescent human cell bioreporters expressing a synthetic luciferase. *Toxicol Sci*. 2019; 168 (2): 551–60.
22. Gregor C, Gwosch KC, Sahl SJ, Hell SW. Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the lux operon for single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115 (5): 962–7.
23. Gregor C, Pape JK, Gwosch KC, Gilat T, Sahl SJ, et al. Autonomous bioluminescence imaging of single mammalian cells with the bacterial bioluminescence system. *bioRxiv*. 2019: 798108.
24. Srinivasan P, Griffin NM, Joshi P, Thakur DP, Nguyen-Le A, et al. An Autonomous Molecular Bioluminescent Reporter (AMBER) for voltage imaging in freely moving animals. *bioRxiv*. 2019: 845198.
25. Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew Chem Int Ed*. 2015; 54 (28): 8124–8.
26. Mitiouchkina T, Mishin AS, Somermeyer LG, Markina NM, Chepurmyh TV, et al. Plants with self-sustained luminescence. *bioRxiv*. 2019: 809376.
27. Khakhar A, Starker C, Chamness J, Lee N, Stokke S. Building customizable auto-luminescent luciferase-based reporters in plants. *bioRxiv*. 2019: 809533.

References

1. Kiessling F, Pichler BJ, Hauff P, editors. *Small animal imaging: Basics and practical guide*. 2nd ed. Cham: Springer International Publishing AG, 2017.
2. Kubala E, Menzel MI, Feurecker B, Glaser SJ, Schwaiger M. Molecular Imaging. In: Canales A, editor. *Biophysical techniques in drug discovery*. London: Royal Society of Chemistry, 2017; p. 277–306.
3. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev*. 2016; 45 (21): 6048–77.
4. Specht EA, Braselmann E, Palmer AE. A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cell imaging. *Annu Rev Physiol*. 2017; (79): 93–117.
5. Yeh HW, Ai HW. Development and applications of bioluminescent and chemiluminescent reporters and biosensors. *Annu Rev Anal Chem*. 2019; (12): 129–50.
6. Shimomura O, Yampolsky I. Back matter. In: Shimomura O, Yampolsky I, editors. *Bioluminescence: Chemical principles and methods*. 3rd ed. Singapore: World Scientific Co. Pte. Ltd., 2019; p. 381–522.
7. Kotlobay AA, Dubinnyi MA, Purtov KV, Guglya EB, Rodionova NS, et al. Bioluminescence chemistry of fireworm *Odontosyllis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (38): 18911–6.
8. Kotlobay AA, Sarkisyan KS, Mokrushina YA, Marcet-Houben M, Serebrovskaya EO, et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115 (50): 12728–32.
9. Kanie S, Nakai R, Ojika M, Oba Y. 2-S-cysteinyhydroquinone is an intermediate for the firefly luciferin biosynthesis that occurs in the pupal stage of the japanese firefly, *Luciola lateralis*. *Bioorg Chem*. 2018; (80): 223–9.
10. Gomi K, Kajiyama N. Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J Biol Chem*. 2001; 276 (39): 36508–13.
11. Cheng YY, Liu YJ. Luciferin regeneration in firefly bioluminescence via proton transfer facilitated hydrolysis, condensation and chiral inversion. *Chem Phys Chem*. 2019; (20): 1719–27.
12. Tu SC. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 7 (2): 183–8.
13. Close DM, Xu T, Sayler GS, Ripp S. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors*. 2011; 11 (1): 180–206.
14. Gupta RK, Patterson SS, Ripp S, Simpson ML, Sayler GS. Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2003; 4 (3): 305–13.
15. Patterson SS, Dionisi HM, Gupta RK, Sayler GS. Codon optimization of bacterial luciferase (lux) for expression in mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005; 32 (3): 115–23.
16. Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, et al. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (lux) in a mammalian cell line. *PloS one*. 2010; 5 (8): e12441.
17. Krichevsky A, Meyers B, Vainstein A, Maliga P, Citovsky V. Autoluminescent plants. *PloS one*. 2010; 5 (11): e15461.
18. Xu T, Ripp S, Sayler GS, Close DM. Expression of a humanized viral 2A-mediated lux operon efficiently generates autonomous bioluminescence in human cells. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e96347.
19. Class B, Thorne N, Aguisanda F, Southall N, McKew JC, et al. High-throughput viability assay using an autonomously bioluminescent cell line with a bacterial lux reporter. *J Lab Autom*. 2015; 20 (2): 164–74.
20. Xu T, Young A, Marr E, Sayler G, Ripp S, et al. A rapid and reagent-free bioassay for the detection of dioxin-like compounds and other aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists using autobioluminescent yeast. *Anal Bioanal Chem*. 2018; 410 (4): 1247–56.
21. Xu T, Kirkpatrick A, Toperzer J, Ripp S, Close D. Improving estrogenic compound screening efficiency by using self-modulating, continuously bioluminescent human cell bioreporters expressing a synthetic luciferase. *Toxicol Sci*. 2019; 168 (2): 551–60.
22. Gregor C, Gwosch KC, Sahl SJ, Hell SW. Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the lux operon for single-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115 (5): 962–7.
23. Gregor C, Pape JK, Gwosch KC, Gilat T, Sahl SJ, et al. Autonomous bioluminescence imaging of single mammalian cells with the bacterial bioluminescence system. *bioRxiv*. 2019: 798108.
24. Srinivasan P, Griffin NM, Joshi P, Thakur DP, Nguyen-Le A, et al. An Autonomous Molecular Bioluminescent Reporter (AMBER) for voltage imaging in freely moving animals. *bioRxiv*. 2019: 845198.
25. Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, et al. The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew Chem Int Ed*. 2015; 54 (28): 8124–8.
26. Mitiouchkina T, Mishin AS, Somermeyer LG, Markina NM, Chepurmyh TV, et al. Plants with self-sustained luminescence. *bioRxiv*. 2019: 809376.
27. Khakhar A, Starker C, Chamness J, Lee N, Stokke S. Building customizable auto-luminescent luciferase-based reporters in plants. *bioRxiv*. 2019: 809533.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ CD4⁺-РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В ТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. В. Чуров¹✉, А. И. Сюткина², К. Ы. Мамашов³, Е. К. Олейник¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

² Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия

³ Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

На сегодняшний день достигнуты значительные успехи в терапии аутоиммунных патологий, однако существующие методы сопряжены с риском возникновения тяжелых побочных эффектов. Применение Трег-клеток, на наш взгляд, представляет значительную перспективу в терапии состояний, связанных с нарушением аутоотолерантности. В работе дана оценка возможных трудностей использования клинического подхода на основе Трег-клеток и предложены пути решения научно-технических задач, возникающих при применении Трег в терапии аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, FOXP3, аутоиммунное заболевание, иммунотерапия, клеточная терапия, CAR-Tрег-терапия, CRISPR/Cas9

Финансирование: финансовое обеспечение исследований было осуществлено из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН, № 0218-2019-0083 (по теме «Изменение транскрипционных программ дифференцировки регуляторных Т-клеток при иммуновоспалительных и онкологических патологиях»). Спонсор публикации ООО «ПРАЙМ ПЕЙПЕРС».

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за консультации в рамках подготовки статьи.

Информация о вкладе авторов: А. В. Чуров — дизайн статьи, анализ литературы, подготовка рукописи и финального варианта статьи; А. И. Сюткина — дизайн статьи, основной вклад в анализ литературы, подготовку рукописи и финального варианта статьи; К. Ы. Мамашов — дизайн статьи, анализ литературы, участие в подготовке рукописи и финального варианта статьи; Е. К. Олейник — анализ литературы, участие в подготовке рукописи и финального варианта статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Викторович Чуров
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, 186910; achou@yandex.ru

Статья получена: 25.11.2019 **Статья принята к печати:** 09.12.2019 **Опубликована онлайн:** 18.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.082

THE POTENTIAL OF CD4⁺ REGULATORY T CELLS FOR THE THERAPY OF AUTOIMMUNE DISEASES

Churov AV¹✉, Siutkina AI², Mamashov KY³, Oleinik EK¹

¹ Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

³ Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Despite the considerable progress in the therapy of autoimmune pathologies, the existing methods are associated with the risk of serious adverse events. We think that regulatory T cells hold great promise for the therapy of disorders caused by a breakdown in immunological self-tolerance. This article aims at estimating the possible challenges facing Treg-based clinical approaches and offers solutions to the technical issues associated with the use of these cells in the therapy of autoimmune diseases.

Keywords: regulatory T cells, FOXP3, autoimmune disease, immunotherapy, cell therapy, CAR-Treg therapy, CRISPR/Cas9

Funding: the study was carried out under state order for Karelian Research Centre (ID 0218-2019-0083; *Modification of transcription programs of regulatory T cell differentiation in immunoinflammatory diseases and cancer*). Its publication was sponsored by Prime Papers LLC.

Acknowledgements: the authors thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for consultations.

Author contribution: Churov AV — article design, literature analysis, preparation of the manuscript draft and its final version; Siutkina AI — article design, the major contribution to literature analysis, preparation of the manuscript draft and its final version; Mamashov KY — article design, literature analysis, preparation of the manuscript draft and its final version; Oleinik EK — literature analysis, preparation of the manuscript draft and its final version.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey V. Churov
Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 186910; achou@yandex.ru

Received: 25.11.2019 **Accepted:** 09.12.2019 **Published online:** 18.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.082

Понятие аутоиммунная патология подразумевает под собой группу заболеваний. В их основе лежит дисбаланс в работе иммунной системы и механизмах поддержания аутоотолерантности, приводящий к развитию комплекса иммунных реакций против собственных тканей организма.

В настоящее время терапией выбора при аутоиммунных заболеваниях является главным образом использование иммунодепрессантов, синтетических базисных противовоспалительных препаратов (DMARD), а также генно-инженерных препаратов. Однако применение таких средств сопряжено с риском серьезных побочных эффектов. Регуляторные Т-клетки (Трег) препятствуют развитию иммунных реакций к аутоантигенам, контролируют

развитие патологического воспаления и, как следствие, аутоиммунных заболеваний, непосредственно участвуя в индукции и поддержании периферической толерантности. Трег-клетки составляют 3–5% от общего числа CD4⁺-Т-лимфоцитов в периферическом русле и могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-клеток, антигенпрезентирующих клеток (АПК) [1]. У пациентов с аутоиммунными патологиями можно наблюдать изменение количества Трег-клеток, при этом нередко их функция ослаблена или нарушена [2, 3]. Экспериментальные исследования, проведенные на мышиных моделях аутоиммунных заболеваний, показали, что адоптивная

терапия Treg-клетками, полученными от здоровых особей, обладает хорошим терапевтическим эффектом [4]. Благодаря позитивным результатам доклинических исследований, Treg-лимфоциты стали рассматривать в качестве перспективного подхода к лечению аутоиммунных заболеваний.

С учетом текущего состояния исследований и ограничения современных методов лечения необходима разработка новых высокоспецифичных подходов для эффективной и безопасной терапии аутоиммунных патологий. Мы предполагаем, что клинические решения на основе Treg-клеток могут занять центральное место в комплексной терапии аутоиммунных заболеваний при условии решения ряда технических задач.

В работе отражено мнение о перспективах применения Treg-клеток в качестве инструмента для терапии аутоиммунных заболеваний на основании имеющихся результатов научных и клинических исследований, дана оценка возможных трудностей, возникающих при использовании данного подхода, и предложены потенциальные пути решения научно-технических проблем в данной области.

Регуляторные Т-клетки и механизмы супрессорного действия

Ключевыми маркерами Treg-клеток служат мембранный антиген CD25 и внутриклеточный транскрипционный фактор FOXP3. Экспрессия гена *FOXP3* необходима для реализации супрессорной функции Treg-лимфоцитов [5]. Маркер CD25 представляет собой α -цепь IL2, его экспрессия коррелирует с пролиферацией и дифференцировкой Treg [6].

Дифференцировка Treg-клеток происходит в тимусе и на периферии. Из тимуса Treg расселяются в кровь и периферические органы лимфоидной системы в течение первых 2–3 дней жизни [7]. На периферии Т-клетки с фенотипом CD4⁺FOXP3⁺ также могут подвергаться дифференцировке с образованием индуцированных Treg-клеток, отличающихся высокой экспрессией FOXP3 (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺).

Супрессорное действие Treg на иммунocyты может быть реализовано напрямую при межклеточном контакте или опосредованно, в результате секреции биологически активных молекул. Можно выделить четыре основных механизма: прямой цитотоксический эффект (при участии PD-1/PD-L1, OX40/OX40L и гранзимов В), изменение метаболизма клеток-мишеней (CD25, CD39, триптофан), секреция ингибирующих цитокинов (IL10, TGF β и IL35), а также супрессия АПК (CD80 и CD86/CTLA-4) [8].

Клинические испытания иммунотерапии на основе Treg-клеток

Клинические испытания иммунотерапии на основе Treg-клеток при аутоиммунных заболеваниях начались менее 10 лет назад. Целью испытаний стала проверка технических аспектов при инфузии Treg, а также оценка безопасности и эффективности метода. В клинических испытаниях применяют общий подход: сортировка Treg-клеток, поликлональная экспансия Treg, подбор дозы и проведение инъекций Treg-лимфоцитов пациентам. Однако данный подход не учитывает функциональный статус клеток. Общей проблемой при использовании Treg остается отсутствие стабильной экспрессии FOXP3 и

стойкой супрессорной активности, что во многих случаях обуславливает невысокую эффективность применения данной технологии для клеточной терапии.

Согласно открытому многоцентровому исследованию CATS1, опубликованному в 2012 г. [9], на этапе I/IIa, включающем 20 пациентов из четырех групп с активной и симптоматической рефрактерной болезнью Крона, была показана безопасность инфузии клеток. В феврале 2018 г. было начато двойное слепое плацебо-контролируемое исследование NCT03185000 (TRIBUTE), оценивающее инфузию Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD45RA⁺ у пациентов с болезнью Крона, резистентных минимум к двум стандартным схемам терапии.

В целом хорошие результаты получены в ходе применения Treg для иммунотерапии при сахарном диабете 1-го типа (СД1). Клинические испытания стартовали в 2014 г. с рандомизированного исследования фазы I с целью оценки безопасности и целесообразности инфузии аутологичных Treg, полученных *ex vivo* у пациентов в возрасте 7–18 лет с недавно диагностированным СД1 [10]. По результатам годового исследования не было выявлено сильных побочных эффектов и тем самым подтверждена безопасность лечения. Кроме того, у 8 из 12 пациентов были выявлены признаки клинической ремиссии.

С той же целью в другом исследовании на базе Калифорнийского и Йельского университетов было проведено изучение эффективности и безопасности иммунотерапии у взрослых пациентов с СД1, результаты были опубликованы в 2015 г. [11]. В исследовании приняли участие 14 человек (6 женщин и 8 мужчин в возрасте 18–43 лет), разделенных на четыре группы в зависимости от дозы Treg при инфузии. Для инфузии применяли поликлональные Treg-клетки с фенотипом CD4⁺CD127^{low}-CD25⁺ в количестве от $0,05 \times 10^8$ до 26×10^8 клеток. По результатам исследования, до 25% клеток от их пикового уровня сохранялось в периферическом русле реципиентов еще в течение года после адоптивного переноса. При этом не было выявлено никаких инфузионных реакций или побочных эффектов, связанных с клеточной терапией [11]. Однако данная работа не позволила определить оптимальное количество клеток для инфузии, а также установить, как влияет иммунотерапия на основе Treg на функцию β -клеток поджелудочной железы. Многоцентровое рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование II фазы (NCT02691247) ставит своей целью решить эти вопросы. В настоящее время идут рандомизированные открытые исследования фазы I/II NCT03011021 и NCT02932826 (Центральный Южный университет Чанша), оценивающие инфузию Treg пуповинной крови наряду с терапией лираглутидом и инсулином у взрослых и пожилых пациентов с аутоиммунным диабетом.

Кроме того, начаты открытые исследования по инфузии аутологичных поликлональных Treg у пациентов с временной активной кожной пузырчаткой (NCT03239470) и аутоиммунным гепатитом (NCT02704338).

Перспективы и трудности, связанные с применением Treg-клеток в иммунотерапии

Принципиальная возможность осуществления инфузии Treg-клеток пациентам с различными аутоиммунными патологиями и относительная безопасность данного подхода были продемонстрированы в ходе пилотных

клинических исследований. На дальнейших этапах представляет интерес адаптировать применяемую у пациента в текущий момент иммуносупрессивную терапию к инфузиям Treg, так как показано, что некоторые иммунодепрессанты дозозависимо влияют на свойства Treg-клеток и могут снижать эффективность клеточной терапии [12]. Наиболее перспективным подходом представляется применение Treg в комбинации с другими методами лечения, необходимыми в каждом конкретном случае.

Одно из основных препятствий для успешного применения Treg в иммунотерапии — получение стабильной фракции Treg-клеток, проявляющих стойкую иммуносупрессорную активность. Существующие методы получения Treg основаны на экспансии лимфоцитов *ex vivo*. При этом источником Treg служат клетки периферической крови, которые неоднородны и в значительной степени представлены клетками с индуцированной экспрессией FOXP3.

Другой не менее важной проблемой является повышение специфичности терапии. Функциональная активность Treg по своей природе антигенспецифична. В присутствии антигена происходят активация Treg и значительное увеличение экспрессии мембранных ингибирующих молекул, которые обуславливают супрессорное действие на клетки-мишени.

Эта зависимость была продемонстрирована *in vivo* на примере CTLA-4 — ключевой ингибирующей молекулы Treg-клеток. CTLA-4 конститутивно экспрессируется как Treg, так и Т-эффекторами [13]. Treg контролируют активацию Т-эффекторов, ограничивая их доступ к костимулирующим молекулам CD80/86 на мембране АПК. CTLA-4 конкурентно блокирует CD80/86 на АПК, а также может связывать и перемещать CD80/86 внутрь клетки в результате транс-эндоцитоза. Таким образом, Treg-клетки регулируют фенотип АПК и эффективно ограничивают CD28-зависимую активацию Т-эффекторов. Конкурентный эффект достигается за счет того, что экспрессия CTLA-4 на антигенспецифичных Treg-клетках значительно выше, чем на Т-клетках. Триггером к захвату CD80/86 Treg-клетками является презентация аутоантигена [13].

Клинические испытания, о которых говорилось выше, как правило, включают применение инфузии поликлональных Treg-клеток с неизвестной антигенной специфичностью. Большая часть клонов в составе фьюзов будет неэффективна в отношении супрессии клеток-эффекторов и в подавлении аутоиммунных реакций. Кроме того, при использовании поликлональных лимфоцитов сохраняется высокий риск возникновения побочных эффектов, таких как системная иммуносупрессия и реактивация инфекций. Таким образом, клинические подходы на основе поликлональных Treg заведомо слабы.

В последнее десятилетие были разработаны новые высокоэффективные подходы лечения некоторых патологий на основе адоптивной клеточной иммунотерапии, которые могут позволить преодолеть вышеуказанные трудности в применении Treg для лечения аутоиммунных заболеваний. К таким подходам относят конструкции на основе эффекторных Т-клеток для экспрессии высокоспецифичных химерных антигенных рецепторов (CARs), а также методы редактирования генома, в частности CRISPR/Cas9.

CAR-модифицированные Т-клетки (CAR-T) применяют в иммунотерапии некоторых форм рака. Однако метод достаточно эффективен и в случае с Treg-клетками (CAR-Treg). CAR-Treg-технология имеет огромный потенциал:

благодаря антигенспецифичности CAR-Treg позволяют повысить эффективность лечения при минимальных побочных эффектах [14]. В сравнении с использованием в терапии поликлональных Treg, CAR-Treg способны специфично связываться с определенным белком на мембране клеток-мишеней. Среди недостатков технологии можно отметить высокую сложность получения CAR-Treg со стабильной супрессорной активностью. Кроме того, существует опасность возникновения так называемого цитокинового шторма и нейротоксичности, как и в случае с противоопухолевыми CAR-T-клетками, что оказывается серьезным препятствием для использования CAR-Treg в клинике. Более того, препятствием для применения CAR-Treg являются идентификация и выбор мишеней для таргетной терапии, что особенно важно в случае с аутоиммунными заболеваниями в связи с особенностями их патогенеза и недостатком знаний об их этиологии.

Один из вышеуказанных недостатков, а именно получение стабильной фракции клеток, могут помочь устранить технологии на основе CRISPR/Cas9 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats / CRISPR-associated protein) или их более продвинутых аналогов. Первые доклинические исследования уже показали многообещающие результаты применения CRISPR/Cas9 в иммунотерапии. Предпринимаются попытки модификации функциональной активности Treg, в плане как стабилизации их активности, так и повышения уровня активности Treg. Известно, что одной из основных проблем применения Treg остается поддержание жизнеспособности клеток *ex vivo*, которая напрямую зависит от стабильности экспрессии гена FOXP3. В этой связи предлагают использовать технологию CRISPR/Cas9 для редактирования генов, участвующих в регуляции транскрипционных программ, контролирующих дифференцировку Treg-клеток и уровень экспрессии FOXP3. CRISPR/Cas9 обладает высокой специфичностью благодаря малым РНК: они способны направлять нуклеазу Cas9 точно в целевой фрагмент генома [15]. В случае с Treg-клетками и FOXP3 технология представляет интерес возможностью редактировать эпигеном. В первичных Т-клетках у мышей было показано, что используя модификацию базовой технологии, включающую мутантный Cas9 без эндонуклеазной активности (dead Cas9; CRISPR/dCas9), можно индуцировать заданные эпигенетические изменения, способствующие стабилизации экспрессии гена *Foxp3* [16].

ВЫВОДЫ

Первые результаты клинических исследований продемонстрировали относительную безопасность применения Treg-клеток для лечения аутоиммунных патологий. Многообещающим стало исследование эффективности подхода, основанного на применении поликлональных Treg-лимфоцитов у пациентов с болезнью Крона и диабетом 1-го типа, а также для некоторых других аутоиммунных заболеваний. Однако большинство клинических исследований безопасности применения Treg были проведены на малых выборках, а сам подход имеет ряд серьезных недостатков, прежде всего низкую антигенную специфичность. Дальнейшие усилия должны быть направлены на нерешенные вопросы в отношении технологии адоптивной терапии Treg-клеток: поиск эффективной дозы Treg для инфузии; повышение специфичности метода за счет идентификации мишеней

для таргетной клеточной иммунотерапии и использования фьюзов антигенспецифичных Treg; достижение стабильной

супрессорной активности Treg и стойкого эффекта от клеточной терапии у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Литература

1. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10 (7): 490–500. DOI:10.1038/nri2785.
2. Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 2010; 16 (2): 58–68. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.12.003.
3. Кравченко П. Н., Жулай Г. Ф., Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М., Барышева О. Ю. и др. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. *Вестник РАМН*. 2016; 71 (2): 148–53. DOI: 10.15690/vramn656.
4. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2011; 10 (12): 744–55. DOI:10.1016/j.autrev.2011.05.004.
5. Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*. 2003; 4 (4): 330–36. DOI: 10.1038/ni904.
6. Nazzari, Gradolatto, Truffault, Bismuth, Berrih-Aknin. Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death Dis*. 2014; (5): e1420. DOI:10.1038/cddis.2014.37.
7. Famili F, Wiekmeijer A-S, Staal F. The development 719 of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Science OA*. 2017; (3): FSO186. DOI:10.4155/foa-2016-0095.
8. Christoffersson G, von Herrath M. Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells. *Trends in Immunology*. 2019; 40 (6): 482–91. DOI:10.1016/j.it.2019.04.005.
9. Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugier L, Hébuterne X, Bouhnik Y, et al. Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2012; (143): 1207–17. DOI:10.1053/j.gastro.2012.07.116.
10. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+) CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — results of one year follow-up. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2014; (153): 23–30. DOI:10.1016/j.clim.2014.03.016.
11. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2016; (7): 315ra189. DOI:10.1126/scitranslmed.aad4134.
12. Scottà C, Fanelli G, Hoong SJ, Romano M, Lamperti EN, Sukthankar M, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*. 2016; (101): 91–100. DOI:10.3324/haematol.2015.128934.
13. Ovcinnikovs V, Ross EM, Petersone L, Edner NM, Heuts F, Ntavli E. CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Science Immunology*. 2019; 4 (35): eaaw0902. DOI:10.1126/sciimmunol.aaw0902.
14. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikij S, Veeken J van der, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013; (504): 451–5. DOI:10.1038/nature12726.
15. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21. DOI:10.1126/science.1225829.
16. Okada M, Kanamori M, Someya K, Nakatsukasa H, Yoshimura A. Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells. *Epigenetics Chromatin*. 2017; (10): 24. DOI: 10.1186/s13072-017-0129-1.

References

1. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10 (7): 490–500. DOI:10.1038/nri2785.
2. Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 2010; 16 (2): 58–68. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.12.003.
3. Kravchenko PN, Zhulay GA, Churov AV, Oleinik EK, Oleinik VM, Barysheva OY, et al. Subpopulations of regulatory T-lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2016; 71 (2): 148–153. DOI: 10.15690/vramn656.
4. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2011; 10 (12): 744–55. DOI:10.1016/j.autrev.2011.05.004.
5. Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*. 2003; 4 (4): 330–36. DOI: 10.1038/ni904.
6. Nazzari, Gradolatto, Truffault, Bismuth, Berrih-Aknin. Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death Dis*. 2014; (5): e1420. DOI:10.1038/cddis.2014.37.
7. Famili F, Wiekmeijer A-S, Staal F. The development 719 of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Science OA*. 2017; (3): FSO186. DOI:10.4155/foa-2016-0095.
8. Christoffersson G, von Herrath M. Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells. *Trends in Immunology*. 2019; 40 (6): 482–91. DOI:10.1016/j.it.2019.04.005.
9. Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugier L, Hébuterne X, Bouhnik Y, et al. Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2012; (143): 1207–17. DOI:10.1053/j.gastro.2012.07.116.
10. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+) CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — results of one year follow-up. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2014; (153): 23–30. DOI:10.1016/j.clim.2014.03.016.
11. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. 2016; (7): 315ra189. DOI:10.1126/scitranslmed.aad4134.
12. Scottà C, Fanelli G, Hoong SJ, Romano M, Lamperti EN, Sukthankar M, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*. 2016; (101): 91–100. DOI:10.3324/haematol.2015.128934.
13. Ovcinnikovs V, Ross EM, Petersone L, Edner NM, Heuts F, Ntavli E. CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Science Immunology*. 2019; 4 (35): eaaw0902. DOI:10.1126/sciimmunol.aaw0902.
14. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikij S, Veeken J van der, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013; (504): 451–5. DOI:10.1038/nature12726.

15. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21. DOI:10.1126/science.1225829.
16. Okada M, Kanamori M, Someya K, Nakatsukasa H, Yoshimura A. Stabilization of Foxp3 expression by CRISPR-dCas9-based epigenome editing in mouse primary T cells. *Epigenetics Chromatin*. 2017; (10): 24. DOI: 10.1186/s13072-017-0129-1.

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ, ВЫЗВАННОЙ ТИОАЦЕТАМИДОМ

Д. И. Дергачева¹, О. И. Кляйн¹, А. А. Мариничев^{1,2}, Н. Н. Гесслер¹, Е. С. Богданова³, М. С. Смирнова³✉, Е. П. Исакова¹, Ю. И. Дерябина¹

¹ Институт биохимии имени А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия

³ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

Неалкогольная жировая дисфункция печени сопровождается целым рядом заболеваний (диабет, ожирение, сердечно-сосудистые болезни), а также может развиваться под действием лекарственных препаратов или токсических соединений. Актуальным направлением современной медицины является поиск эффективных средств профилактики и лечения жирового гепатоза. Целью работы было исследовать действие некоторых биологически активных природных полифенолов — стильбенов ресвератрола и пиносильвина, а также дигидрофлавонола дигидромирицетина — на функциональное состояние и гистологическую картину печени. В модели токсического гепатита, вызываемого введением гепатотоксиканта тиацетамида, самцам крыс линии *Wistar* внутрижелудочно ежедневно вводили зондом эффективные дозы полифенолов на фоне добавления тиацетамида к питьевой воде в концентрации 0,05%. Все исследованные полифенолы способствовали стабилизации веса крыс и двукратному достоверному ($p < 0,05$) снижению уровня прямого билирубина в сыворотке крови животных, получавших тиацетамид. Гистологическое исследование печени подтвердило замедление воспалительных процессов и уменьшение кровоизлияний у животных, получавших полифенолы на фоне продолжающегося введения тиацетамида в течение 30 дней. На основании полученных данных можно сделать выводы, что природные полифенолы класса дигидрофлавонолов (дигидромирицетин) и стильбенов (ресвератрол и пиносильвин) оказывают положительное воздействие на функции печени в модели экспериментального токсического гепатоза; исследованные полифенолы можно рассматривать в качестве потенциальных гепатопротекторов в составе комплексной терапии при заболеваниях печени.

Ключевые слова: полифенол, ресвератрол, дигидромирицетин, пиносильвин, тиацетамид, стеатоз, гепатит, крыса

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.616.21.0083, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61617X0083).

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в методах исследования.

Информация о вкладе авторов: Д. И. Дергачева — проведение экспериментов по индукции токсического гепатита, проведение и анализ гистологических исследований, подготовка черновика рукописи; О. И. Кляйн — подготовка и проведение гистологических исследований, сбор, анализ и интерпретация данных; А. А. Мариничев — проведение экспериментов по индукции токсического гепатита, отбор проб крови экспериментальных животных, приготовление гистологических препаратов; Н. Н. Гесслер — проведение экспериментов по индукции токсического гепатита, отбор проб крови экспериментальных животных, сбор, анализ и интерпретация данных; Е. С. Богданова и М. С. Смирнова — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных; Е. П. Исакова — проведение экспериментов по индукции токсического гепатита, анализ литературы; Ю. И. Дерябина — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института биохимии имени А. Н. Баха (протокол № 17 от 5 сентября 2019 г.). Содержание животных, все проведенные процедуры и экспериментальные протоколы соответствовали требованиям Минздрава России, а также директиве Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 года (86/609/EEC).

✉ **Для корреспонденции:** Мария Сергеевна Смирнова
ул. Москвина, 10–226, г. Химки, Московская обл., 141401; mbarbotko@ya.ru

Статья получена: 26.10.2019 **Статья принята к печати:** 17.11.2019 **Опубликована онлайн:** 27.11.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.075

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF POLYPHENOLS IN RATS WITH EXPERIMENTAL THIOACETAMIDE-INDUCED TOXIC LIVER PATHOLOGY

Dergachova DI¹, Klein OI¹, Marinichev AA^{1,2}, Gessler NN¹, Bogdanova ES³, Smirnova MS³✉, Isakova EP¹, Deryabina YI¹

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, Russia

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

Non-alcoholic fatty liver disease is associated with a number of disorders (diabetes, obesity, cardiovascular diseases), and can also be induced by drugs or toxic compounds. Recently the important branch of medicine is the search for effective means of prevention and treatment of fatty hepatosis. Our work was aimed to study the effect of some biologically active natural polyphenols (resveratrol and pinosylvin stilbenes as well as dihydromyricetin dihydroflavonol) on the function and histologic features of the liver. In the experimental model of thioacetamide-induced toxic hepatitis, the male rats of the *Wistar* line daily received the effective doses of polyphenols intragastrically by gavage together with 0.05% thioacetamide added to drinking water. All studied polyphenols contributed to stabilization of rat weight and a two-fold significant ($p < 0.05$) decrease in the level of direct bilirubin in the blood serum of animals treated with thioacetamide. Histological analysis of the liver confirmed a decrease in inflammation and hemorrhage in animals treated with polyphenols amid continued administration of thioacetamide for 30 days. Based on the data obtained, it can be concluded that the natural polyphenols which belong to the classes of dihydroflavonols (dihydromyricetin) and stilbenes (resveratrol and pinosylvin) have a positive effect on liver function in the experimental model of toxic hepatosis. The studied polyphenols can be considered as potential hepatoprotective drugs used as a part of the liver diseases complex therapy.

Keywords: polyphenol, resveratrol, dihydromyricetin, pinosylvin, thioacetamide, steatosis, hepatitis, rat

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement № 14.616.21.0083, unique project ID: RFMEFI61617X0083).

Acknowledgement: we thank to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Author contribution: Dergachova DI — conducting experiments on toxic hepatitis induction, histological analysis, manuscript draft preparation; Klein OI — histological studies, data acquisition and analysis; Marinichev AA — experiments on toxic hepatitis induction, blood sample collection from experimental animals, preparation of histological samples; Gessler NN — conducting experiments on toxic hepatitis induction, blood sample collection from experimental animals, data acquisition and analysis; Bogdanova ES, Smirnova MS — literature analysis, data acquisition and analysis; Isakova EP — conducting experiments on toxic hepatitis induction, literature analysis; Deryabina YI — experiment planning, literature analysis, data acquisition and analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Bach Institute of Biochemistry RAS (protocol № 17 dated September 5, 2019). The animals' care as well as all procedures and experimental protocols complied with the Ministry of Health of the Russian Federation requirements and to the Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria S. Smirnova
Moskvina, 10–226, Khimki, Moscow Region, 141401; mbarbotko@ya.ru

Received: 26.10.2019 **Accepted:** 17.11.2019 **Published online:** 27.11.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.075

Болезни печени включают широкий спектр патологий: от жирового гепатоза (стеатоза) и гепатита до цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Они широко распространены во всем мире и имеют высокую социальную значимость [1]. Печеночная недостаточность, особенно ее тяжелая форма, вызванная циррозом печени, занимает 12-е место среди причин смертельных случаев в мире [2]. Циррозы не только приводят к нарушениям функции печени, но и вызывают развитие печеночного энцефалопатического синдрома, представляющего собой нарушение когнитивных функций и психомоторики. Печеночный синдром может послужить причиной инвалидизации больного [3]. За последние 10 лет неалкогольная жировая дисфункция печени стала основным типом ее хронических поражений: она выявлена более чем у 30% населения [4]. Развитие жирового гепатоза статистически ассоциировано с сахарным диабетом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением. Его возникновение провоцируют применение лекарственных препаратов и воздействие токсических соединений. Выявлена связь стеатоза с другими хроническими заболеваниями, такими как сонное апное, колоректальный рак, остеопороз, псориаз и эндокринные нарушения [5]. Неалкогольная жировая дистрофия печени представляет собой неспецифическую реакцию гепатоцитов на токсическое воздействие. Основной характеристикой этого состояния является избыточное накопление жира в печени. При сильной жировой дистрофии можно наблюдать жировые кисты и разрастание соединительной ткани, что приводит к функциональным нарушениям печени и связанным с ними системным патологиям.

Множество сигнальных и метаболических путей, участвующих в регуляции работы печени, дают возможность выбора терапевтических мишеней [6]. В качестве гепатопротекторных соединений в составе комплексной терапии применяют различные агенты: антибиотики (неомицин, паромоцин, метронидазол, ванкомицин, рифаксимин) [7] и дисахариды (лактuloза, лактитол) с низкой способностью к всасыванию [8], природные аминокислоты и метаболиты азотного обмена (орнитин аспартат, аминокислоты с разветвленной цепью) [9], модуляторы бактериальной кишечной микрофлоры (пробиотики, синбиотики) [10], производные желчных кислот и β -агонисты рецепторов тиреоидных гормонов [11]. Однако существующие в настоящее время средства профилактики и лечения патологий печени различной степени выраженности и этиологии включают в основном симптоматические препараты довольно широкого диапазона действия, значительная часть которых либо не рекомендована для длительного применения, либо не разрешена к использованию в ряде стран. Среди лекарственных средств с высокой доказанной эффективностью и безопасностью длительного применения в качестве гепатопротекторов можно выделить эссенциальные фосфолипиды (ЭФЛ), урсодезоксихолевую кислоту (УДХЛ), препараты расторопши, адеметионин [12].

Природные полифенолы широко применяют в настоящее время в качестве антиоксидантных фармакологических субстанций, оказывающих общее противовоспалительное, нейро- и кардиопротекторное действия, моделирующих аутофагию и защищающих митохондрии от патологических событий, индуцируя сигнальные пути выживания клеток [13]. Успех применения полифенолов для лечения заболеваний, имеющих сложносоставную этиологию (нейродегенеративных

расстройств различного происхождения, аутоиммунных, аллергических, онкологических и прионных), связан с их непосредственным влиянием на клетки защитных систем организма и индукцией апоптоза клеток основных тканей [14]. Полифенолы растительного происхождения оказывают влияние на окислительный стресс, липидный обмен, инсулинорезистентность и воспаление, которые являются наиболее важными патологическими процессами в этиологии заболеваний печени [1]. Показано положительное действие некоторых полифенолов на функциональное состояние печени в модели токсического гепатита, индуцированного различными гепатотоксикантами. Так, природный флавоноид кверцетин защищал печень от дисфункции, индуцированной тетрахлорметаном (CCl_4). Механизм реализации его эффекта авторы связывали с антиоксидантным действием, а также с подавлением ряда реакций при участии NF- κ B, что приводило к уменьшению уровня секреции воспалительных цитокинов печени [15]. Еще один флавоноид, пуэрарин, также заметно ослаблял последствия CCl_4 -индуцированной гепатотоксичности за счет снижения продукции активных форм кислорода (АФК), активации антиоксидантной ферментной системы и регулирования экспрессии генов, ответственных за биосинтез и метаболизм липидов в печени [16]. Флавоноид байкалин, выделенный из шлемника (*Scutellaria radix*), оказался эффективным в защите печени от ацетаминофен-индуцированного токсического повреждения за счет подавления сигнализации внеклеточного сигнала-регулируемого киназного пути [17].

Введение тиацетамида (ТАА) приводит к индукции фиброза и цирроза печени у крыс и мышей. Через две недели после начала введения ТАА в ряде исследований наблюдали значительное повышение активности печеночных аминотрансфераз (аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ)), указывающее на развитие патологического процесса. К концу четвертой недели активность АСТ и АЛТ снижалась до нормальных значений на фоне увеличения содержания коллагена в ткани печени [18]. Окислительный стресс считают основным фактором в ТАА-индуцированном фиброзном перерождении печени, вызванном токсическим метаболитом тиацетамид-S-оксидом, образующимся при биотрансформации ТАА ферментами семейства цитохром P450 (CYP1A2, CYP2C6, CYP2E1, CYP3A2) и микросомальными ФАД-содержащими монооксигеназами [19, 20]. Согласно опубликованным данным, ресвератрол значительно снижал повреждения печени, вызванные ТАА. Механизм его действия обусловлен снижением интенсивности окислительного стресса, подавление NF- κ B-зависимого каскада реакций и апоптоза [21].

Целью представленной работы было исследовать потенциальное гепатопротекторное действие полифенолов стильбеновой природы — ресвератрола (РСВ) и пиносильвина (ПС) — и дигидрофлавонола дигидромирицетина (ДГМ) на функциональное состояние и гистологическую картину печени в модели токсического гепатита крыс, вызываемого ТАА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах белых крыс линии Wistar (начальный вес животных составлял 190–230 г), полученных из питомника «Столбовая» (Московская обл.) с условиями содержания, соответствующими требованиям GLP. Животных на протяжении эксперимента содержали в

условиях вивария с естественным световым режимом (12 ч день, 12 ч ночь) на полнорацонной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных, согласно ГОСТ Р502580092. Работу осуществляли в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований (в 2-х частях, под редакцией А. Н. Миронова (действующая редакция)) и необходимых нормативных документов.

Для индукции токсического повреждения печени и развития печеночной патологии животным ежедневно алиментарным путем вводили водный 0,05%-й раствор ТАА, который показал высокую эффективность при разработке модели печеночной патологии [18, 20]. Введение ТАА приводит к индукции фиброза и цирроза печени у крыс и мышей.

Животных разделили на группы по 10 животных:

1 — группа интактных животных, которых содержали на обычном пищевом рационе;

2 — группа контрольных животных, получавших с питьем 0,05%-й ТАА;

3 — экспериментальная группа, получавшая с питьем 0,05%-й ТАА на фоне введения РСВ (15 мг на 1 кг веса перорально);

4 — экспериментальная группа, получавшая с питьем 0,05%-й ТАА на фоне введения ДГМ (10 мг на 1 кг веса перорально);

5 — экспериментальная группа, получавшая с питьем 0,05%-й ТАА на фоне введения ПС (5 мг на 1 кг веса перорально).

Введение животным ТАА проводили в течение 30 дней. Осмотр животных проводили ежедневно, взвешивание осуществляли каждые три дня. Полифенолы были выделены и очищены из растительного сырья (биоматериалов хвойных пород, доступных на территории РФ). Полифенолы вводили в виде раствора в водном 2%-м крахмальном геле каждый день внутривентрально через зонд, после приема пищи, из расчета не более 0,4 мл на каждое животное. Отбор крови и образцов печени животных для биохимических и гистологических исследований проводили на 10-е, 20-е и 30-е сутки эксперимента. Образцы тканей печени и крови отбирали немедленно после вскрытия. Полученные образцы сыворотки крови исследовали с помощью биохимического анализатора AU 480 (BeckmanCoulter; США) на содержание прямого билирубина, активности ферментов (аминотрансфераз АСТ и АЛТ). Биохимический анализ крови экспериментальных животных выполняли на базе независимой ветеринарной лаборатории «ШансБио» (участник Федеральной системы внешнего контроля качества лабораторных исследований МЗ РФ ФСВОК, код участника 10705) с применением анализаторов AU 480 (BeckmanCoulter; США), биохимической системы BA 400 (BioSystems; Испания) и Abacus Vet 4 (Diatron; Австрия). Индекс печени определяли как соотношение массы органа к массе тела (в %). Для гистологических исследований брали кусочки печени из нижней части правой доли. Гистологические препараты (тонкие срезы) получали путем изготовления парафинизированных микросрезов согласно методике, описанной в работе [22]. Приготовление препаратов включало следующие этапы.

1. Подготовка органов для заливки в раствор 4%-го параформальдегида (ПФА) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Отобранные при вскрытии органы крыс помещали в планшеты с разлитым 4%-м ПФА на 30 мин. Каждые 30 мин производили трехкратную смену 4%-го ПФА на новый раствор, после чего оставляли на 24 ч при температуре +4 °С.

2. Подготовка органов к заливке в уплотняющие среды по следующей схеме: а) промывание 3 раза ФСБ по 30 мин при +4 °С; б) инкубация в 70%-м этаноле, 3 смены по 30 мин; в) инкубация в 80%-м этаноле 40 мин; г) инкубация в смеси: 82% этанол–бутанол (3 : 1) 40 мин; д) инкубация в смеси: 96% этанол–бутанол (1 : 1) 50 мин; е) инкубация в смеси: 100% этанол (абсол.) — бутанол (1 : 3) 50 мин; ж) инкубация в бутаноле I 1 ч; з) инкубация в бутаноле II — 1 ч.

3. Заливка органов в парафин. Использовали парафин температуры +60 °С, заливали его в подготовленную и нагретую форму из фольги и помещали туда образец. Сушили блоки в течение 10–12 ч.

4. Приготовление срезов для окрашивания. Охлажденные парафиновые блоки закрепляли на деревянном блоке при помощи растопленного парафина. Срезы делали на микротоме санном MC-2 (ХЗ «Точмедприбор»; Россия). Затем получившиеся срезы крепили на предметное стекло и помещали в сушилку на 30 мин при температуре +40 °С.

5. Покраска срезов. Срезы перед окрашиванием освобождали от парафина с помощью толуола или ксилола. Окрашивание срезов проводили в системе «гематокислин–эозин». После окрашивания на срезы наносили Immuno Mount-DABCO™ (Genetex; Канада) и сверху помещали покровное стекло.

Статистические расчеты производили на персональном компьютере с использованием программного пакета STATISTICA 6.0 (Dell; США). Данные представляли как среднюю арифметическую величину и стандартную ошибку средних ($M \pm m$). Для оценки различий параметров между группами животных использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка динамики веса животных показала, что для интактных животных (группа 1) было характерно увеличение массы тела на протяжении всего периода эксперимента (рис. 1, 1). На фоне введения ТАА независимо от введения полифенолов вес животных заметно снижался в первую неделю эксперимента. Введение полифенолов обеспечило положительную тенденцию увеличения массы животных по сравнению с контрольной группой, начиная с третьей недели, что могло свидетельствовать о позитивном воздействии полифенолов на функции печени. К концу эксперимента индекс печени (соотношение массы органа и массы тела животного) возрастал с $3,65 \pm 0,2$ у интактных животных до $5,1 \pm 0,3$ у животных контрольной группы, получавших ТАА. В группах, получавших полифенолы наряду с ТАА, индекс печени составлял $4,5 \pm 0,19$, $4,6 \pm 0,23$ и $4,4 \pm 0,16$ для групп животных, которым вводили РСВ, ДГМ и ПС соответственно. Снижение индекса печени у животных, получавших полифенолы, свидетельствовало о снижении патологических изменений, вызываемых введением ТАА.

Анализ динамики биохимических показателей крови экспериментальных животных, получающих ТАА, показал, что уровень билирубина в крови увеличивался почти в 10 раз, в то время как введение полифенолов уменьшало этот показатель в 2–4 раза (табл.). Следует отметить, что эффект снижения уровня билирубина в сыворотке крови проявлялся на протяжении всего периода введения полифенолов. Содержание общего белка и глюкозы несколько снижалось во всех группах, получавших ТАА, независимо от введения полифенолов (достоверных различий нет, данные не представлены).

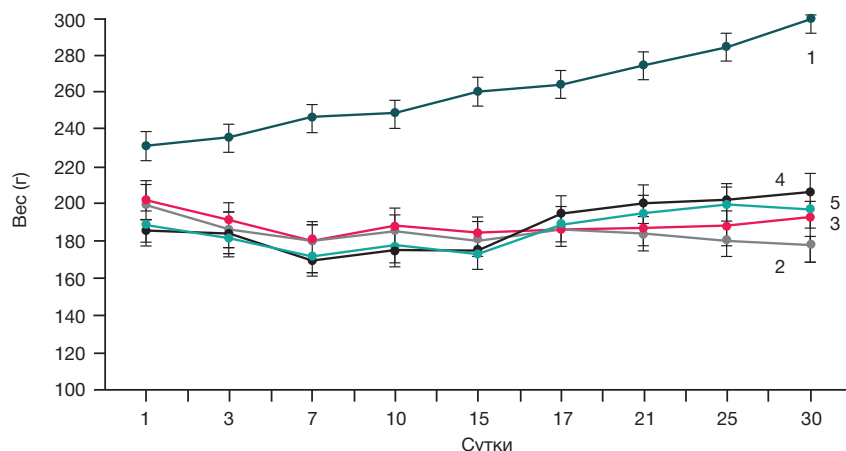


Рис. 1. Динамика изменения веса животных в ходе эксперимента: 1 — интактная группа; 2 — контрольная группа, получавшая ТАА; 3–5 — группы животных, получавших наряду с ТАА полифенолы РСВ, ДГМ и ПС соответственно

Активность АСТ достоверно повышалась ($p < 0,05$) в сыворотке крови животных всех групп, получавших ТАА, по сравнению с контролем (рис. 2А). Почти двукратное повышение АСТ у животных контрольной группы к 20-му дню и далее некоторое снижение к 30-му дню эксперимента характерно для этой модели гепатотоксичности и хорошо согласуется с данными других авторов [18, 21]. На фоне полифенолов показатели АСТ были ниже, а к концу эксперимента в группах, получавших РСВ и ПС, можно было наблюдать достоверное снижение этого показателя по сравнению с контрольной группой (рис. 2А).

Активность АЛТ при введении ТАА в контрольной группе достоверно повышалась ($p < 0,05$) на 40% только после 20-го дня эксперимента (рис. 2Б). Было отмечено также увеличение активности АЛТ в середине эксперимента у животных, получавших РСВ на фоне ТАА (около 30%), и небольшое повышение (20%) у животных с введением ПС к 30-му дню эксперимента. В группе, получавшей ДГМ, значения АЛТ на протяжении всего периода наблюдения не отличались от таковых у интактных животных. К концу эксперимента показатели АЛТ нормализовались у животных группы, получавшей РСВ (рис. 2Б).

На следующем этапе работ были проанализированы гистологические срезы печени животных всех исследованных экспериментальных групп. Гепатоциты интактных животных характеризовались нормальной цитоморфологией с хорошо выраженными ядрами и умеренным полиморфизмом ткани (рис. 3А). Интоксикация гепатотоксикантом ТАА приводила к появлению диапедезных кровоизлияний (рис. 3Б) и возникновению мелкокапельной жировой дистрофии. Полученная нами гистологическая картина соответствовала известным симптомам патологии печени после действия ксенобиотиков (ТАА и CCl_4) [23]. Введение животным полифенолов (рис. 3Г–Е) предотвращало существенную деградацию ткани печени: нарушение структуры гепатоцитов, появление

гематом и очагов воспаления, содержащих мелкоклеточные образования (рис. 3Г–Е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Положительное влияние целого ряда природных полифенолов на индуцированные гепатотоксикантами патологии печени хорошо известно. Так, флавоноид кверцетин оказывал защитное действие при индуцированном CCl_4 токсическом гепатите у мышей [15]. Полифенол диэккол из бурой водоросли *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell защищал печень мышей от CCl_4 -индуцированного разрушения через регуляцию генов, отвечающих за экспрессию апоптотических белков Bax и Bcl-xl [24]. В другой работе полифенол изорамнетин-3-О-галактозид, изолированный из полыни волосовидной (*Artemisia capillaris* Thunberg), также оказывал положительное действие при CCl_4 -индуцированной патологии печени через уменьшение уровня фосфорилированной c-JNK, внеклеточной сигнал-регулирующей киназы (ERK) и p38 MAPK [25]. Флавоноид байкалин оказывал значительный защитный эффект при ацетаминофен-индуцированном гепатите у мышей [17]. В используемой в нашей работе модели токсического повреждения печени, индуцируемого ТАА, защитное влияние полифенолов исследовано только на примере полифенола стильбенового ряда РСВ. В недавней работе [21] было продемонстрировано индуцированное РСВ ингибирование воспалительного процесса и окислительного стресса в тканях печени крыс за счет снижения уровня экспрессии NF- κ B и CYP2E1 и увеличения апоптоза некротизированных гепатоцитов. Кроме того, в работе была показана стабилизация биохимических показателей крови (АЛТ и АСТ) и нормализация тканевой архитектуры печени опытных животных, получающих РСВ (10 мг на кг веса животных). Учитывая эти данные, можно предположить, что в наших исследованиях имеет место похожий механизм действия

Таблица. Изменение уровня билирубина в сыворотке крови крыс в ходе эксперимента

Период	Билирубин прямой, мкмоль/л				
	Интактная	Контрольная	РСВ	ДГМ	ПС
10 дней	0,4 ± 0,1	4,9 ± 0,5*	1,1 ± 0,2*,**	1,5 ± 0,6*,**	1,2 ± 0,6*,**
20 дней	0,4 ± 0,2	4,4 ± 0,5*	2,0 ± 0,8*,**	1,3 ± 0,5*,**	2,5 ± 0,2*,**
30 дней	0,45 ± 0,2	4,2 ± 1,1*	1,1 ± 0,1*,**	2,4 ± 0,6*,**	1,5 ± 0,7*,**

Примечание: * — $p < 0,05$ по отношению к соответствующим показателям интактной группы; ** — $p < 0,05$ по отношению к соответствующим показателям контрольной группы.

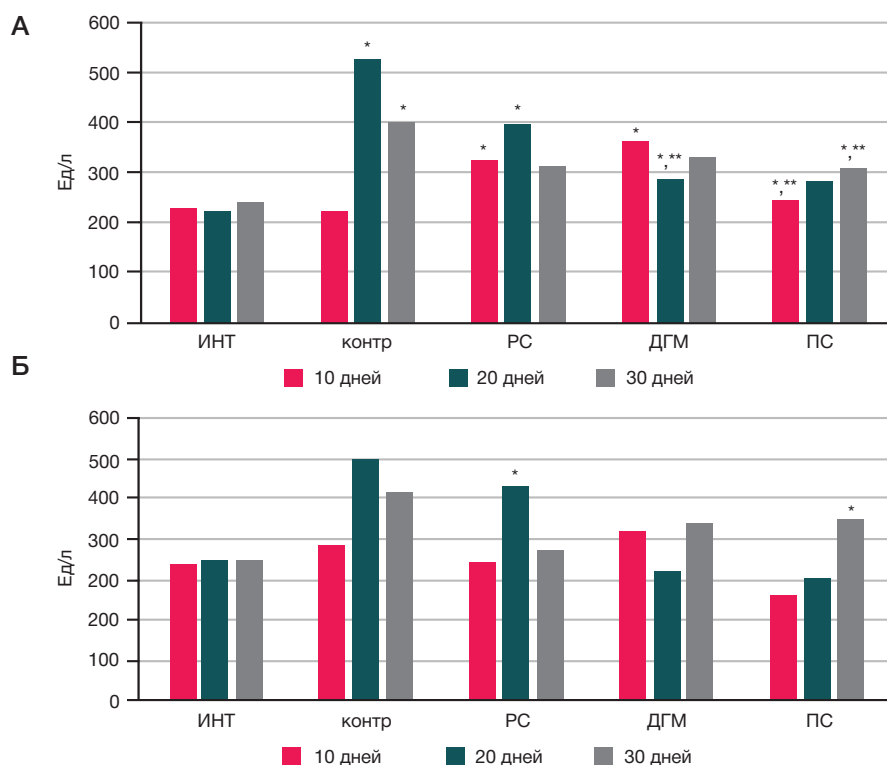


Рис. 2. Изменение АСТ (А) и АЛТ (Б) в сыворотке крови крыс в процессе эксперимента. * — $p < 0,05$ по отношению к соответствующим показателям интактной группы; ** — $p < 0,05$ по отношению к соответствующим показателям контрольной группы

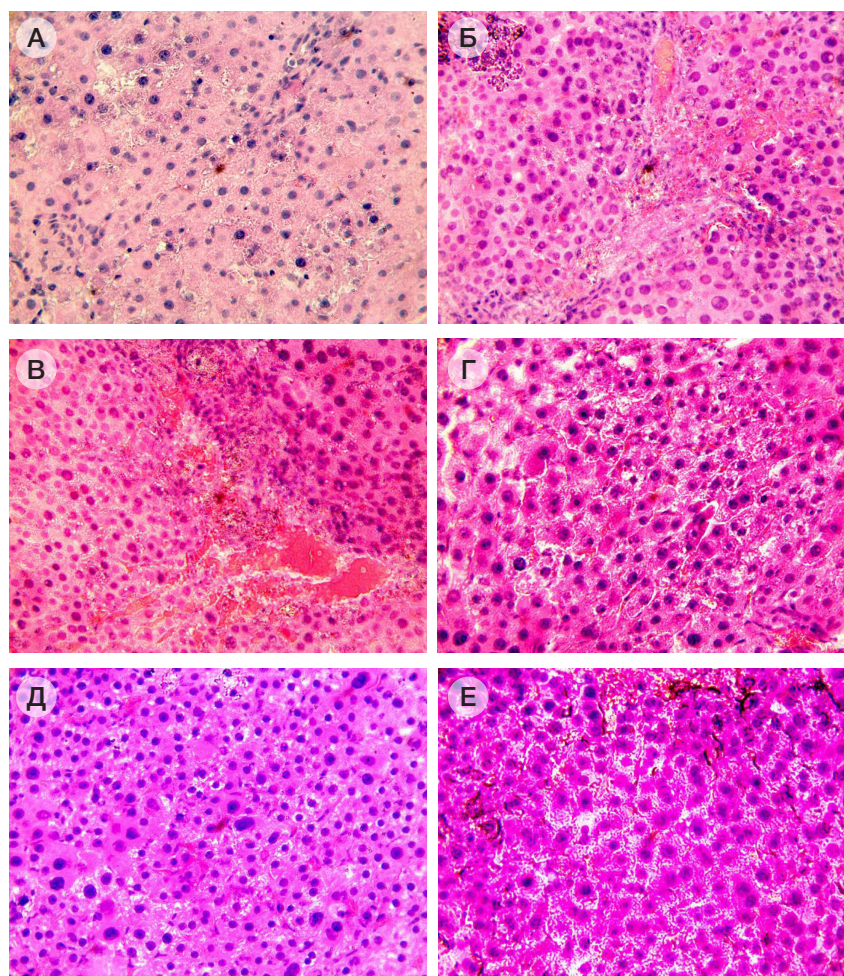


Рис. 3. Микрофотографии срезов печени животных экспериментальных групп, окрашенных гематоксилином-эозином. А. Интактная группа (1). Б, В. Контрольная группа (2). Г. Экспериментальная группа (3). Д. Экспериментальная группа (4). Е. Экспериментальная группа (5). Увеличение $\times 400$

PCB, основанный на его мощном антиоксидантном действии. Относительно эффектов ДГМ и ПС в модели индукции токсического гепатита у лабораторных животных литературных данных нет. Существуют лишь указания на проапоптотическое действие ДГМ на клетки HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы [26]. Учитывая высокую биологическую активность этих полифенолов в различных моделях заболеваний, можно предположить, что исследованное нами защитное действие ДГМ и ПС при ТАА-индуцированной гепатопатологии также может быть основано на их мощном антиоксидантном потенциале.

В работе [27] показано, что диосцин (сапонин из диоскореи японской *Dioscorea nipponica* Makino), подобно исследованным нами полифенолам, ослабляет гепатотоксичность ТАА, увеличивая содержание в клетках печени глутатиона и активность ферментов антиоксидантной защиты глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, снижая содержание малонового диальдегида. Введение

животным диосцина увеличивало экспрессию FXR и p-AMPK α , а также Nrf2, HO-1, NQO-1 и GCLM. Напротив, содержание в клетках печени мРНК провоспалительных факторов NF- κ B (p65), ICAM 1, HMGB1, COX-2, TNF α , IL1 β и IL6 под воздействием введения диосцина снижалось, что, по мнению авторов, является доказательством способности этого природного соединения подавлять гепатотоксичность ТАА за счет ослабления работы сигнального пути FXR/AMPK в гепатоцитах.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что природные полифенолы класса дигидрофлавонолов (ДГМ) и стильбенов (PCB и ПС) оказывают положительное воздействие на функции печени в модели экспериментального токсического гепатоза и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных гепатопротекторов.

Литература

- Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 8394818. DOI: 10.1155/2018/8394818.
- Raff E, Singal AK. Optimal management of alcoholic hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2014; 60 (1): 25–38.
- Riggio O, Ridola L, Pasquale C. World J Gastrointest Pharmacol Ther Hepatic encephalopathy therapy: An overview. 2010; 1 (2): 54–63.
- Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2017; 15 (1): 45.
- Popov VB, Lim JK. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: The role of medical, surgical, and endoscopic weight loss. *J Clin Transl Hepatol*. 2015; 3 (3): 230–38.
- Hong M, Li S, Tan H, Wang N, Tsao SW, Feng Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *Int J Mol Sci*. 2015; 16 (12): 28705–45.
- Festi D, Vestito A, Mazzella G, Roda E, Colecchia A. Management of hepatic encephalopathy: focus on antibiotic therapy. *Digestion*. 2006; 73 (Suppl. 1): 94–101.
- Malaguamera M, Gargante MP, Malaguamera G, Salmeri M, Mastrojeni S, Rampello L, et al. Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22 (2): 199–206.
- Efrati C, Masini A, Merli M, Valeriano V, Riggio O. Effect of sodium benzoate on blood ammonia response to oral glutamine challenge in cirrhotic patients: a note of caution. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95 (12): 3574–78.
- Plauth M, Cabre E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition: liver disease. *Clin Nutr*. 2006; 25 (2): 285–94.
- Wong VW, Singal AK. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019; (4): 53.
- Минушкин О. Н., Масловский Л. В., Букшук А. А. Применение гепатопротекторов в клинической практике. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2012; 10 (2): 67–72.
- Теплова В. В., Исакова Е. П., Кляйн О. И., Дергачева Д. И., Гесслер Н. Н., Дерябина Ю. И. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии (Обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018; 54 (3): 215–35.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie Intern Edition*. 2011; 50 (3): 586–621.
- Ma JQ, Li Z, Xie WR, Liu CM, Liu SS. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF- κ B pathway. *Intern Immunopharm*. 2014; 28 (1): 531–39.
- Ma JQ, Ding J, Zhao H, Liu CM. Puerarin attenuates carbon tetrachloride-induced liver oxidative stress and hyperlipidaemia in mouse by JNK/c-Jun/CYP7A1 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014; 115 (5): 389–95.
- Liao CC, Day YJ, Lee HC, Liou JT, Chou AH, Liu FC. ERK signaling pathway plays a key role in baicalin protection against acetaminophen-induced liver injury. *Am J Chinese Med*. 2017; 45 (1): 105–21.
- Wallace MC, Hamesch K, Lunova M, Kim Y, Weiskirchen R, Strnad P, et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Laboratory Animals*. 2015; 49 (S1): 21–9.
- Xie Y, Wang G, Wang H, Yao X, Jiang S, Kang A, et al. Cytochrome P450 dysregulations in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats and the counteracting effects of hepatoprotective agents. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012; 40 (4): 796–802.
- Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 37 (1): 118–33.
- Seif El-Din SH, El-Lakkany NM, Salem MB, Hammam OA, Saleh S, Botros SS. Resveratrol mitigates hepatic injury in rats by regulating oxidative stress, nuclear factor- κ B, and apoptosis. *J Advanc Pharmaceut Technol Res*. 2016; 7 (3): 99–104.
- Франк Г. А., Мальков П. Г., редакторы. 101 шаг на пути к успеху в гистологии. Leica Microsystems Vetzlar, Germany, 2012; 136 с.
- Манских В. Н. Патоморфология лабораторной мыши. М.: ВАО, 2018; 224 с.
- Kang MC, Kang SM, Ahn G, Kim KN, Kang N, Samarakoon KW, et al. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 35 (3): 517–23.
- Kim DW, Cho HI, Kim KM, Kim YS. Isorhamnetin-3-O-galactoside protects against CCl₄-induced hepatic injury in mice. *Biomolecules Therapeutics*. 2012; 20 (4): 406–12.
- Huang X, Lian T, Guan X, Liu B, Hao S, Zhang J, et al. Dihydromyricetin reduces TGF- β via P53 activation-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Protein Pept Lett*. 2017; 24 (5): 419–24.
- Zheng L, Yin L, Xu L, Qi Y, Li H, Xu Y, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2018; (97): 481–8. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.153.

References

- Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 8394818. DOI: 10.1155/2018/8394818.
- Raff E, Singal AK. Optimal management of alcoholic hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2014; 60 (1): 25–38.
- Riggio O, Ridola L, Pasquale C. World J Gastrointest Pharmacol Ther Hepatic encephalopathy therapy: An overview. 2010; 1 (2): 54–63.
- Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2017; 15 (1): 45.
- Popov VB, Lim JK. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: The role of medical, surgical, and endoscopic weight loss. *J Clin Transl Hepatol*. 2015; 3 (3): 230–38.
- Hong M, Li S, Tan H, Wang N, Tsao SW, Feng Y. Current status of herbal medicines in chronic liver disease therapy: the biological effects, molecular targets and future prospects. *Int J Mol Sci*. 2015; 16 (12): 28705–45.
- Festi D, Vestito A, Mazzella G, Roda E, Colecchia A. Management of hepatic encephalopathy: focus on antibiotic therapy. *Digestion*. 2006; 73 (Suppl. 1): 94–101.
- Malaguarnera M, Gargante MP, Malaguarnera G, Salmeri M, Mastrojeni S, Rampello L, et al. Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22 (2): 199–206.
- Efrati C, Masini A, Merli M, Valeriano V, Riggio O. Effect of sodium benzoate on blood ammonia response to oral glutamine challenge in cirrhotic patients: a note of caution. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95 (12): 3574–78.
- Plauth M, Cabre E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition: liver disease. *Clin Nutr*. 2006; 25 (2): 285–94.
- Wong VW, Singal AK. Emerging medical therapies for non-alcoholic fatty liver disease and for alcoholic hepatitis. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019; (4): 53.
- Minushkin ON, Maslovsky LV, Bukshuk AA. The use of hepatic protectors in clinical practice. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova*. 2012; 10 (2): 67–72.
- Teplova VV, Isakova EP, Klein OI, Dergacheva DI, Gessler NN, Deryabina YI. Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018; 54 (3): 221–37.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegue L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie Intern Edition*. 2011; 50 (3): 586–621.
- Ma JQ, Li Z, Xie WR, Liu CM, Liu SS. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF- κ B pathway. *Intern Immunopharm*. 2014; 28 (1): 531–39.
- Ma JQ, Ding J, Zhao H, Liu CM. Puerarin attenuates carbon tetrachloride-induced liver oxidative stress and hyperlipidaemia in mouse by JNK/c-Jun/CYP7A1 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014; 115 (5): 389–95.
- Liao CC, Day YJ, Lee HC, Liou JT, Chou AH, Liu FC. ERK signaling pathway plays a key role in baicalin protection against acetaminophen-induced liver injury. *Am J Chinese Med*. 2017; 45 (1): 105–21.
- Wallace MC, Hamesch K, Lunova M, Kim Y, Weiskirchen R, Strnad P, et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Laboratory Animals*. 2015; 49 (S1): 21–9.
- Xie Y, Wang G, Wang H, Yao X, Jiang S, Kang A, et al. Cytochrome P450 dysregulations in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats and the counteracting effects of hepatoprotective agents. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012; 40 (4): 796–802.
- Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 37 (1): 118–33.
- Seif El-Din SH, El-Lakkany NM, Salem MB, Hammam OA, Saleh S, Botros SS. Resveratrol mitigates hepatic injury in rats by regulating oxidative stress, nuclear factor- κ B, and apoptosis. *J Advanc Pharmaceut Technol Res*. 2016; 7 (3): 99–104.
- Frank GA, Malkov PG, редакторы. 101 shag na puti k uspekhu v gistologii. Leica Microsystems Vetzlar, Germany, 2012; 136 c. Russian.
- Kang MC, Kang SM, Ahn G, Kim KN, Kang N, Samarakoon KW, et al. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 35 (3): 517–23.
- Kang MC, Kang SM, Ahn G, Kim KN, Kang N, Samarakoon KW, et al. Protective effect of a marine polyphenol, dieckol against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in mouse. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013; 35 (3): 517–23.
- Kim DW, Cho HI, Kim KM, Kim YS. Isorhamnetin-3-O-galactoside protects against CCl₄-induced hepatic injury in mice. *Biomolecules Therapeutics*. 2012; 20 (4): 406–12.
- Huang X, Lian T, Guan X, Liu B, Hao S, Zhang J, et al. Dihydromyricetin reduces TGF- β via P53 activation-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Protein Pept Lett*. 2017; 24 (5): 419–24.
- Zheng L, Yin L, Xu L, Qi Y, Li H, Xu Y, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2018; (97): 481–8. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.153.

ЦИЛИНДРОКЛЕТОЧНАЯ МЕТАПЛАЗИЯ И ПИЩЕВОД БАРРЕТТА: МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП

Л. М. Михалева^{1,2}✉, К. С. Войтковская², Е. Д. Федоров^{2,3}, Н. А. Грачева², А. Е. Бирюков^{1,2}, А. В. Шидии-Закруа³, М. Ю. Гушин¹¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия² Городская клиническая больница № 31, Москва, Россия³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Пищевод Барретта (ПБ), или доказанная морфологически кишечная метаплазия слизистой оболочки дистального отдела пищевода, является облигатным предраковым заболеванием, которое развивается как осложнение гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ). Цель исследования — выполнить сравнительный морфологический анализ биопсированных фрагментов ПБ, ЦМ на расстоянии < 1 см и > 1 см от гастроэзофагеального перехода (ГЭП), а также провести иммуногистохимическое исследование фрагментов с ПБ и ЦМ > 1 см от ГЭП при наличии и отсутствии дисплазии. В исследование вошли 92 пациента с ГЭРБ: 42 пациента с ПБ, 24 пациента с ЦМ > 1 см от ГЭП (COM1,5 до C13M14) и 26 пациентов с ЦМ < 1 см от ГЭП (COM0,3–0,8). При сравнительном морфологическом анализе наличие реактивных изменений эпителия было связано с тяжестью эзофагита во всех группах. Реактивные изменения эпителия выявляли достоверно чаще при ПБ по сравнению с ЦМ > 1 см от ГЭП ($p < 0,05$ при использовании критерия Манна–Уитни). При ПБ в восьми наблюдениях (19,05%) выявлена low-grade дисплазия. В одном наблюдении ЦМ > 1 см от ГЭП (4,2%) выявлена high-grade дисплазия на фоне кардиальной метаплазии с иммуногистохимическими признаками субморфологической энтерализации. При иммуногистохимическом исследовании с маркерами желудочной и кишечной дифференцировки признаки субморфологической энтерализации выявлены во всех фрагментах пищевода с кардиальной метаплазией и у пациентов с ПБ в зонах с отсутствием бокаловидных клеток.

Ключевые слова: цилиндроклеточная метаплазия пищевода, пищевод Барретта, low-grade и high-grade дисплазия, канцерогенез

Информация о вкладе авторов: Л. М. Михалева — планирование и руководство исследованием, предоставление материально-технической базы для проведения исследования, анализ результатов; К. С. Войтковская — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка микрофотографий и рукописи; Е. Д. Федоров — клиническое обследование пациентов, выполнение ЭГДС с взятием биопсийного материала, анализ и обобщение полученных данных; А. В. Шидии-Закруа — клиническое обследование пациентов, выполнение ЭГДС с взятием биопсийного материала; А. Е. Бирюков — исследование и анализ биопсийного материала; Н. А. Грачева — исследование и анализ биопсийного материала; М. Ю. Гушин — сбор и анализ литературы.

Соблюдение этических стандартов: все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Михайловна Михалева
ул. Цюрупы, д. 3, г. Москва, 117418; mikhalevalm@yandex.ru

Статья получена: 03.12.2019 **Статья принята к печати:** 18.12.2019 **Опубликована онлайн:** 25.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.086

COLUMNAR METAPLASIA AND BARRETT'S ESOPHAGUS: MORPHOLOGICAL HETEROGENEITY AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PHENOTYPE

Mikhaleva LM^{1,2}✉, Voytkovskaya KS², Fedorov ED^{2,3}, Gracheva NA², Birukov AE^{1,2}, Shidiy-Zakrua AV³, Guschin MYu¹¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia² City Clinical Hospital № 31, Moscow, Russia³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Barrett's esophagus (BE) is a pathologically confirmed intestinal metaplasia (CM) of the distal esophagus. BE is recognized as a potential complication of gastroesophageal reflux disease (GERD) and a premalignant condition with a high risk of neoplastic progression. The aim of this study was to compare the morphology of biopsied BE segments and CM segments extending < 1 cm and > 1 cm above the gastroesophageal junction (GEJ), as well as to perform the immunohistochemical analysis of biopsies with BE and CM > 1 cm above GEJ with or without dysplasia. The study recruited 92 patients with GERD: 42 patients with BE, 24 patients with CM > 1 cm above GEJ (COM1.5–C13M14) and 26 patients with CM < 1 cm above GEJ (COM0.3–0.8). Comparative analysis of tissue morphology revealed an association between the reactive changes in the epithelium and the severity of esophagitis in all groups. Reactive changes were detected significantly more often in BE segments than in CM segments > 1 cm (Mann-Whitney U, $p < 0.05$). Eight patients with BE (19.05%) were found to have low-grade dysplasia. One patient with CM > 1 cm above GEJ (4.2%) had high-grade dysplasia with cardiac-type metaplasia and immunohistochemical features of submorphological enterization. Immunohistochemical testing for the intestinal and gastric markers of cell differentiation revealed the signs of submorphological enterization in all esophageal specimens with cardiac and fundic type metaplasia and in the specimens with BE in the areas lacking goblet cells.

Keywords: columnar metaplasia, Barrett's esophagus, low-grade dysplasia, high-grade dysplasia, carcinogenesis

Author contribution: Mikhaleva LM — planned and supervised the study; provided equipment for the study; analyzed the obtained results; Voytkovskaya KS — analyzed the literature; collected, analyzed and interpreted the obtained data; processed microphotographs and wrote the manuscript; Fedorov ED — examined the patients; performed EGD and biopsy; analyzed and summarized the data; Shidiy-Zakrua AV — examined the patients, performed EGD and biopsy; Birukov AE — and Gracheva NA — performed pathological examination; Guschin MYu — analyzed the literature.

Compliance with ethical standards: all patients gave written informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila M. Mikhaleva
Tsyurupy 3, Moscow, 117418; mikhalevalm@yandex.ru

Received: 03.12.2019 **Accepted:** 18.12.2019 **Published online:** 25.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.086

Пищевод Барретта (ПБ), под которым подразумевают доказанную эндоскопически и морфологически цилиндроклеточную кишечную метаплазию слизистой оболочки дистального отдела пищевода, является облигатным предраковым заболеванием, которое развивается как осложнение гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) у ряда пациентов. В настоящее время в мире нет единого определения термина «пищевод Барретта». Это связано с целым рядом причин, в том числе с большой разнородностью патогистологических изменений участка трансформации эпителия в дистальном отделе пищевода — с наличием нескольких типов метаплазии и их мозаичным сочетанием даже в пределах одного биопсированного фрагмента. В то время как Американская ассоциация гастроэнтерологов настаивает на том, что для постановки диагноза «пищевод Барретта» обязательно выявление кишечной метаплазии в биоптатах из участка метаплазии слизистой оболочки дистального отдела пищевода [1], Британское общество гастроэнтерологов (BSG) называет пищеводом Барретта любой тип цилиндроклеточной метаплазии (ЦМ), распространяющийся выше 1 см от уровня гастроэзофагеального перехода (ГЭП) [2]. По Международному консенсусу BOV CAT (2015), пищеводом Барретта называют любой тип ЦМ слизистой оболочки дистального отдела пищевода, но с обязательным указанием в гистологическом заключении типа метаплазии [3].

Определение ПБ, данное BSG, нашло немало сторонников и стало достаточно популярным, но не изменило биологической сути заболевания. Вот почему биоптаты, взятые на расстоянии < 1 см от ГЭП, нуждаются в особенно тщательном сопоставлении эндоскопической картины и морфологических данных [4].

В дистальном отделе пищевода выделяют кардиальную, фундальную и кишечную метаплазию слизистой оболочки. Кардиальную метаплазию чаще можно встретить в коротком сегменте ПБ, это наиболее раннее метапластическое изменение пищевода в условиях ГЭРБ. При кардиальной метаплазии эпителий соответствует фовеолярному. При фундальной метаплазии добавляются элементы, характерные для слизистой оболочки тела желудка — главные и париетальные клетки. При кишечной метаплазии бокаловидные клетки в железах перемежаются с клетками фовеолярного типа. Иногда в биоптатах ПБ с кишечной метаплазией можно найти клетки Панета [5].

У одного и того же пациента в биоптатах пищевода можно встретить различные типы ЦМ. При этом, как правило, кишечную метаплазию выявляют более проксимально в сегменте ПБ, а кардиальную и фундальную метаплазию — ближе к ГЭП. Обнаружено, что кишечная метаплазия встречается в два раза чаще в биопсиях из проксимальных отделов ПБ по сравнению с биопсиями, взятыми из пищевода-желудочного соединения [6].

Патогенез ЦМ пищевода в настоящее время связывают либо с трансдифференцировкой многослойного плоского эпителия, либо с транскоммитированием клеток-предшественников под действием рефлюкса в условиях заживления повреждения [7].

Частота обнаружения бокаловидных клеток связана с градиентом pH вдоль сегмента ПБ: чем ниже pH (т. е., чем ближе к ГЭП), тем реже и в меньшем количестве выявляют бокаловидные клетки. Это связано, по всей видимости, с градиентом растворимости желчных кислот, который обусловлен значением pH: при низком pH ближе к ГЭП растворимость билиарных кислот минимальна, при средних значениях pH в проксимальном сегменте

ПБ растворимость билиарных кислот повышается [8]. В исследовании на крысах показана патогенетическая роль желчных кислот в развитии ПБ с кишечной метаплазией и экспрессией CDX2 и MUC2 [9].

Показано также, что кардиальные клетки могут подвергаться ранней энтерализации, т. е., сохраняя морфологию кардиальных клеток, экспрессировать маркеры кишечной дифференцировки: villin и CDX2 [10].

Ведутся дискуссии о том, является ли роль бокаловидных клеток исключительной при канцерогенезе в дистальном отделе пищевода или другие типы ЦМ тоже могут вносить свой вклад в развитие дисплазии и аденокарциномы пищевода. Эпидемиологические данные указывают на то, что частота опухолевой прогрессии выше у пациентов с кишечной метаплазией (0,38% в год) по сравнению с пациентами, у которых в биопсиях не выявлена кишечная метаплазия (0,07% в год) [11]. В другом эпидемиологическом исследовании, где длительность динамического наблюдения за пациентами составила 8–20 лет, такой закономерности не найдено [12]. Показано, что более чем у 70% пациентов с небольшими по размерам (до 2 см) аденокарциномами пищевода предшествующим изменением была цилиндрическая метаплазия пищевода, но не кишечного, а кардиального типа, которую обнаруживали вокруг участков аденокарциномы в биопсиях пищевода [13]. Эти данные подтверждены и другими авторами [14], обнаружившими желудочный фенотип (экспрессию MUC5A и MUC6) при миниатюрных размерах опухоли (< 5 мм). Кроме того, малигнизация может происходить в эпителии ПБ кардиального типа без бокаловидных клеток и без экспрессии CDX2 [15]. В то же время высокая плотность бокаловидных клеток может играть защитную роль и снижает риск развития аденокарциномы [16, 17]. Вероятно, в дистальном отделе пищевода существует два независимых пути канцерогенеза: фовеолярный и кишечный, т. е. с участием метаплазии как желудочного, так и кишечного типа [18–20]. Определить тип канцерогенеза можно при помощи иммуногистохимического исследования на основании экспрессии желудочных (MUC1, MUC5A и MUC6) и кишечных (MUC 2, CD10, CDX2, villin и др.) маркеров.

Протяженность сегмента метаплазии дистального отдела пищевода > 1 см от уровня ГЭП, которая по определению BSG необходима для диагностики ПБ, — все шире используемый, но довольно условный критерий. Данные об участии в канцерогенезе пищевода ЦМ длиной < 1 см по-прежнему противоречивы.

Целью нашего исследования было провести сравнительный морфологический анализ ЦМ пищевода, протяженностью < 1 см от уровня ГЭП (так называемого ультракороткого сегмента ПБ), классического ПБ с наличием бокаловидных клеток и ЦМ > 1 см от ГЭП с определением относительной частоты различных типов метаплазии, частоты реактивных изменений эпителия (так называемой неопределенной степени дисплазии) и дисплазии метаплазированного эпителия пищевода, а также выполнить иммуногистохимическое исследование фрагментов ПБ с разными типами метаплазии при наличии или отсутствии дисплазии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Городской клинической больницы № 31 в период с 1 января 2018 г. по 1 сентября 2019 г. В исследование были включены пациенты с

ГЭРБ, проходившие обследование в ГКБ № 31. Критерии включения пациентов: эндоскопически обнаруженные участки цилиндрической метаплазии пищевода любой протяженности, подтвержденные затем морфологически. Материалом исследования послужили биопсированные фрагменты слизистой оболочки дистального отдела пищевода, полученные при ЭГДС у 92 пациентов с ГЭРБ: у 42 пациентов с ПБ, 24 пациентов с ЦМ > 1 см от ГЭП (с протяженностью участков метаплазии от C0M1,5 до C13M14) и 26 пациентов с эндоскопическими признаками ЦМ < 1 см от ГЭП (C0M0,3–0,8). Критерии исключения: отсутствие цилиндрической метаплазии в биоптатах при морфологическом исследовании; отсутствие в биоптатах дериватов пищевода (многослойный плоский эпителий, железы собственной пластинки слизистой пищевода и их протоки), особенно при ультракоротком сегменте ПБ, что не позволяло с уверенностью утверждать, что материал получен из пищевода, а не из желудка. В группе ЦМ < 1 см от ГЭП средний возраст пациентов составил $55,50 \pm 1,10$ лет (22–82 года), среди них 11 мужчин (средний возраст $50,09 \pm 18,03$) и 15 женщин ($59,47 \pm 14,57$), соотношение мужчин и женщин 1 : 1,36. Группа пациентов с ЦМ > 1 см от ГЭП представлена 24 пациентами в возрасте 19–94 лет (средний возраст $52,21 \pm 18,00$ лет), среди них 7 мужчин (средний возраст $47 \pm 20,05$) и 17 женщин (средний возраст $53,5 \pm 17,47$), соотношение мужчин и женщин приблизительно 1 : 2,4. Группа пациентов с ПБ представлена 42 пациентами в возрасте 19–93 лет (средний возраст $61,80 \pm 16,33$), из них 29 мужчин (средний возраст $54,47 \pm 21,79$) и 13 женщин ($69,23 \pm 13,57$), соотношение мужчин и женщин 2,23 : 1. Как тенденция у пациентов с ЦМ < 1 см и > 1 см от ГЭП прослеживается более молодой возраст по сравнению с пациентами с ПБ, однако статистически значимые различия не выявлены. Как в группах ЦМ пищевода < 1 см, так и при ЦМ > 1 см от ГЭП и при ПБ средний возраст у мужчин был несколько меньше, чем у женщин, поскольку мужской пол — один из факторов риска развития ГЭРБ.

Фоновыми заболеваниями, которые предрасполагали к развитию ЦМ дистального отдела пищевода и ПБ, являлись аксиальная хиатальная грыжа и недостаточность кардии. Так, у 14 из 26 пациентов (53,8%) с эндоскопическими признаками ЦМ < 1 см выявлена эндоскопическая картина аксиальной хиатальной грыжи, еще у 3 (11,5%) — признаки недостаточности кардии при отсутствии хиатальной грыжи. У 11 пациентов (45,83%) с ЦМ > 1 см от ГЭП при ЭГДС найдена хиатальная грыжа, а у 3 (12,5%) —

недостаточность кардии. У 18 пациентов (42,86%) с ПБ выявлены эндоскопические признаки хиатальной грыжи, еще у 6 (14,29%) признаки недостаточности кардии.

Биопсированные фрагменты пищевода после стандартной обработки и получения гистологических срезов окрашивали гематоксилином и эозином, а также Шифф-реактивом в сочетании с альфидиновым синим. Вторая окраска помогает достоверно выявить бокаловидные клетки, а также различить бокаловидные и дистрофически измененные псевдобокаловидные клетки. Псевдобокаловидные клетки выявлены в 88,04% всех наблюдений.

В наблюдениях с кишечной метаплазией проводили морфометрический подсчет плотности бокаловидных клеток в железах: при наличии бокаловидных клеток, занимающих < 5% от всех эпителиоцитов в железах, пациентов относили к подгруппе с единичными бокаловидными клетками; если бокаловидные клетки занимали от 5 до 50%, пациентов относили к подгруппе с низкой плотностью бокаловидных клеток; когда бокаловидные клетки занимали > 50%, пациентов относили к подгруппе с высокой плотностью бокаловидных клеток.

В биопсированных фрагментах у всех пациентов с ЦМ < 1 см определяли структуры, характерные для слизистой оболочки пищевода: многослойный плоский эпителий — у 20 пациентов (76,92%), железы пищевода — у 19 пациентов (73,07%), выводные протоки желез слизистой пищевода — у 5 пациентов (19,23%). Выявление этих морфологических структур помогало определить, что материал взят из дистального отдела пищевода, а не из желудка. Фрагменты, в которых отсутствовали характерные структуры слизистой пищевода, не учитывали при анализе материала.

В 24 наблюдениях ПБ и ЦМ > 1 см от ГЭП проводили иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами к MUC1 (1 : 100, Ventana; Roche), MUC2 (1 : 125, Ventana; Roche), MUC5A (1 : 250, Ventana; Roche), MUC6 (готовые антитела Ventana; Roche), CDX2 (1 : 125, Ventana; Roche) и виллину (готовые антитела; Leica).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При ЦМ < 1 см от ГЭП выявляли различные типы метаплазии: кардиальную, фундальную и кишечную. В группе пациентов с ЦМ пищевода < 1 см (рис. 1) только кардиальная метаплазия была определена в 7 случаях (26,92%), фундальная — в 4 случаях (15,38%).

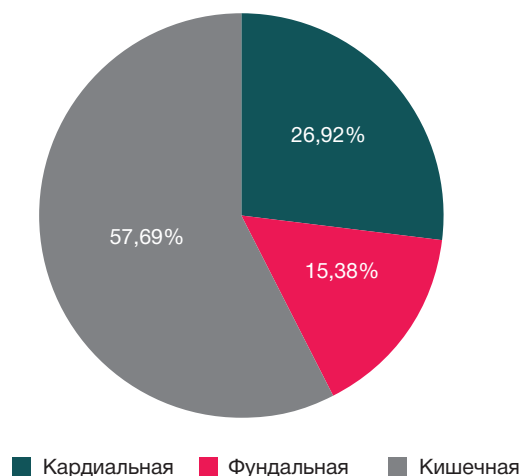


Рис. 1. Распространенность разных типов метаплазии при ЦМ < 1 см над ГЭП



Рис. 2. Относительное число бокаловидных клеток при ЦМ < 1 см от ГЭП

У 15 пациентов (57,69%) выявлена кишечная метаплазия с разной относительной плотностью бокаловидных клеток (рис. 2): у 5 пациентов (33,33%) наблюдали единичные бокаловидные клетки, у 8 пациентов (53,33%) — низкую плотность бокаловидных клеток (от 10 до 49%), у 2 (13,33%) — высокую плотность бокаловидных клеток (50 и 70% бокаловидных клеток в железах). Мозаичное сочетание трех типов метаплазии обнаружено в образцах биопсии 6 пациентов (23,07%). Во всех биопсированных фрагментах дистального отдела пищевода фоновым процессом был эзофагит, при этом воспалительная инфильтрация была умеренной (в 69,23% случаев) и выраженной (в 30,77% случаев), с наличием в образцах биопсии у 8 пациентов (30,77%) эрозий слизистой оболочки метаплазированного пищевода и язвенного дефекта у 1 пациента. У 9 пациентов (34,62%) на фоне выраженного воспаления выявлены реактивные изменения эпителия желез (так называемая дисплазия неопределенной степени), характеризующиеся иррегулярным расположением и сближенностью желез, их угловатостью, легким укрупнением и гиперхромией части ядер, единичными митозами. В 2 наблюдениях реактивные изменения эпителия были обнаружены при кардиальной метаплазии слизистой пищевода, в 6 случаях — при кишечной метаплазии с низким содержанием бокаловидных клеток, в 1 — с высоким содержанием бокаловидных клеток. Ни в одном из фрагментов пищевода при ЦМ < 1 см не обнаружена low-grade или high-grade дисплазия.

В группе ЦМ > 1 см от ГЭП кардиальная метаплазия выявлена в 14 из 24 наблюдений (58,33%) и фундальная — в 10 наблюдениях (41,67%). В группу пациентов с ПБ вошло 42 пациента с кишечной метаплазией. Если объединить группы ЦМ > 1 см от ГЭП и ПБ, соотношение типов метаплазии получится следующим (рис. 3): кардиальная метаплазия — 14 наблюдений из 66 (21,21%), фундальная — 10 (15,15%), кишечная — 42 (63,64%), мозаичное сочетание трех типов метаплазии обнаружено в образцах биопсии 8 пациентов с ПБ (12,12%). В группе пациентов с ПБ (42 наблюдения с кишечной метаплазией; рис. 4) единичные бокаловидные клетки выявлены в 8 случаях (18,18%), низкая плотность бокаловидных клеток — в 15 случаях (43,09%), высокая плотность бокаловидных клеток — в 21 случае (47,73%).

Таким образом, кишечную метаплазию в образцах биопсии объединенной группы пациентов с ЦМ > 1 см от ГЭП и ПБ выявляли несколько чаще, чем при ЦМ дистального

отдела пищевода на расстоянии < 1 см от ГЭП (в 63,64 и 57,69% наблюдений соответственно; рис. 5). При этом при ПБ в 3,5 раза чаще, чем при ЦМ < 1 см от ГЭП обнаружена высокая плотность бокаловидных клеток (рис. 6).

Признаки эзофагита с умеренной воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и плазмócитами были определены у 16 пациентов с цилиндроклеточной метаплазией > 1 см от ГЭП (66,67%), а признаки выраженного воспаления — у 8 пациентов (33,33%), у 11 пациентов выявлены эрозии метаплазированного пищевода (45,83%), из них у 1 пациента обнаружены участки изъязвления. Реактивные изменения выявлены у 5 пациентов с цилиндроклеточной метаплазией (20,83%): у 3 — с кардиальной метаплазией и у 2 — с фундальной. У одного пациента выявлена high-grade дисплазия метаплазированного сегмента на фоне кардиальной метаплазии (4,2%).

Признаки эзофагита с умеренной воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и плазмócитами найдены у 18 пациентов с ПБ (42,86%), а признаки выраженного воспаления — у 26 пациентов (57,14%); у 27 пациентов выявлены эрозии метаплазированного пищевода (64,29%), из них у 4 пациентов — участки изъязвления. У пациентов с ПБ эрозии обнаруживали в 2,1 раза чаще, чем при ЦМ < 1 см от ГЭП, и в 1,4 раза чаще, чем у пациентов с ЦМ > 1 см от ГЭП. При этом реактивные изменения эпителия наблюдали у 15 пациентов (35,71%). Таким образом, реактивные изменения эпителия желез определяли почти одинаково часто при ПБ и ЦМ < 1 см от ГЭП и в 1,7 раза реже при ЦМ > 1 см от ГЭП без кишечной метаплазии. Реактивные изменения эпителия были обнаружены достоверно чаще в группе пациентов с ПБ по сравнению с группой ЦМ > 1 см от ГЭП (при использовании критерия Манна-Уитни, $p < 0,05$). Реактивные изменения выявляли одинаково часто при различной плотности бокаловидных клеток (в наблюдениях с единичными бокаловидными клетками, с низким числом бокаловидных клеток и высоким числом бокаловидных клеток). Реактивные изменения во всех случаях были связаны с тяжестью воспаления (при использовании критерия Манна-Уитни, $p < 0,05$).

При ЦМ < 1 см от ГЭП наблюдения с low-grade и high-grade дисплазией отсутствовали, при ПБ low-grade дисплазия (рис. 7А) диагностирована в 8 наблюдениях (19,05 %), из них 6 случаев — с высокой плотностью бокаловидных клеток и 2 — с единичными бокаловидными клетками, а при ЦМ > 1 см от ГЭП выявлен один случай с high-grade дисплазией (4,2% наблюдений; рис. 7Б).

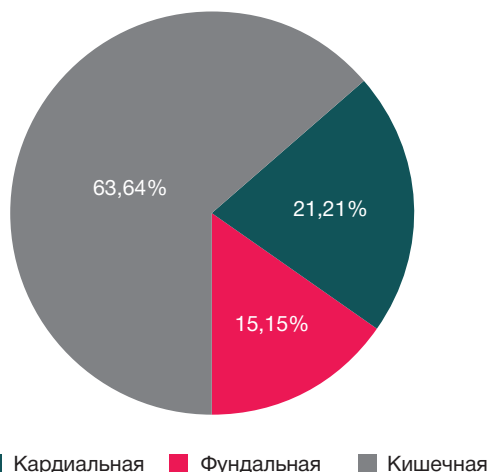


Рис. 3. Распространенность разных типов ЦМ при протяженности сегмента > 1 см от ГЭП, включая ПБ



Рис. 4. Относительное число бокаловидных клеток при ПБ

В 8 наблюдениях ЦМ > 1 см от ГЭП и 16 наблюдениях ПБ произведено иммуногистохимическое исследование с маркерами кишечной (MUC2, CDX2, виллин) и желудочной (MUC1, MUC5A, MUC6) дифференцировки. При кардиальной и фундальной метаплазии слизистой оболочки пищевода наблюдали насыщенную диффузную экспрессию MUC5A в цитоплазме поверхностного эпителия, неяркую диффузную экспрессию MUC1 в цитоплазме поверхностного эпителия, диффузную экспрессию MUC1, MUC5A и MUC6 в цитоплазме эпителия желез. Экспрессия MUC2 при кардиальной и фундальной метаплазии отсутствовала у всех пациентов. Очаговая экспрессия CDX2 при кардиальной и фундальной метаплазии выявлена у 5 пациентов (от единичных клеток до 30% площади фрагментов), а экспрессия виллина — во всех 8 случаях и занимала от 15–20 до 80% эпителия желез. Экспрессия кишечных маркеров (CDX2 и виллина) при кардиальной и фундальной метаплазии пищевода служит признаком субморфологической энтерализации. При ПБ с кишечной метаплазией во всех 16 случаях выявляли экспрессию кишечных маркеров (MUC 2, CDX2, виллин), которая в количественном отношении зависела от плотности бокаловидных клеток: цитоплазматическая экспрессия MUC2 занимала 10–50% клеток, ядерная экспрессия CDX2 составляла 10–90% эпителиальных клеток, включая цилиндрический эпителий желез, имеющий морфологию кардиального типа, цитоплазматическая экспрессия виллина обнаружена в 70–100% клеток эпителия желез. Поскольку бокаловидные клетки в метаплазированном эпителии ПБ располагаются между клетками фовеолярного типа, при кишечной метаплазии также выявляется экспрессия желудочных маркеров — MUC1, MUC5A и MUC6, которая, как правило, несколько слабее, чем при кардиальной метаплазии и занимает меньшую протяженность.

При иммуногистохимическом исследовании фрагментов ПБ с low-grade дисплазией диагностирована выраженная экспрессия MUC2, CDX2 и виллина, а также слабая экспрессия MUC1, MUC5A и MUC6, в 1 наблюдении high-grade дисплазии на фоне кардиальной метаплазии выявлена экспрессия MUC1, MUC5A, MUC6 и виллина при негативной экспрессии MUC2 и CDX2.

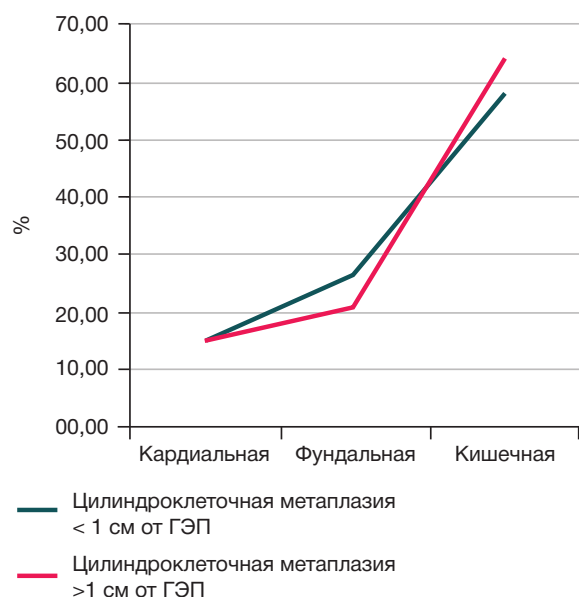


Рис. 5. Относительная частота различных типов метаплазии при ЦМ < 1 см и > 1 см от ГЭП

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании проведен сравнительный морфологический анализ биоптатов ЦМ < 1 см от ГЭП, ЦМ > 1 см от ГЭП и ПБ. Интересно, что половой состав выборки пациентов с ЦМ > 1 см от ГЭП и ПБ отличался почти зеркально: соотношение мужчин и женщин при ЦМ > 1 см от ГЭП составило 1 : 2,4, а при ПБ — 2,23 : 1. Средний возраст у мужчин во всех группах был несколько меньше, чем у женщин, поскольку мужской пол — один из факторов риска развития ГЭРБ. Считается, что кардиальная метаплазия является самым ранним типом ЦМ пищевода при ГЭРБ. И действительно, в нашем исследовании только кардиальная метаплазия выявлялась несколько чаще при ЦМ < 1 см (26,92%), чем при длине метаплазированного сегмента C0M1,5–C13M14 (21,21%). При длине метаплазированного сегмента пищевода > 1 см от ГЭП бокаловидные клетки обнаруживались чаще: при этом высокую плотность бокаловидных клеток при ПБ наблюдали в 3,5 раза чаще, чем при ЦМ < 1 см. По литературным данным, частота выявления бокаловидных клеток увеличивается с возрастанием длины метаплазированного сегмента пищевода [6]. Целью нашего дальнейшего исследования станет выявление взаимосвязи между длиной сегмента ПБ, частотой обнаружения бокаловидных клеток и их плотностью.

Реактивные изменения эпителия были обнаружены достоверно чаще в группе пациентов с ПБ по сравнению с группой > 1 см от ГЭП и были связаны с тяжестью воспаления (при использовании критерия Манна–Уитни, $p < 0,05$). При ПБ дисплазию выявляли значительно чаще (в 19,05% наблюдений), чем при ЦМ > 1 см от ГЭП (4,2% наблюдений). В наблюдениях с low-grade дисплазией при ПБ выявляли выраженную экспрессию кишечных (MUC2, CDX2 и виллина) и более слабую экспрессию желудочных (MUC1, MUC5A и MUC6) маркеров, что соответствует смешанному фенотипу с преобладанием кишечного [13, 14, 18–20]. В единственном наблюдении high-grade дисплазии при ЦМ > 1 см от ГЭП найдены яркая экспрессия MUC1, MUC5A, MUC6 и виллина и отрицательная экспрессия MUC2 и CDX2, что свидетельствует о кардиальном фенотипе. Таким образом, мы наблюдали как кишечный

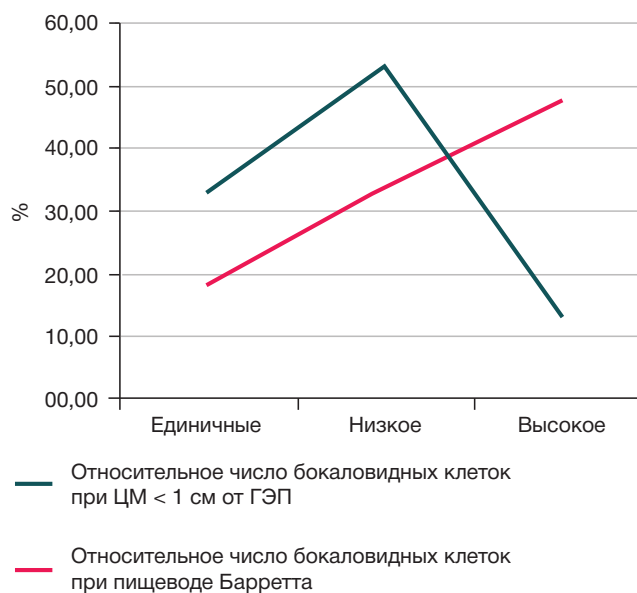


Рис. 6. Относительное число бокаловидных клеток при ЦМ < 1 см от ГЭП и при ПБ

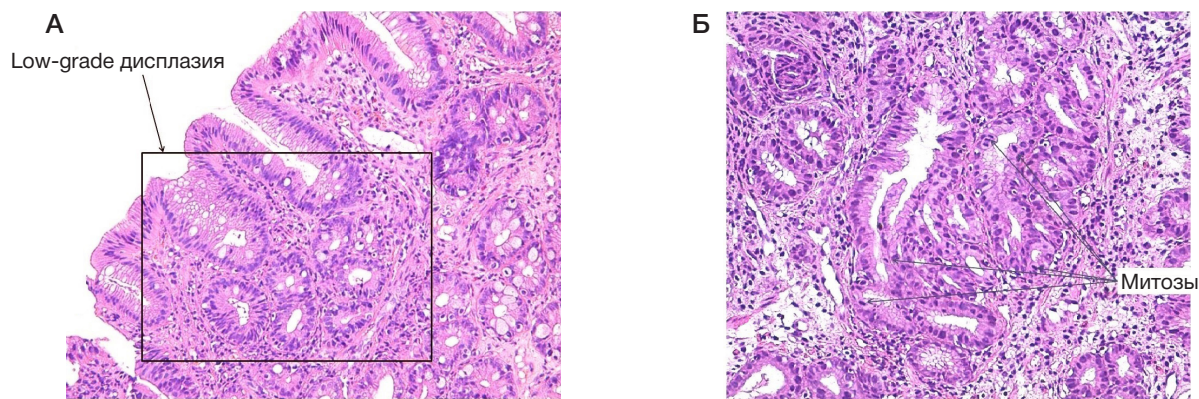


Рис. 7. А. Low-grade дисплазия пищевода при ПБ. **Б.** High-grade дисплазия пищевода при ЦМ > 1 см от ГЭП. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 200$

(при ПБ), так и фовеолярный (при ЦМ пищевода > 1 см от ГЭП) пути канцерогенеза, однако кишечный путь в нашей выборке по распространенности преобладал, несмотря на миниатюрные размеры участков дисплазии (до 2 мм).

Предполагается, что высокая плотность бокаловидных клеток может иметь протективное значение: при высокой плотности бокаловидных клеток дисплазия встречается реже [16, 17]. В нашей выборке low-grade дисплазия выявлена в 6 из 8 случаев (75%) при высокой плотности бокаловидных клеток в окружающей слизистой пищевода. Это может быть связано с небольшим числом наблюдений low-grade дисплазии в нашем исследовании. Необходимо продолжить исследование для более объективной оценки морфологических особенностей ПБ при наличии дисплазии, а также определить группу риска пациентов в отношении ее развития.

ВЫВОДЫ

Для оценки образцов биопсии из ультракороткого сегмента ПБ особое значение имеет прицельный и

точный забор материала. Этот диагноз можно установить только при выявлении в биоптатах морфологически четко определяемых структур метаплазированного эпителия ПБ с наличием дериватов пищевода (многослойного плоского эпителия, выводных протоков и желез слизистой). При сравнительном морфологическом анализе реактивные изменения эпителия выявляли достоверно чаще при ПБ по сравнению с группой ЦМ > 1 см от ГЭП ($p < 0,05$ при использовании критерия Манна-Уитни), а в группе ЦМ < 1 см от ГЭП — чаще при наличии бокаловидных клеток. Наличие реактивных изменений эпителия было связано с тяжестью эзофагита. Истинная дисплазия выявлена в 8 наблюдениях с ПБ (low-grade дисплазия — 19,05% наблюдений) и в 1 наблюдении ЦМ пищевода > 1 см от ГЭП (high-grade дисплазия — 4,2% наблюдений). При иммуногистохимическом исследовании с маркерами желудочной и кишечной дифференцировки признаки субморфологической энтерализации выявлены во всех фрагментах пищевода с кардиальной и фундальной метаплазией и у пациентов с ПБ в зонах с отсутствием бокаловидных клеток.

Литература

1. Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB. ACG clinical guideline: diagnosis and management of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2016; 111 (1): 30–50. PubMed PMID: 26526079.
2. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragunath K, Ang Y, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut.* 2014; (63): 7–42. PubMed PMID: 24165758.
3. Bennett C, Moayyedi P, Corley DA, DeCaestecker J et al. BOB CAT: A Large-Scale Review and Delphi Consensus for Management of Barrett's Esophagus With No Dysplasia, Indefinite for, or Low-Grade Dysplasia. *Am J Gastroenterol.* 2015; (110): 662–82. PubMed PMID: 25869390.
4. Montgomery EA, Canto MI, Srivastava A. Evaluation and reporting of biopsies from the columnar-lined esophagus and gastro-esophageal junction (GEJ). *Ann Diagn Pathol.* 2019; (39): 111–7. PubMed PMID: 30802810.
5. Biswas S, Quante M, Leedham S, Jansen M. The metaplastic mosaic of Barrett's esophagus Virchows Archiv. 2018; (472): 43–54. PubMed PMID: 29500519.
6. Harrison R, Perry I, Haddadin W, McDonald S, et al. Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies. *Am J Gastroenterol.* 2007; (102): 1154–61. PubMed PMID: 17433019.
7. Que J, Garman KS, Souza RF, Spechler SJ. Pathogenesis and Cells of Origin of Barrett's Esophagus. *Gastroenterology.* 2019; 157 (2): 349–64. PubMed PMID: 31082367.
8. Theodorou D, Ayazi S, DeMeester SR, Zehetner J, et al. Intraluminal pH and goblet cell density in Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg.* 2012; (16): 469–74. PubMed PMID: 22095525.
9. Sun D, Wang X, Gai Z, Song X, Jia X, Tian H. Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophagus. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8 (2): 1384–92. PMID: 25973022.
10. Hahn HP, Blount PL, Ayub K, Das KM, et al. Intestinal differentiation in metaplastic, nongoblet columnar epithelium in the esophagus. *Am J Surg Pathol.* 2009; (33): 1006–15. PubMed PMID: 19363439.
11. Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. 2011; *J Natl Cancer Inst.* 103 (13): 1049–57. PubMed PMID: 21680910.
12. Kelly CJ, Gough MD, Van Wyk Q, Stephenson TJ, Ackroyd R. Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42 (11): 1271–4. PubMed PMID: 17852872.
13. Takubo K, Aida J, Naomoto Y, et al. Cardiac rather than intestinal type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2009; 40 (1): 65–74. PubMed PMID: 18755496.

14. Watanabe G, Ajioka Y, Takeuchi M, Annenkov A, Kato T, et al. Intestinal metaplasia in Barrett's oesophagus may be an epiphenomenon rather than a preneoplastic condition, and CDX2-positive cardiac-type epithelium is associated with minute Barrett's tumour. *Histopathology*. 2015; 66 (2): 201–14. PubMed PMID: 25040564.
15. Lavery DL, Martinez P, Gay LJ, Cereser B, et al. Evolution of oesophageal adenocarcinoma from metaplastic columnar epithelium without goblet cells in Barrett's oesophagus. *Gut*. 2016; 65 (6): 907–13. PubMed PMID: 26701877.
16. Schellnegger R, Quante A, Rospleszcz S, Schernhammer M, et al. Goblet cell ratio in combination with differentiation and stem cell markers in Barrett esophagus allow distinction of patients with and without esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res. (Phila)*. 2017; 10 (1): 55–66. PubMed PMID: 27807078.
17. Srivastava A, Golden KL, Sanchez CA, Liu K, et al. High goblet cell count is inversely associated with ploidy abnormalities and risk of adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133403. PubMed PMID: 26230607.
18. Agoston AT, Srivastava A, Zheng Y, et al. Prevalence and concordance of subtypes of dysplasia in patients with Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2014; (27): 162a–162a.
19. Demicco EG, Farris AB, Baba Y, Agbor-Etang B, et al. The dichotomy in carcinogenesis of the distal esophagus and esophagogastric junction: intestinal-type vs cardiac-type mucosa-associated adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2011; (24): 1177–90. PubMed PMID: 21572404.
20. Khor TS, Alfaro EE, Ooi EM, Li Y, et al. Divergent expression of MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10, and CDX-2 in dysplasia and intramucosal adenocarcinomas with intestinal and foveolar morphology: Is this evidence of distinct gastric and intestinal pathways to carcinogenesis in Barrett esophagus? *Am J Surg Pathol*. 2012; (36): 331–42. PubMed PMID: 22261707.

References

1. Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB. ACG clinical guideline: diagnosis and management of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2016; 111 (1): 30–50. PubMed PMID: 26526079.
2. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragunath K, Ang Y, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut*. 2014; (63): 7–42. PubMed PMID: 24165758.
3. Bennett C, Moayyedi P, Corley DA, DeCaestecker J et al. BOB CAT: A Large-Scale Review and Delphi Consensus for Management of Barrett's Esophagus With No Dysplasia, Indefinite for, or Low-Grade Dysplasia. *Am J Gastroenterol*. 2015; (110): 662–82. PubMed PMID: 25869390.
4. Montgomery EA, Canto MI, Srivastava A. Evaluation and reporting of biopsies from the columnar-lined esophagus and gastro-esophageal junction (GEJ). *Ann Diagn Pathol*. 2019; (39): 111–7. PubMed PMID: 30802810.
5. Biswas S, Quante M, Leedham S, Jansen M. The metaplastic mosaic of Barrett's oesophagus *Virchows Archiv*. 2018; (472): 43–54. PubMed PMID: 29500519
6. Harrison R, Perry I, Haddadin W, McDonald S, et al. Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies. *Am J Gastroenterol*. 2007; (102): 1154–61. PubMed PMID: 17433019.
7. Que J, Garman KS, Souza RF, Spechler SJ. Pathogenesis and Cells of Origin of Barrett's Esophagus. *Gastroenterology*. 2019; 157 (2): 349–64. PubMed PMID: 31082367.
8. Theodorou D, Ayazi S, DeMeester SR, Zehetner J, et al. Intraluminal pH and goblet cell density in Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg*. 2012; (16): 469–74. PubMed PMID: 22095525.
9. Sun D, Wang X, Gai Z, Song X, Jia X, Tian H. Bile acids but not acidic acids induce Barrett's esophagus. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8 (2): 1384–92. PMID: 25973022.
10. Hahn HP, Blount PL, Ayub K, Das KM, et al. Intestinal differentiation in metaplastic, nongoblet columnar epithelium in the esophagus. *Am J Surg Pathol*. 2009; (33): 1006–15. PubMed PMID: 19363439.
11. Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. 2011; *J Natl Cancer Inst*. 103 (13): 1049–57. PubMed PMID: 21680910.
12. Kelty CJ, Gough MD, Van Wyk Q, Stephenson TJ, Ackroyd R. Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42 (11): 1271–4. PubMed PMID: 17852872.
13. Takubo K, Aida J, Naomoto Y, et al. Cardiac rather than intestinal type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2009; 40 (1): 65–74. PubMed PMID: 18755496.
14. Watanabe G, Ajioka Y, Takeuchi M, Annenkov A, Kato T, et al. Intestinal metaplasia in Barrett's oesophagus may be an epiphenomenon rather than a preneoplastic condition, and CDX2-positive cardiac-type epithelium is associated with minute Barrett's tumour. *Histopathology*. 2015; 66 (2): 201–14. PubMed PMID: 25040564.
15. Lavery DL, Martinez P, Gay LJ, Cereser B, et al. Evolution of oesophageal adenocarcinoma from metaplastic columnar epithelium without goblet cells in Barrett's oesophagus. *Gut*. 2016; 65 (6): 907–13. PubMed PMID: 26701877.
16. Schellnegger R, Quante A, Rospleszcz S, Schernhammer M, et al. Goblet cell ratio in combination with differentiation and stem cell markers in Barrett esophagus allow distinction of patients with and without esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res. (Phila)*. 2017; 10 (1): 55–66. PubMed PMID: 27807078.
17. Srivastava A, Golden KL, Sanchez CA, Liu K, et al. High goblet cell count is inversely associated with ploidy abnormalities and risk of adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133403. PubMed PMID: 26230607.
18. Agoston AT, Srivastava A, Zheng Y, et al. Prevalence and concordance of subtypes of dysplasia in patients with Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2014; (27): 162a–162a.
19. Demicco EG, Farris AB, Baba Y, Agbor-Etang B, et al. The dichotomy in carcinogenesis of the distal esophagus and esophagogastric junction: intestinal-type vs cardiac-type mucosa-associated adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2011; (24): 1177–90. PubMed PMID: 21572404.
20. Khor TS, Alfaro EE, Ooi EM, Li Y, et al. Divergent expression of MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10, and CDX-2 in dysplasia and intramucosal adenocarcinomas with intestinal and foveolar morphology: Is this evidence of distinct gastric and intestinal pathways to carcinogenesis in Barrett esophagus? *Am J Surg Pathol*. 2012; (36): 331–42. PubMed PMID: 22261707.

ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДОМА У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ВЕРОЯТНОСТЬЮ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ

А. А. Рогожина^{1,2}, Л. О. Минушкина¹ ✉, А. В. Алесенко³, У. А. Гутнер³, М. А. Шупик³, И. Н. Курочкин³, О. А. Малошицкая⁴, С. А. Соколов⁴, Д. А. Затеишчиков^{1,2}

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

² Городская клиническая больница № 51, Москва, Россия

³ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Разработка современных методов оценки метаболома, таких как хромато-масс-спектрометрия, позволяет существенно расширить представления о липидном обмене в конкретных клинических ситуациях. Целью исследования было изучить особенности липидома у больных с различной вероятностью семейной гиперхолестеринемии (СГХС). В исследовании приняли участие 35 пациентов — 15 мужчин (42,9%) и 20 женщин (57,1%) с дислипидемией или ранними сердечно-сосудистыми заболеваниями, развившимися в возрасте до 55 лет у мужчин и до 60 лет у женщин. Средний возраст пациентов составил $49,8 \pm 9,96$ лет. Вероятность семейной дислипидемии оценивали по критериям сети голландских липидных клиник. У 10 пациентов вероятность СГХС оценивали как низкую (1–2 балла), у 22 пациентов диагноз расценивали как вероятную СГХС (3–5 баллов). У 3 пациентов присутствовала возможная или определенная СГХС (2 пациента — 6 баллов, один пациент — 9 баллов). Определение молекулярных видов сфингомиелинов, церамидов и сфингоидных оснований (сфингозина, сфинганина), а также галактозоцерамида проводили методом хромато-масс-спектрометрии. Пациенты с определенной/вероятной СГХС имели достоверно более высокий уровень сфингозина по сравнению с пациентами с низкой клинической вероятностью СГХС ($144,36 \pm 107,863$ и $50,14 \pm 62,409$ нг/мл; $p = 0,01$). В случае семейной СГХС отмечали увеличение доли длинноцепочечного сфингомиелина SM 18 : 1/22 : 0 и существенное увеличение уровня церамидов с длинной углеродной цепью C 20 : 1 и C 22 : 1. Была выявлена значимая прямая корреляция уровня липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и сфингозина ($r = 0,344$; $p = 0,047$) наряду с обратными корреляциями уровня липопротеинов высокой плотности (ЛВП), сфинганина ($r = -0,52$; $p = 0,002$) и галактозилцерамида ($r = -0,56$; $p = 0,001$). Таким образом, у пациентов с высокой клинической вероятностью СГХС были выявлены изменения липидома, являющиеся маркерами риска сердечно-сосудистых осложнений.

Ключевые слова: атеросклероз, семейная гиперлипидемия, сфингомиелины, сфингозин, церамиды, маркеры риска

Финансирование: грант РФФИ 19-04-00870А «Сфинголипидомный анализ маркеров сердечно-сосудистых заболеваний».

Информация о вкладе авторов: А. А. Рогожина — отбор материала, сбор данных; Л. О. Минушкина — анализ полученных данных, написание статьи; Д. А. Затеишчиков — планирование работы, анализ данных, подготовка публикации; А. В. Алесенко — руководитель проекта; У. А. Гутнер, М. А. Шупик, О. А. Малошицкая и С. А. Соколов — пробоподготовка, проведение лабораторных исследований, анализ данных; И. Н. Курочкин — анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ГБУЗ «Городская клиническая больница № 51 ДЗМ» (протокол № 02/19 от 7 февраля 2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Минушкина Лариса Олеговна
Филевский б-р, 36–19, г. Москва, 121601; minushkina@mail.ru

Статья получена: 30.11.2019 **Статья принята к печати:** 18.12.2019 **Опубликована онлайн:** 26.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.090

LIPIDOME FEATURES IN PATIENTS WITH DIFFERENT PROBABILITY OF FAMILY HYPERCHOLESTEROLEMIA

Rogozhina AA^{1,2}, Minushkina LO¹ ✉, Alessenko AV³, Gutner UA³, Shupik MA³, Kurochkin IN³, Maloshitskaya OA⁴, Sokolov SA⁴, Zateyshchikov DA^{1,2}

¹ Central State Medical Academy under the Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow, Russia

² City Clinical Hospital № 51, Moscow, Russia

³ Institute for Biochemical Physics, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Development of modern methods for metabolome assessment, such as gas chromatography–mass spectrometry, allows one to expand the knowledge about the features of lipid metabolism in various clinical conditions. The study was aimed to investigate lipidome features in patients with different probability of family hypercholesterolemia (FH). The study involved 35 patients: 15 men (42.9%) and 20 women (57.1%) with dislipidemia or early cardiovascular diseases which manifested below 55 in men and 60 in women (average age of patients was 49.8 ± 9.96). The family dislipidemia probability was evaluated using the Dutch Lipid Clinic Network Score. In 10 patients the probability of FH was low (score 1–2), 22 patients had possible FH (score 3–5). Three patients had probable or definite FH (score 6 in 2 patients, score 9 in one patient). Determination of molecular species of sphingomyelins, ceramides and sphingoid bases (sphingosine, sphinganine) as well as galactosylceramide was carried out using gas chromatography–mass spectrometry. In patients with definite/probable FH the sphingosine level was significantly higher compared with patients having low probability of FH (144.36 ± 107.863 and 50.14 ± 62.409 ng/ml; $p = 0.01$). In patients with FH, an increase in the proportion of long chain sphingomyelin SM 18 : 1/22 : 0 as well as a significant increase in the level of long chain ceramides with C 20 : 1 and C 22 : 1 was determined. Positive correlation of low-density lipoproteins and sphingosine level ($r = 0.344$; $p = 0.047$) together with negative correlation of high-density lipoproteins (HDL), sphinganine ($r = -0.52$; $p = 0.002$), and galactosylceramide level ($r = -0.56$; $p = 0.001$) were detected. Thus, in patients with high probability of FH the lipidome changes were observed, which could be considered the cardiovascular risk markers.

Keywords: atherosclerosis, family hyperlipidemia, sphingomyelins, sphingosine, ceramides, risk marker

Funding: RFBR grant 19-04-00870A Sphingolipidome Analysis of Cardiovascular Diseases' Markers.

Author contribution: Rogozhina AA — sampling, data acquisition; Minushkina LO — data analysis, text writing; Zateyshchikov DA — planning, data analysis, manuscript writing; Alessenko AV — project manager; Gutner UA, Shupik MA, Maloshitskaya OA and Sokolov SA — sample preparation, laboratory analysis, data analysis; Kurochkin IN — data analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Local Ethics Committee of City Clinical Hospital № 51 (protocol № 02/19 dated February 7, 2019). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Larisa O. Minushkina
Filevsky Boulevard, 36–19, Moscow, 121601; minushkina@mail.ru

Received: 30.11.2019 **Accepted:** 18.12.2019 **Published online:** 26.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.090

Нарушения липидного обмена, в том числе наследственного характера — ключевой фактор риска атеросклероза и его осложнений. Разработка современных методов исследования метаболома, таких как хромато-масс-спектрометрия, позволяет существенно расширить представления об особенностях липидного обмена в различных клинических ситуациях.

Обнаружено, что значимую роль здесь могут играть сфинголипиды (такие как сфингомиелины, церамиды, сфингозин, сфинганин сфингозин-1-фосфат (С1Ф) и т. д.) [1]. Изменение соотношения различных сфинголипидов выявляют при некоторых метаболических, генетических и аутоиммунных заболеваниях (болезни Фабри, Ниманна-Пика, Гоше и др., некоторых видах эпилепсии, мигрени, болезни Альцгеймера).

Идет активное изучение особенностей липидома при сердечно-сосудистых заболеваниях. Показано прогностическое значение некоторых липидных фракций, преимущественно церамидов, при остром коронарном синдроме. В качестве возможных маркеров риска рассматривают соотношения церамидов С 16 : 0, С 20 : 0, С 24 : 1 и их отношения к С 24 : 0.

Прогностическую значимость церамидов оценивали в проспективных исследованиях. Уровень церамидов определяли у больных с острым коронарным синдромом [2]. Было обнаружено, что уровень сфингомиелинов, сфингозина, сфингозин-1-фосфата и церамида может существенно отличаться у больных с острыми и хроническими формами ИБС [3].

В то же время особенности липидома у больных с наследственными дислипидемиями не исследованы. Нет пока и убедительных данных о динамике уровня сфинголипидов и церамидов на фоне липидснижающей терапии, есть лишь единичные случаи сравнения уровня сфинголипидов у пациентов без терапии и на фоне липидснижающей терапии [4, 5].

Целью настоящего исследования было изучить особенности сфинголипидов у пациентов, имеющих различную клиническую вероятность семейной гиперлипидемии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Городской клинической больницы № 51 г. Москвы в марте–октябре 2019 г. В исследовании приняли участие 35 пациентов. В обследованной группе было 15 мужчин (42,9%) и 20 женщин (57,1%), средний возраст пациентов составил $49,8 \pm 9,96$ лет. Критерии включения: ранние проявления атеросклероза — ишемической болезни сердца, симптомного периферического атеросклероза или цереброваскулярной болезни с дебютом заболевания в возрасте до 55 лет у мужчин и до 60 лет у женщин и/или дислипидемиями (уровень ЛНП $> 4,9$ ммоль/л). Критерии исключения: острый инфаркт миокарда, острый инсульт, сахарный диабет, вторичные дислипидемии. В исследование не включали пациентов, получавших на момент обследования липидснижающую терапию.

У 16 пациентов на момент включения в исследование была артериальная гипертензия (45,7%), у 10 (28,6%) — ИБС, у одного пациента (2,9%) — симптомный периферический атеросклероз. Девятнадцать пациентов (54,3%) имели отягощенный по сердечно-сосудистым заболеваниям семейный анамнез. Девять пациентов (25,7%) курили ранее, но прекратили курение до включения в исследование,

8 пациентов курили на момент включения в исследование (22,9%).

Вероятность наличия семейной гиперхолестеринемии (СГХС) рассчитывали по шкале сети голландских липидных клиник. У 10 пациентов вероятность СГХС оценивали как низкую (1–2 балла), у 22 пациентов диагноз расценивали как вероятную СГХС (3–5 баллов). У 3 пациентов была возможная или определенная СГХС (2 пациента — 6 баллов, один пациент — 9 баллов).

Взятие крови для биохимического и масс-спектрометрического анализа осуществляли в день включения пациентов в исследование (утром натощак, после 12-часового голодания). Взятие крови проводили из кубитальной вены в стерильные пробирки типа «вакутейнер». Сыворотку получали путем центрифугирования крови на скорости 3000 об./мин в течение 15 мин. Определяли параметры со следующими референсными значениями: общий холестерин (ОХС, 2,0–5,2 ммоль/л), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП, до 3,3 ммоль/л), липопротеинов высокой плотности (ХС ЛВП, 0,91–1,56 ммоль/л), триглицеридов сыворотки крови (ТГ, 0,50–1,70 ммоль/л). Для определения параметров сыворотки использовали биохимический анализатор CLIMA MC-15 (RAL; Испания).

Липиды выделяли из плазмы по методу Блайя–Дайера [6]. Масс-спектрометрическое детектирование молекулярных видов сфингомиелинов, церамидов и сфингоидных оснований (сфингозина и сфинганина), а также галактозилцерамидов проводили с помощью прибора TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific; Германия) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) при давлении в ячейке соударений 1,5 мТорр. Разрешение на Q1 и Q3 составляло 1,2 Да.

Для церамидов фрагментацию исходных протонированных и дегидратированных молекул проводили при энергии 25 эВ до иона с отношением массы к заряду (m/z) 264,4 Да, время удержания составляло 25 мс.

Для сфингомиелинов фрагментацию исходных протонированных молекул проводили при энергии 25 эВ до иона с m/z 184,1 Да, время удержания составляло 25 мс.

Для сфингозина и его дейтерированного стандарта (d7, Avanti; США) фрагментацию протонированных молекул проводили при энергии 12,5 эВ до ионов с m/z 264,4 и 259,3 Да соответственно, время удержания составляло 25 мс. Для сфинганина фрагментацию исходной протонированной молекулы проводили при энергии 12,5 эВ до иона с m/z 266,4 Да, время удержания составляло 50 мс.

Для галактозилцерамида d18 : 1/18 : 0: ион $[M + H]^+$ с массой 728,5 Да.

Использовали следующие параметры источника ионизации: температура нагревателя 300 °С, температура капилляра 340 °С, поток газа завесы — 45 п.е. (приборные единицы), поток вспомогательного газа — 13 п.е., поток продувочного газа — 1 п.е.

В качестве стандартов использовали сфингозин d7, сфинганин, сфингомиелин d18 : 1/16 : 0, сфингомиелин d18 : 1/18 : 0, церамид d18 : 1/16 : 0, церамид d18 : 1/18 : 1, церамид d18 : 1/18 : 0, церамид d18 : 1/24 : 1, церамид d18 : 1/24 : 0, галактозилцерамид d18 : 1/18 : 0 (Avanti; США).

Хроматографическое разделение

Хроматографическое разделение проводили с использованием системы Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific; Германия) на колонке Eclipse Plus C8 3.0 × 150 мм

(Agilent; США), размер частиц 3,5 мкм. Температура составляла 50 °С, поток — 400 мкл/мин.

При определении сфингозина, церамидов и сфингомиелина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А — вода + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б — метанол + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты (0,7 мин 55% фазы Б, 100% фазы Б к 6, 7-й мин, 100% фазы Б до 12-й мин, 55% фазы Б от 13-й до 17-й мин, 55% фазы Б к 13-й мин).

При определении сфинганина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А — вода + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б — 50% метанол + 50% ацетонитрил + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты (1,5 мин 20% фазы Б, 100% фазы Б к 3, 2-й мин, 100% фазы Б до 6, 7-й мин, 20% фазы Б к 7, 7 мин, 20% фазы Б до 10-й мин).

Обработка данных

Относительное содержание церамидов оценивали по внешней калибровке (метод стандарта). В качестве калибранта использовали смесь церамидов Ceramide Porcine Brain 860052P (Avanti; США) с содержанием

церамида d18 : 1/18 : 0 50% и d18 : 1/24 : 1 20%. Вычисления проводили по сумме площадей пиков MMP-переходов $MH^+ \rightarrow m/z 264,4$ Да и $(MH-H_2O)^+ \rightarrow m/z 264,4$ Да.

Калибрантом для сфингомиелинов были смесь Sphingomyelin Porcine Brain 860062P (Avanti; США) и сфингомиелины d18 : 1/16 : 0, d18 : 1/18 : 0 (Avanti; США). Вычисление проводили по площадям пиков MRM-переходов $MH^+ \rightarrow m/z 184,1$ Да.

Содержание сфингозина d18 : 1 определяли по внутренней калибровке (метод внутреннего стандарта, стандарт D-erythro-sphingosine d7, Sigma; США) по площадям MMP-переходов ($m/z 300^+ \rightarrow m/z 264,4$ Да для недеитерированного и $m/z 307^+ \rightarrow m/z 259,3$ Да для дейтерированного сфингозина).

Содержание сфинганина d18:0 определяли по внешней калибровке (стандарт — DL-erythro-dihydrosphingosine, Sigma; США) по площадям MMP-переходов $m/z 302^+ \rightarrow m/z 266$ Да.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ SPSS, версия 23.0 (IBM; США). Количественные переменные представлены в виде

Таблица 1. Уровень липидов и сфинголипидов у пациентов с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии

Параметры	Низкая вероятность СГХС (n = 10)	Возможная СГХС (n = 22)	Вероятная/определенная СГХС (n = 3)	p
	1	2	3	
ОХС, ммоль/л	6,79 ± 0,627	8,04 ± 1,746	12,00 ± 5,344	0,006
ЛНП, ммоль/л	4,32 ± 0,45435	5,40 ± 0,973	7,24 ± 1,447	0,001
ЛВП, ммоль/л	1,52 ± 0,431	1,45 ± 0,457	1,15 ± 0,578	0,713
ТГ, ммоль/л	1,81 ± 1,123	2,46 ± 3,245	5,80 ± 6,141	0,240
Сфингозин, нг/мл	50,14 ± 62,409	83,59 ± 70,774	144,36 ± 107,863	0,051 *0,010 (группы 1 и 3)
Сфинганин, нг/мл	0,752 ± 0,3713	0,895 ± 0,5841	1,663 ± 1,4619	0,142
Галактозилцерамид, нг/мл	55,48 ± 29,867	66,60 ± 43,291	76,95 ± 25,626	0,473
Сфингомиелины				
SM 18 : 1/16 : 0, мкг/мл	18997,6 ± 13203,93	15407,2 ± 7769,07	9557,6 ± 2435,11	0,274
SM 18 : 1/16 : 1, мкг/мл	1893,9 ± 714,16	1861,1 ± 1642,95	2208,3 ± 1071,19	0,432
SM 18 : 1/18 : 0, мкг/мл	3646,2 ± 2447,91	3322,6 ± 1981,05	2392,6 ± 1758,81	0,629
SM 18 : 1/18 : 1, мкг/мл	6138,8 ± 4915,11	5605,4 ± 2747,14	7240,6 ± 3716,52	0,806
SM 18 : 1/20 : 0, мкг/мл	19573,6 ± 9198,49	22693,9 ± 15985,31	24874,3 ± 6191,24	0,525
SM 18 : 1/20 : 1, мкг/мл	55331,1 ± 34643,17	55612,7 ± 32720,49	45554,0 ± 17549,55	0,924
SM 18 : 1/22 : 0, мкг/мл	6484,3 ± 3692,833	7141,1 ± 2842,95	10927,6 ± 4151,37	0,028
SM 18 : 1/22 : 1, мкг/мл	407,4 ± 191,59	416,9 ± 211,78	478,6 ± 143,01	0,721
SM 18 : 1/24 : 0, мкг/мл	1759,7 ± 1613,16	2155,4 ± 1063,40	1728,0 ± 337,634	0,328
SM 18 : 1/24 : 1, мкг/мл	6095,1 ± 3364,35	4835,2 ± 2611,45	4711,3 ± 1018,43	0,569
Церамиды				
C 18 : 0, мкг/мл	3,70 ± 8,820	6,04 ± 9,740	0,018 ± 0,186	0,513
C 20 : 0, мкг/мл	224,70 ± 655,577	240,60 ± 431,668	367,67 ± 144,417	0,075
C 20 : 1, мкг/мл	85,10 ± 124,969	98,00 ± 229,133	698,67 ± 1138,155	0,019
C 22 : 0, мкг/мл	149,60 ± 347,728	75,96 ± 71,642	221,33 ± 170,365	0,100
C 22 : 1, мкг/мл	77,00 ± 82,254	60,80 ± 111,859	714,67 ± 1118,787	0,003
C 24 : 0, мкг/мл	587,80 ± 200,069	737,96 ± 354,259	782,00 ± 357,669	0,598
C 24 : 1, мкг/мл	206,20 ± 77,150	313,08 ± 254,952	465,67 ± 457,362	0,546
C 18 : 0/C 24 : 0, мкг/мл	0,0043 ± 0,00938	0,0079 ± 0,01275	0,0000 ± 0,00000	0,963
C 24 : 1/C 24 : 0, мкг/мл	0,3678 ± 0,13805	0,4600 ± 0,35776	0,5124 ± 0,29631	0,675

Примечание: сравнение по критерию Краскала–Уоллиса.

среднего с учетом стандартного отклонения. Для всех переменных была выполнена проверка на соответствие нормальному распределению с использованием теста Шапиро–Уилка. Распределение всех количественных переменных отличалось от нормального. Достоверность различий оценивали для двух независимых выборок по критерию Манна–Уитни, для трех и более выборок — по критерию Краскела–Уоллиса. Значимость корреляций определяли по критерию Спирмена. Для всех видов анализа достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение уровня липидов крови и сфинголипидов было проведено в группах пациентов с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии (табл. 1). У пациентов с СГХС наблюдали более высокий уровень ОХС и ЛНП. Кроме того, у пациентов с СГХС отмечали тенденцию к повышению уровню сфингозина по сравнению с группой пациентов с низкой вероятностью

СГХС ($p < 0,05$). У больных с СГХС отмечали увеличение доли длинноцепочечного сфингомиелина SM 18 : 1/22 : 0, а также выявляли существенное повышение уровня церамидов с длинной углеродной цепью, C 20 : 1 и C 22 : 1. Достоверных различий в соотношениях C 18 : 0/C 24 : 0 и C 24 : 1/C 24 : 0 обнаружено не было.

Мы проанализировали связь между уровнем различных липидов и сфинголипидов и наличием у пациентов отягощенного семейного анамнеза (табл. 2). Пациенты с отягощенным семейным анамнезом имели более высокий уровень сфингозина и достоверно более высокий уровень церамидов C 20 : 0, C 20 : 1, C 22 : 0.

Была выявлена прямая корреляция уровня ЛПН и сфингозина (рис. 1). Кроме того, удалось выявить обратные корреляции уровня ЛВП, сфинганина (рис. 2) и галактозилцерамида ($r = -0,56$; $p = 0,001$). Корреляционный анализ уровня фракций сфингомиелинов и церамидов с «классическими» липидными фракциями представлен в табл. 3. Обращает на себя внимание прямая корреляция уровня церамидов C 24 : 0 и C 24 : 1 с уровнем ОХС и ЛНП.

Таблица 2. Уровень липидов и сфинголипидов у пациентов с различной клинической вероятностью семейной гиперлипидемии

Параметры	Семейный анамнез не отягощен (n = 16)	Семейный анамнез отягощен (n = 19)	p
ОХС, ммоль/л	8,11 ± 1,142	7,35 ± 1,881	0,026
ЛНП, ммоль/л	5,49 ± 1,063	4,75 ± 0,820	0,039
ЛВП, ммоль/л	1,63 ± 0,352	1,32 ± 0,479	0,034
ТГ, ммоль/л	1,91 ± 1,119	2,57 ± 3,712	0,845
Сфингозин, нг/мл	65,31 ± 55,298	82,37 ± 84,841	0,021
Сфинганин, нг/мл	0,25 ± 0,447	0,47 ± 0,612	0,062
Галактозилцерамид, нг/мл	59,38 ± 46,989	67,00 ± 33,579	0,123
Сфингомиелины			
SM 18 : 1/16 : 0, мкг/мл	15812,5 ± 8874,74	16142,37 ± 10210,772	0,678
SM 18 : 1/16 : 1, мкг/мл	1703,38 ± 1153,149	2079,74 ± 1637,244	0,635
SM 18 : 1/18 : 0, мкг/мл	3446,00 ± 2012,195	3115,37 ± 1651,906	0,942
SM 18 : 1/18 : 1, мкг/мл	6066,06 ± 4210,684	5388,68 ± 2755,342	0,862
SM 18 : 1/20 : 0, мкг/мл	21605,00 ± 6986,063	22197,89 ± 18558,786	0,756
SM 18 : 1/20 : 1, мкг/мл	57836,31 ± 37448,414	51584,74 ± 29461,884	0,684
SM 18 : 1/22 : 0, мкг/мл	8366,13 ± 3752,568	8090,74 ± 2977,416	0,862
SM 18 : 1/22 : 1, мкг/мл	387,56 ± 224,592	441,26 ± 183,190	0,672
SM 18 : 1/24 : 0, мкг/мл	1809,31 ± 983,979	2218,1 ± 1409,971	0,584
SM 18 : 1/24 : 1, мкг/мл	5398,19 ± 2713,511	5094,32 ± 2995,497	0,682
Церамиды			
C 18 : 0, мкг/мл	6,31 ± 10,163	4,58 ± 8,946	0,213
C 20 : 0, мкг/мл	78,56 ± 150,510	391,21 ± 629,556	0,021
C 20 : 1, мкг/мл	57,38 ± 108,836	121,32 ± 257,882	0,010
C 22 : 0, мкг/мл	60,19 ± 64,744	130,21 ± 252,256	0,040
C 22 : 1, мкг/мл	47,75 ± 52,003	77,16 ± 133,153	0,252
C 24 : 0, мкг/мл	726,69 ± 334,931	622,16 ± 255,175	0,572
C 24 : 1, мкг/мл	324,25 ± 264,550	247,05 ± 181,903	0,457
C 18 : 0/C 24 : 0, мкг/мл	0,0072 ± 0,01166	0,0067 ± 0,01235	0,323
C 24 : 1/C 24 : 0, мкг/мл	0,4730 ± 0,37832	0,4078 ± 0,24104	0,872

Примечание: сравнение по критерию Манна–Уитни.

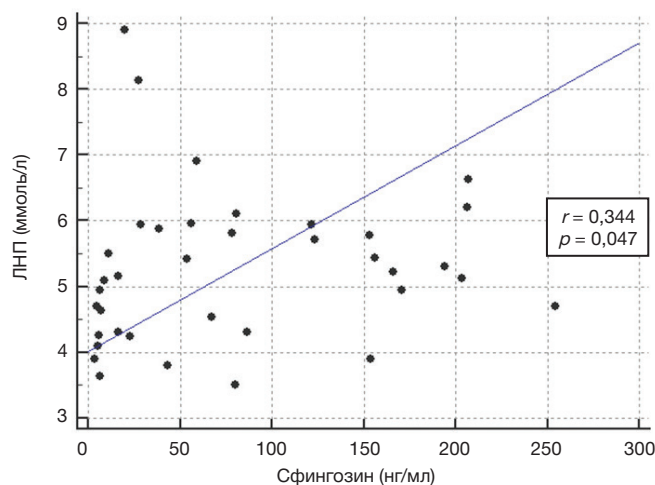


Рис. 1. Корреляция уровней сфингозина и ЛНП

Для церамида С 20 : 0 была выявлена прямая корреляция с уровнем ЛВП и триглицеридов и обратная — с уровнем ЛНП. Для церамида С 22 : 0 была обнаружена обратная корреляция с уровнем ЛВП.

Нами были проанализированы корреляции между уровнем классических липидов и сфинголипидов у пациентов с отягощенным и неотягощенным семейными анамнезами. Обращает на себя внимание тот факт, что прямая корреляция между уровнем ХС ЛНП и сфингозина, выявленная в целом по группе, имела большую силу у пациентов с отягощенным семейным анамнезом ($r = 0,536$; $p = 0,022$). У пациентов с неотягощенным семейным анамнезом корреляция между уровнем холестерина ЛНП и сфингозина была обратной ($r = -0,351$; $p = 0,048$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследований особенностей профиля сфингомиелинов и церамидов у пациентов с семейной гиперлипидемией немного. На животной модели семейной гиперлипидемии, вызванной мутациями гена рецептора липопротеинов низкой плотности, было показано достоверное увеличение общего сфингомиелина и церамида С 18 : 0 при гомозиготном носительстве мутации [7]. В настоящем исследовании мы отмечали только увеличение фракции SM 18 : 1/22 : 0 и церамида С 20 : 1.

Показана связь уровня церамидов с другими факторами риска развития ИБС — избыточной массой тела и формированием инсулинорезистентности. Считается, что некоторые фракции церамидов могут стимулировать синтез провоспалительных цитокинов (например, фактора некроза опухоли) при повышенном потреблении сатурированных жиров с пищей [8]. При снижении веса после проведения бариатрических хирургических вмешательств снижение уровня атерогенных сфингомиелинов и церамидов наблюдается раньше и в значительно большей степени, чем происходит снижение веса, что коррелирует со снижением сердечно-сосудистых рисков [9].

Установлено, что в окисленных ЛНП существенно выше оказывается содержание общих сфинголипидов и церамидов, что может служить подтверждением роли сфинголипидов в дестабилизации атеросклеротической бляшки и формировании обострения ИБС и других заболеваний [10]. Сфингозин вызывает агрегацию Cu^{2+} -перекисных везикул и ускоряет процессы перекисного

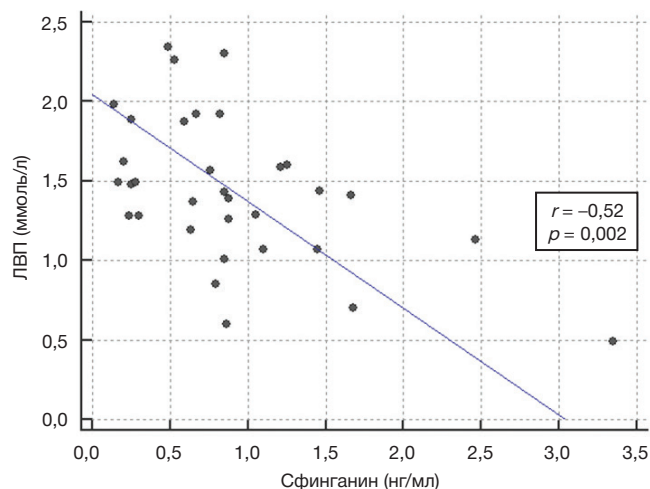


Рис. 2. Корреляция уровней ЛВП и сфинганина крови

окисления ЛНП, делая их более атерогенными. Катализаторами этого процесса могут служить длинноцепочечные церамиды. Церамиды с длиной цепи С 6, С 8, С 10 такой активностью не обладают. Сфинганин, напротив, блокирует процессы перекисного окисления [11]. В нашем исследовании у пациентов с определенной семейной дислипидемией отмечали существенное повышение уровня сфингозина. Уровень сфинганина у пациентов с низкой и высокой вероятностью семейной гиперлипидемии достоверно не отличался.

Полиморфизм гена *ApoE* (2/3/4) ассоциирован с увеличением патогенных фракций церамидов, что связывают с увеличением риска ИБС у молодых пациентов [12].

В патогенезе каротидного атеросклероза у больных с ВИЧ-инфекцией было показано значение уровня церамидов С 16 : 0, С 22 : 0, С 24 : 0, С 24 : 1. Для длинноцепочечных церамидов С 22 и С 24 была установлена корреляция с уровнем ОХС и ЛНП [13]. Положительная корреляция сфингомиелинов SM d16 : 0/28 : 5, SM d18 : 1/24 : 1 и SM d18 : 1/16 : 0 с уровнем ОХС и ХС ЛНП была обнаружена при исследовании животной модели дислипидемии (*ApoE*-дефицитные мыши). Уровень указанных фракций у животных с гиперлипидемией был повышен. Такие сфинголипиды считаются проатерогенными [14]. Есть данные о том, что окислительный стресс и липотоксичность ассоциированы именно с увеличением уровня длинноцепочечных церамидов, что, например, становится явным в условиях инсулинорезистентности [15]. В нашем исследовании уровень сфингомиелина SM 18 : 1/22 : 0 был повышен у пациентов с вероятной/определенной гиперлипидемией. Были выявлены прямые корреляции уровня холестерина крови и церамидов С 24 : 0 и С 24 : 1.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений, таких как одноцентровый характер исследования, малый объем выборки, отсутствие данных крупных наблюдательных исследований о наличии эпидемиологической связи между выявленными изменениями компонентов липидома и сердечно-сосудистыми событиями (инфаркты, инсульты, сердечно-сосудистая смерть).

ВЫВОДЫ

Пациенты с определенной/вероятной СГХС имеют не только высокий уровень ОХС и ХС ЛНП, но и проатерогенного сфингозина, сфингомиелина SM 18 : 1/22 : 0, церамидов с

Таблица 3. Корреляции уровней липидов крови и сфингомиелинов и церамидов

		ОХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ХС ЛНП, ммоль/л	ХС ЛВП, ммоль/л
SM 18 : 1/16 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,178	−0,104	0,084	0,162
	<i>p</i>	0,307	0,564	0,636	0,391
SM 18 : 1/16 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	0,260	−0,171	0,093	0,045
	<i>p</i>	0,132	0,341	0,602	0,813
SM 18 : 1/18 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,257	−0,140	0,278	0,236
	<i>p</i>	0,135	0,439	0,111	0,210
SM 18 : 1/18 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	−0,139	−0,095	−0,202	0,077
	<i>p</i>	0,426	0,597	0,251	0,686
SM 18 : 1/20 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,363*	−0,015	0,184	−0,110
	<i>p</i>	0,032	0,934	0,297	0,561
SM 18 : 1/20 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	−0,101	0,111	−0,098	0,334
	<i>p</i>	0,562	0,540	0,581	0,072
SM 18 : 1/22 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	−0,017	−0,313	−0,155	0,165
	<i>p</i>	0,924	0,076	0,383	0,382
SM 18 : 1/22 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	0,082	0,146	0,125	−0,187
	<i>p</i>	0,642	0,419	0,481	0,321
SM 18 : 1/24 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,048	−0,183	0,100	−0,254
	<i>p</i>	0,782	0,307	0,572	0,175
SM 18 : 1/24 : 1 мкг/мл	<i>r</i>	0,217	−0,297	0,148	0,046
	<i>p</i>	0,210	0,094	0,403	0,809
C 18 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,104	−0,041	0,105	−0,104
	<i>p</i>	0,552	0,820	0,556	0,584
C 20 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,055	0,141	−0,003	−0,420*
	<i>p</i>	0,752	0,433	0,987	0,021
C 20 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	−0,177	0,447**	−0,425*	0,525**
	<i>p</i>	0,310	0,009	0,012	0,003
C 22 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,015	0,342	0,049	−0,429*
	<i>p</i>	0,932	0,052	0,783	0,018
C 22 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	0,070	0,051	−0,094	−0,168
	<i>p</i>	0,689	0,776	0,598	0,374
C 24 : 0, мкг/мл	<i>r</i>	0,475**	0,100	0,334	0,008
	<i>p</i>	0,004	0,579	0,054	0,965
C 24 : 1, мкг/мл	<i>r</i>	0,558**	0,005	0,471**	0,296
	<i>p</i>	0,000	0,976	0,005	0,112

Примечание: *r* — коэффициент корреляции Спирмена; * — $p < 0,005$; ** — $p < 0,001$.

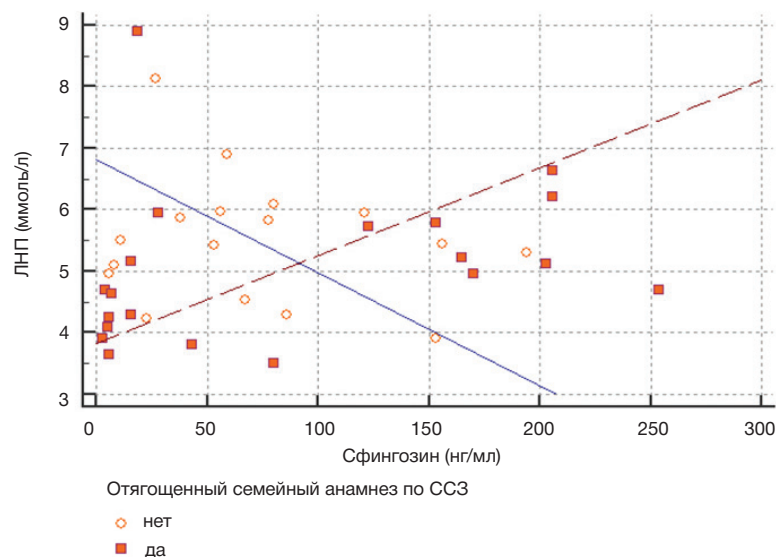


Рис. 3. Корреляция уровней ЛНП и сфингозина крови

длинной углеводной цепью (C 20 : 1 и C 22 : 1). Выявленные нами особенности липидома требуют уточнения их клинической значимости. Наличие изменений липидома может объяснять механизм повышения риска развития и раннего дебюта атеросклероза в этой группе пациентов.

О значении сфингозина как дополнительного фактора риска, ассоциированного с семейным характером заболевания, свидетельствует то, что прямая корреляция между уровнем сфингозина и ЛНП была выявлена только у пациентов с отягощенным семейным анамнезом.

Литература

- Matanes F, Twal WO, Hammad SM. Sphingolipids as biomarkers of disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019; (1159): 109–38. DOI: 10.1007/978-3-030-21162-2_7.
- Anroedh S, Hilvo M, Akkerhuis KM, Kauhanen D, Koistinen K, Oemrawsingh R, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species predict long-term clinical outcome in coronary artery disease patients. *J Lipid Res.* 2018; 59 (9): 1729–37. DOI: 10.1194/jlr.P081281
- Sutter I, Klingenberg R, Othman A, Rohrer L, Landmesser U, Heg D, et al. Decreased phosphatidylcholine plasmalogens — a putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2016; (246): 130–40. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.003.
- Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, Barrett PH. Association of plasma ceramides and sphingomyelin with VLDL apoB-100 fractional catabolic rate before and after rosuvastatin treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100 (6): 2497–501. DOI: 10.1210/jc.2014-4348. PubMed PMID: 25816050.
- Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvänne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99 (1): E45–52. DOI:10.1210/jc.2013-2559. PubMed PMID: 24243630; PubMed Central PMCID: PMC3928964.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37 (8): 911–7.
- Hoogendoorn A, den Hoedt S, Hartman EMJ, Krabbendam-Peters I, Te Lintel Hekkert M, van der Zee L, et al. Variation in coronary atherosclerosis severity related to a distinct LDL (Low-Density Lipoprotein) profile: findings from a familial hypercholesterolemia pig model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39 (11): 2338–52. DOI:10.1161/ATVBAHA.119.313246.
- Sokolowska E, Blachnio-Zabielska A. The role of ceramides in insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; (10): 577. DOI: 10.3389/fendo.2019.00577.
- Kayser BD, Lhomme M, Dao MC, Ichou F, Bouillot JL, Prifti E, et al. Serum lipidomics reveals early differential effects of gastric bypass compared with banding on phospholipids and sphingolipids independent of differences in weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2017; 41 (6): 917–25. DOI: 10.1038/ijo.2017.63.
- Paul A, Lydic TA, Hogan R, Goo YH. Cholesterol acceptors regulate the lipidome of macrophage foam cells. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (15): E3784–801. DOI: 10.3390/ijms20153784.
- Jiménez-Rojo N, Viguera AR, Collado MI, Sims KH, Constance C, Hill KS, et al. Sphingosine induces the aggregation of imine-containing peroxidized vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838 (8): 2071–7. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.04.028.
- Karjalainen JP, Mononen N, Hutri-Kähönen N, Lehtimäki M, Hilvo M(4), Kauhanen D, et al. New evidence from plasma ceramides links apoE polymorphism to greater risk of coronary artery disease in Finnish adults. *J Lipid Res.* 2019; 60 (9): 1622–9. DOI: 10.1194/jlr.M092809.
- Zhao W, Wang X, Deik AA, Hanna DB, Wang T, Haberlen SA, et al. Elevated plasma ceramides are associated with antiretroviral therapy use and progression of carotid artery atherosclerosis in HIV infection. *Circulation.* 2019; 139 (17): 2003–11. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037487.
- Chen Y, Wen S, Jiang M, Zhu Y, Ding L, Shi H, et al. Atherosclerotic dyslipidemia revealed by plasma lipidomics on ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis.* 2017; (262): 78–86. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.010.
- Law BA, Liao X, Moore KS, Southard A, Roddy P, Ji R, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J.* 2018; 32 (3): 1403–16. DOI: 10.1096/fj.201700300R. PubMed PMID: 29127192; PubMed Central PMCID: PMC5892719.

References

1. Matanes F, Twal WO, Hammad SM. Sphingolipids as biomarkers of disease. *Adv Exp Med Biol*. 2019; (1159): 109–38. DOI: 10.1007/978-3-030-21162-2_7.
2. Anroedh S, Hilvo M, Akkerhuis KM, Kauhanen D, Koistinen K, Oemrawsingh R, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species predict long-term clinical outcome in coronary artery disease patients. *J Lipid Res*. 2018; 59 (9): 1729–37. DOI: 10.1194/jlr.P081281.
3. Sutter I, Klingenberg R, Othman A, Rohrer L, Landmesser U, Heg D, et al. Decreased phosphatidylcholine plasmalogens — a putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2016; (246): 130–40. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.003.
4. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, Barrett PH. Association of plasma ceramides and sphingomyelin with VLDL apoB-100 fractional catabolic rate before and after rosuvastatin treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100 (6): 2497–501. DOI: 10.1210/jc.2014-4348. PubMed PMID: 25816050.
5. Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvänne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99 (1): E45–52. DOI:10.1210/jc.2013-2559. PubMed PMID: 24243630; PubMed Central PMCID: PMC3928964.
6. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37 (8): 911–7.
7. Hoogendoorn A, den Hoedt S, Hartman EMJ, Krabbendam-Peters I, Te Lintel Hekkert M, van der Zee L, et al. Variation in coronary atherosclerosis severity related to a distinct LDL (Low-Density Lipoprotein) profile: findings from a familial hypercholesterolemia pig model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39 (11): 2338–52. DOI:10.1161/ATVBAHA.119.313246.
8. Sokolowska E, Blachnio-Zabielska A. The role of ceramides in insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; (10): 577. DOI: 10.3389/fendo.2019.00577.
9. Kayser BD, Lhomme M, Dao MC, Ichou F, Bouillot JL, Prifti E, et al. Serum lipidomics reveals early differential effects of gastric bypass compared with banding on phospholipids and sphingolipids independent of differences in weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2017; 41 (6): 917–25. DOI: 10.1038/ijo.2017.63.
10. Paul A, Lydic TA, Hogan R, Goo YH. Cholesterol acceptors regulate the lipidome of macrophage foam cells. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (15): E3784–801. DOI: 10.3390/ijms20153784.
11. Jiménez-Rojo N, Viguera AR, Collado MI, Sims KH, Constance C, Hill KS et al. Sphingosine induces the aggregation of imine-containing peroxidized vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838 (8): 2071–7. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.04.028.
12. Karjalainen JP, Mononen N, Hutri-Kähönen N, Lehtimäki M, Hilvo M(4), Kauhanen D, et al. New evidence from plasma ceramides links apoE polymorphism to greater risk of coronary artery disease in Finnish adults. *J Lipid Res*. 2019; 60 (9): 1622–9. DOI: 10.1194/jlr.M092809.
13. Zhao W, Wang X, Deik AA, Hanna DB, Wang T, Haberlen SA et al. Elevated plasma ceramides are associated with antiretroviral therapy use and progression of carotid artery atherosclerosis in HIV infection. *Circulation*. 2019; 139 (17): 2003–11. DOI: 0.1161/CIRCULATIONAHA.118.037487.
14. Chen Y, Wen S, Jiang M, Zhu Y, Ding L, Shi H, et al. Atherosclerotic dyslipidemia revealed by plasma lipidomics on ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis*. 2017; (262): 78–86. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.010.
15. Law BA, Liao X, Moore KS, Southard A, Roddy P, Ji R, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J*. 2018; 32 (3): 1403–16. DOI: 10.1096/fj.201700300R. PubMed PMID: 29127192; PubMed Central PMCID: PMC5892719.

ОБРАТНЫЙ МЕРИДИОНАЛЬНЫЙ ЦИКЛОДИАЛИЗ *AB INTERNO* В ЛЕЧЕНИИ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ — ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫВ. Кумар^{1,2,3}✉, М. А. Фролов¹, Г. Н. Душина^{1,3}, А. С. Шрадқа^{1,3}, А. И. Беззаботнов^{2,3}, К. А. Абу Заалан¹¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия² Сходненская городская больница, Химки, Московская область, Россия³ Центр микрохирургии глаза «Про зрение», Химки, Московская область, Россия

Увеосклеральный путь оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ) представляет большой интерес в хирургическом лечении глаукомы. Суть операции циклодиализа заключается в создании прямого сообщения между передней камерой (ПК) глаза и супрахориоидальным пространством (СХП), главным звеном увеосклерального пути оттока ВГЖ. Целью нашего исследования было оценить безопасность и эффективность обратного меридионального циклодиализа *ab interno* (ОМЦа) в снижении внутриглазного давления (ВГД) у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) и рефрактерной глаукомой (РГ). У 14 пациентов с ПОУГ (11 мужчин и 3 женщины в возрасте $77,3 \pm 7,8$ лет) был проведен ОМЦа с помощью специально разработанного шпателя. Шпателем создавали циклодиализную щель шириной 2,0–2,5 мм и глубиной 6,0–6,5 мм. Критериями оценки успеха операции были динамика ВГД, потребность в дополнительной гипотензивной терапии и повторном хирургическом вмешательстве, а также наличие осложнений. Успех считали полным, если ВГД снижалось более чем на 20% и оставалось в пределах 6–21 мм рт. ст. без применения гипотензивных средств. Признанный успех связывали с потребностью в гипотензивной терапии. Лечение считали неудачным, если возникала необходимость в повторном хирургическом вмешательстве. Пациенты оставались под наблюдением не менее трех месяцев. Исходное ВГД и количество используемых гипотензивных препаратов составляли $22,0 \pm 8,5$ мм рт. ст. и $2,6 \pm 0,9$ соответственно. Через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца после операции полный успех был достигнут в 64,3, 77,8, 55,6, 37,5 и 40% случаев соответственно, признанный — в 14,3, 22,2, 44,4, 50 и 60% случаев. Повторная операция потребовалась 4 пациентам. Причиной неудачи стала фиброзная облитерация циклодиализной щели. Было установлено, что ОМЦа безопасен и эффективен в снижении ВГД у пациентов с ПОУГ и РГ.

Ключевые слова: глаукома, внутриглазное давление, циклодиализ, циклодиализ *ab interno*, увеосклеральный отток

Информация о вкладе авторов: В. Кумар — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание статьи, оформление графиков и рисунков, контроль выполнения исследования; М. А. Фролов — контроль выполнения исследования; Г. Н. Душина — сбор и обработка материала, редактирование статьи; А. С. Шрадқа — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; А. И. Беззаботнов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование статьи; 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.), его проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Винод Кумар
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, г. Москва, 117198; kumarvinod1955@gmail.com

Статья получена: 27.11.2019 **Статья принята к печати:** 11.12.2019 **Опубликована онлайн:** 16.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.081

REVERSE MERIDIONAL CYCLODIALYSIS *AB INTERNO* IN MANAGEMENT OF OPEN ANGLE GLAUCOMA — A PRELIMINARY REPORTKumar V^{1,2,3}✉, Frolov MA¹, Dushina GN^{1,3}, Shradqa AS^{1,3}, Bezzabotnov AI^{2,3}, Abu Zaalan KA¹¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia² Skhodnya City Hospital, Khimki, Moscow Region, Russia³ Centre for eye microsurgery "Pro zrenie", Khimki, Moscow Region, Russia

The uveoscleral outflow as an alternate route of aqueous drainage is of great interest in glaucoma surgical treatment. A cyclodialysis cleft allows one to create a direct connection between the anterior chamber (AC) and the suprachoroidal space (SCS) which is the key element of uveoscleral outflow. The purpose of the study was to evaluate the safety and effectiveness of reverse meridional cyclodialysis *ab interno* (RMCai) in decreasing intraocular pressure (IOP) in patients with primary open-angle glaucoma (POAG) and refractory glaucoma (RG). Fourteen patients who exhibited POAG and RG (11 men and 3 women, age 77.3 ± 7.8 years) were included in the study. All patients underwent RMCai with the help of custom-designed spatula. The spatula, inserted through a clear corneal incision, was used to detach the ciliary body from the scleral spur to create a 2.0–2.5 mm wide and 6.0–6.5 mm deep cleft. Outcome measures were IOP change, use of hypotensive medication(s), complications, and need for a second surgery. Decrease in IOP by more than 20% and IOP between 6 and 21 mmHg without hypotensive medication constituted complete success. Similar changes in IOP with medication constituted partial success. Need for second surgery constituted failure. The follow-up period was >3 months. Baseline IOP and hypotensive medication use were 22.0 ± 8.5 mmHg (95% confidence interval (CI), 17.6–26.4) and 2.6 ± 0.9 (95% CI, 2.2–3.1). At 3, 6, 12, 18, and 24 months, complete success was achieved in 64.3%, 77.8%, 55.6%, 37.5%, and 40% of patients respectively; partial success — in 14.3%, 22.2%, 44.4%, 50.0%, and 60.0%. Four patients required a second surgery. Failure occurred because of cleft closure by fibrosis. It was concluded that RMCai is safe and effective in decreasing IOP in POAG and RG patients.

Keywords: glaucoma, intraocular pressure, cyclodialysis, cyclodialysis *ab interno*, uveoscleral outflow

Author contribution: Kumar V — conception, design, data collection, analysis and interpretation, writing and editing, overall responsibility; Frolov MA — overall responsibility; Dushina GN — data collection and editing; Shradqa AS — conception, design and data collection; Bezzabotnov AI — conception, design and editing; Abu Zaalan KA — data collection.

Compliance with ethical standards: appropriate approval was obtained from the ethics committee of Peoples' Friendship University of Russia (protocol № 16 dated 17.11.2016), the study was conducted in accordance with the tenets of the World Medical Association Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all patients after the experimental nature of the procedure had been fully explained.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vinod Kumar
Miklukho-Maklaya, 6, Moscow, 117198; kumarvinod1955@gmail.com

Received: 27.11.2019 **Accepted:** 11.12.2019 **Published online:** 16.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.081

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) — основная причина необратимой слепоты во всем мире [1]. Хотя глаукома является многофакторным заболеванием, ее лечение главным образом направлено на контроль внутриглазного давления (ВГД). Следует отметить, что ВГД можно контролировать с помощью лекарственных препаратов, лазерного воздействия. Если же такое лечение не эффективно и ВГД не компенсировано, показано проведение хирургического вмешательства.

В прошлом все хирургические методы были направлены на создание искусственного пути оттока внутриглазной жидкости (ВГЖ), идущего в обход дренажной системы глазного яблока. «Золотым стандартом» проникающей хирургии глаукомы считают синустрабекулэктомию (СТЭ) [2]. Гипотензивный эффект СТЭ сохраняется надолго, однако такие вмешательства часто сопровождаются осложнениями во время операции и в послеоперационном периоде [3, 4]. Развитие непроникающей хирургии (глубокая склерэктомия и ее модификации) позволило снизить частоту осложнений, однако такие методы обеспечивают лишь кратковременный гипотензивный эффект [5].

Сравнительно недавно были разработаны минимально-инвазивные операции при глаукоме, основанные на активации естественного трабекулярного оттока через дренажный аппарат глазного яблока [6, 7]. Такие операции достаточно безопасны, восстановление после них происходит быстро. При указанных хирургических вмешательствах в ходе операции не формируется фильтративная подушка, и, следовательно, не возникают «грозные» осложнения, такие как наружная фильтрация, косметические дефекты, инфицирование подушки и развитие эндофтальмита [6]. Однако такие операции связаны с рядом ограничений. Уровень снижения ВГД зависит от давления в эписклеральных венах, довольно часто ВГД снижается недостаточно [8].

Существует также альтернативный путь оттока ВГД — увеосклеральный. Из-за анатомических и физиологических особенностей увеосклеральный отток обладает огромным потенциалом в снижении ВГД. В норме через увеосклеральный путь оттекает приблизительно половина ВГЖ [9, 10], движение жидкости происходит через цилиарную мышцу в супрахориоидальное пространство (СХП), а затем в сосудистую оболочку и супрахориоидальные щели, далее из глаза через периваскулярные пространства эмиссарных склеральных каналов или непосредственно через проницаемые пучки склерального коллагена. Возможно существование связи между увеосклеральным путем оттока и лимфатической системой глаза и орбиты, которая поддерживает тканевой баланс жидкости [11]. Градиент отрицательного давления в СХП служит каналом для оттока. Использование рассмотренного пути в хирургии глаукомы, возможно, позволит разработать менее инвазивные, более безопасные и эффективные методы хирургического лечения, которые будут способствовать повышению качества жизни пациентов с глаукомой.

Нами разработана методика обратного меридионального циклодиализа *ab interno* (ОМЦ*ai*) (патент Российской Федерации на изобретение № 2676967 от 19.01.2019), проведено пилотное исследование для оценки его безопасности и эффективности при снижении ВГД у пациентов с ПОУГ и рефрактерной глаукомой (РГ) [12].

Целью нашего исследования было изучить безопасность и эффективность ОМЦ*ai* в снижении ВГД у пациентов с ПОУГ и РГ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 17 пациентов (11 мужчин и 6 женщин), которым было проведено хирургическое лечение в период с февраля 2015 г. по декабрь 2017 г. в связи с ПОУГ и РГ. Средний возраст пациентов составил $77,3 \pm 7,8$ года (95% доверительный интервал (ДИ) — 73,2–81,4).

Критерии включения пациентов в исследование: наличие ПОУГ или РГ; срок послеоперационного наблюдения не менее трех месяцев. Пациенты с глаукомой и катарактой также были включены в исследование, им было проведено одномоментное комбинированное вмешательство (факоэмульсификация и гипотензивная операция). Критерии исключения: пациенты с закрытоугольной, неоваскулярной, фактоморфической и вторичной глаукомой.

Перед операцией было проведено полное офтальмологическое обследование пациентов, которое предполагало оценку остроты зрения, измерение ВГД (по методу Маклакова или с помощью тонометра), биомикроскопию, непрямую офтальмоскопию с помощью линзы 78 диоптрий, периметрию и гониоскопию. Для последующей статистической обработки значения ВГД, полученные по методу Маклакова, были преобразованы в P_0 с использованием пользовательской таблицы преобразования [13]. Для измерения ВГД с помощью тонометра ICare ic100 (Icare Finland Oy; Финляндия) была проанализирована медиана трех последовательных измерений ВГД [14, 15].

Техника операции

У каждого пациента в исследование включали только один глаз. В начале операции проводили ретробульбарную анестезию. После установки блефаростата в проекции на 10–11 часов выполняли разрез роговицы (2,75 мм). В переднюю камеру (ПК) вводили 0,2–0,3 мл 0,01% раствора карбахола (Appasamy Ocular Devices Pvt. Ltd.; Индия) для сужения зрачка и освобождения корня радужки от угла передней камеры (УПК) глаза. ПК заполняли когезивным вискоэластиком, 1,4%-м раствором гиалуроната натрия (Beaver Visitec International Inc.; США). Два парацентеза были сделаны на 180° друг от друга. Голова пациента была отклонена от хирурга примерно на 30°, а оптическая головка операционного микроскопа наклонена на 30° в направлении хирурга. Гониолинзу хирург держал в левой руке и помещал на роговицу для визуализации структур УПК. Специально разработанный шпатель для циклодиализа (рис. 1) вводили в ПК через разрез роговицы, цилиарное тело аккуратно отделяли от склеральной шпоры.

Через сформированную щель шпатель продвигали вперед в меридиональном направлении с незначительными боковыми движениями до тех пор, пока в СХП не был выполнен туннель длиной 6–6,5 мм и шириной 2,0–2,5 мм, позволявший соединить ПК с СХП. Затем шпатель и гониолинзу снимали, а голову пациента и операционный микроскоп возвращали в исходное положение. Если наблюдалось кровотечение в области циклодиализа, использовали стратегию «жди и наблюдай». Как правило, через некоторое время кровотечение прекращалось самопроизвольно. Вискоэластик аспирировали из ПК через парацентезы, применив бимануальную технику, с помощью ирригационных и аспирационных канюль. Пузырь

воздуха вводили в ПК, чтобы предотвратить закрытие циклодиализной щели. После этого все разрезы роговицы гидратировали. В конце операции субконъюнктивально вводили 0,2–0,3 мл раствора дексаметазона, в конъюнктивальный мешок закладывали мазь с антибиотиком, накладывали монокулярную повязку. В глазах с сопутствующей патологией на первом этапе проводили ультразвуковую факоэмульсификацию с имплантацией мягкой гидрофильной интраокулярной линзы (ИОЛ). До ОМЦai вискоэластик полностью удаляли из-за ИОЛ с помощью аспирации и ирригации. Зрачок сужали раствором карбахола, затем ПК заполняли когезивным вискоэластиком. ОМЦai выполняли согласно описанной выше методике.

Наблюдение в послеоперационном периоде

Пациенты прекращали закапывание препаратов для снижения ВГД за день до операции. Им назначали ацетозоламид 0,25 г (Diacarb, Polpharma, Starogard Gdański; Польша) перорально два раза в день на день. Пациентам рекомендовали возобновлять прием гипотензивных препаратов только в случае необходимости дополнительного снижения ВГД. После операции пациентов инструктировали, как применять антибактериальные и стероидные глазные капли (10–12 дней). Осмотр пациентов во время пребывания в стационаре проводили ежедневно, затем через неделю и через 1, 3, 6, 12, 18 и 24 месяца после операции. Послеоперационная оценка состояния пациента предполагала оценку остроты зрения, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, гониоскопию с фотофиксацией. Осложнения (если таковые возникали), количество используемых пациентами гипотензивных препаратов и уровень ВГД документально фиксировали при каждом визите пациента. Исследование поля зрения проводили с интервалом шесть месяцев или год.

Послеоперационные результаты.

Статистический анализ

На первом этапе оценивали динамику ВГД. На втором этапе проводили оценку количества используемых пациентами различных гипотензивных препаратов до и после операции, а также наличия осложнений, определяли необходимость в повторной операции. Снижение ВГД более чем на 20% и уровень ВГД от 6 до 21 мм рт. ст. без приема гипотензивных препаратов оценивали как полный успех. Если необходимость применения гипотензивных препаратов сохранялась, проведенное лечение оценивали как признанный успех. Лечение считали неудачным, если имела место гипотония, т. е. ВГД было ниже 6 мм рт. ст., если при ВГД, превышающем 21 мм рт. ст., ВГД снижалось менее чем на 20% или если возникала потребность в повторной гипотензивной операции. Показатели успеха оценивали при каждом последующем визите пациента, начиная с трех месяцев после операции.

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием Microsoft Excel 2007 (Microsoft; США), учитывая изменения количества пациентов при каждом последующем посещении. Для анализа динамики ВГД и количества используемых гипотензивных лекарственных средств использовали парный *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы проанализировали данные 14 пациентов (11 мужчин и 3 женщины; 14 глаз), удовлетворявших критериям включения пациентов в исследование (табл. 1).

Операция на правом глазу была выполнена 5 пациентам, на левом — 9 пациентам. Далеко зашедшая глаукома имела место у 11 пациентов (79%). На восьми глазах (57%) ранее были проведены операции по поводу глаукомы. Трем пациентам в данном исследовании провели комбинированное хирургическое вмешательство — факоэмульсификацию с имплантацией акриловой гидрофильной ИОЛ и гипотензивную операцию.

Средний период наблюдения составил $68,2 \pm 44,2$ недели (95% ДИ 45,1–91,4). Два пациента не явились для наблюдения через 3 месяца, 1 пациент — через 18 месяцев, и 2 пациента — через 24 месяца. Среднее исходное ВГД составило $22,0 \pm 8,5$ мм рт. ст. (95% ДИ 17,6–26,4). При каждом последующем осмотре пациента наблюдали значительное снижение среднего ВГД и уменьшение потребности в гипотензивных препаратах (табл. 2). Случаев гипотонии выявлено не было.

Показатели успеха хирургического вмешательства представлены в табл. 3.

Трем пациентам (21,4%) провели повторную гипотензивную операцию через три месяца после ОМЦai. Одному пациенту провели повторную гипотензивную операцию через 18 месяцев. Кривая выживаемости Каплана–Мейера представлена на рис. 2.

Средняя острота зрения до операции составляла $1 \pm 0,9$ LogMAR (логарифм минимального угла разрешения). Среднее значение LogMAR через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца составило $0,9 \pm 0,9$, $1,0 \pm 1,0$, $0,9 \pm 1,0$, $0,8 \pm 1,0$ и $0,6 \pm 0,5$ соответственно.

В 11 из 14 глаз (79%) наблюдали небольшое кровоизлияние в месте выполненной циклодиализной щели. В этих глазах кровотечение либо прекратилось самопроизвольно через некоторое время, либо в отверстие туннеля был введен когезивный вискоэластик. В трех глазах, на которых была проведена комбинированная операция, некоторое количество крови достигло капсульного мешка за ИОЛ. В этих случаях кровь вымывали с помощью ирригационных и аспирационных канюль.

В 11 из 14 глаз (79%) ранний реабилитационный период протекал гладко. В трех глазах в первый день



Рис. 1. Вид сбоку шпателя, сконструированного нами для обратного меридионального циклодиализа *ab interno*: дистальный конец рабочей части шпателя имеет длину 6,0–6,5 мм и ширину 2,0 мм, далее он изогнут и повторяет кривизну глазного яблока

после операции наблюдали гипемию, которая разрешилась в течение недели без какого-либо специального лечения. В позднем послеоперационном периоде осложнений зафиксировано не было. Во время гониоскопической оценки места циклодиализа через 3, 6, 12, 18 и 24 месяца после операции циклодиализная щель была открыта в 10, 8, 8, 5 и 3 глазах соответственно. Однако сужение циклодиализной щели наблюдали в 3, 4, 6, 4 и 2 глазах соответственно, а полностью закрытую циклодиализную щель зафиксировали в 4, 2, 1, 3 и 3 глазах соответственно (рис. 3).

Таблица 1. Исходные данные пациентов

№	Пол / возраст	Глаз	Хирургическое лечение глаукомы	Другие операции на органе зрения	Сопутствующая патология
1	Ж / 74	ЛГ	1. ОМФ 2. СДШК	–	Катаракта
2	М / 82	ПГ	–	–	Катаракта
3	Ж / 87	ПГ	–	–	Катаракта
4	М / 87	ПГ	–	–	Катаракта
5	М / 87	ЛГ	1. Трабекулэктомия	–	Катаракта
6	М / 82	ЛГ	–	–	Катаракта
7	М / 64	ПГ	–	–	Катаракта
8	М / 69	ЛГ	1. Трабекулэктомия	–	Катаракта
9	М / 69	ЛГ	1. Трабекулэктомия	–	Катаракта
10	М / 78	ПГ	1. Трабекулэктомия	–	Катаракта
11	М / 77	ЛГ	1. Трабекулэктомия	ФЭ + ИОЛ	Артифакция
12	М / 75	ЛГ	–	–	Катаракта
13	М / 64	ЛГ	1. СДШК	ФЭ + ИОЛ	Артифакция
14	Ж / 82	ЛГ	1. СДШК 2. Трабекулэктомия	ФЭ + ИОЛ	Артифакция

Примечание: М — мужчина; Ж — женщина; ПГ — правый глаз; ЛГ — левый глаз; ОМФ — операция микрофильтрации Сингха; СДШК — сегментарная дилатация шлеммова канала (имплантация спирального расширителя Кумара из нержавеющей стали в просвет шлеммова канала); ФЭ — факосмульсификация; ИОЛ — интраокулярная линза.

Таблица 2. Результаты оценки эффективности ОМЦаi

Кол-во пациентов	Период наблюдения					
	До операции	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
	14	14	9	9	8	5
ВГД, мм рт. ст.	22,0 ± 8,5	13,8 ± 5,0	11,9 ± 3,4	10,1 ± 2,4	12,9 ± 3,9	13,0 ± 5,7
(95% ДИ)	(17,6–26,4)	(11,2–16,4)	(9,8–14,0)	(8,6–11,7)	(10,1–15,6)	(8,4–17,6)
Снижение ВГД, %	–	30,8 ± 29,8	36,0 ± 35,1	48,0 ± 26,0	35,5 ± 35,6	34,5 ± 33,8
(95% ДИ)	–	(15,4–46,3)	(14,3–57,7)	(31,1–65,0)	(10,8–60,2)	(7,4–61,6)
Кол-во гипотензивных препаратов	2,6 ± 0,9	0,5 ± 0,8	0,4 ± 0,7	0,6 ± 0,7	0,9 ± 0,8	1,0 ± 0,9
(95% ДИ)	(2,2–3,1)	(0,1–0,9)	(0–0,8)	(0,1–1,0)	(0,3–1,5)	(0,3–1,7)
Кол-во глаз, нуждающихся в гипотензивной терапии / кол-во глаз, находящихся под наблюдением (%)	14/14 (100)	2/14 (14,3)	2/9 (22,2)	4/9 (44,4)	4/8 (50,0)	3/5 (60,0)
Кол-во глаз, нуждающихся в повторной операции	0	2	1	0	0	0

Примечание: ВГД — внутриглазное давление; ДИ — доверительный интервал.

Таблица 3. Показатели успеха ОМЦаi

Кол-во пациентов	Период наблюдения				
	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
	14	9	9	8	5
Кол-во неявившихся пациентов	0	2	0	1	2
Полный успех, кол-во глаз (%)	9 (64,3)	7 (77,8)	5 (55,6)	3 (37,5)	2 (40)
Признанный успех, кол-во глаз (%)	2 (14,3)	2 (22,2)	4 (44,4)	4 (50)	3 (60)
Неудачный исход, кол-во глаз (%)	3 (21,4)	0	0	1 (12,5)	0

и активизировать супрацилиальный отток с помощью непроникающей процедуры, глубокой склерэктомии [16–18]. Результаты были обнадеживающими, но не определяющими. Вполне вероятно, что наличие фильтрационной подушки в качестве основного места фильтрации ВГЖ не позволило полностью открыть путь оттока, что повлияло на конечные результаты.

Хирургия СХП предлагает хирургу два варианта доступа: *ab externo* и *ab interno*. Подход *ab externo* предполагает создание прямого пути от ПК к СХП через отделение цилиарного тела от склеральной шпоры. Указанный подход прост в освоении и не требует от хирурга овладения неизвестными приемами и маневрами. Тем не менее метод требует обширного рассечения глазных тканей, поэтому наносит существенную травму главному яблоку. После такого вмешательства существует высокий риск осложнений, таких как послеоперационная гипотония и массивное кровотечение из склеральных сосудов. Данные ряда исследований показали, что при использовании подхода *ab externo* основной причиной повышения ВГД в послеоперационном периоде является активация фибробластов [19, 20].

Подход *ab interno* имеет определенные преимущества. Такое хирургическое вмешательство не предполагает формирования конъюнктивального лоскута, сохраняя эту структуру в неповрежденном состоянии, что может быть полезно в случае возникновения потребности в повторной операции. Минимальная инвазивность и травматичность способствуют уменьшению послеоперационных рубцов и, следовательно, увеличению доли успешных операций. Хирургическое вмешательство может быть выполнено в

амбулаторных условиях, количество интраоперационных и послеоперационных осложнений незначительно. Процедура *ab interno* может быть выполнена независимо от того, была ли ранее проведена традиционная операция по глаукоме с повреждением конъюнктивы (например, трабекулэктомия). Реабилитационный период довольно короткий [21–23]. Однако данная методика имеет ряд ограничений по выполнению — подход *ab interno* предполагает применение дорогостоящих инструментов и устройств, таких как операционный микроскоп с возможностью изменения угла наклона оптической головки, а также специальных хирургических гониолинз и когезивных вискоэластиков. Кроме того, хирург должен владеть навыком интраоперационной гониоскопии.

Концепция создания прямой связи между ПК и СХП для уменьшения ВГД не нова. Первая подобная процедура, обеспечившая связь между ПК и СХП, была выполнена в 1861 г. [24]. Автор описал шесть случаев проведения такой манипуляции.

В 1905 г. была описана процедура хирургического отделения цилиарного тела от склеры, которую назвали циклодиализом [21]. Было выдвинуто предположение, что успех операции зависит от связи между ПК и супрацилиарным пространством. В дальнейшем его удалось подтвердить [25]. Была выдвинута гипотеза, что операция действовала за счет уменьшения патологического накопления ВГЖ и атрофии увеального тракта [26].

Долгосрочный успех такой операции по снижению ВГД зависит от проходимости щели циклодиализа. Примечательно, что фиброз циклодиализной щели может быть основным фактором повышения ВГД в

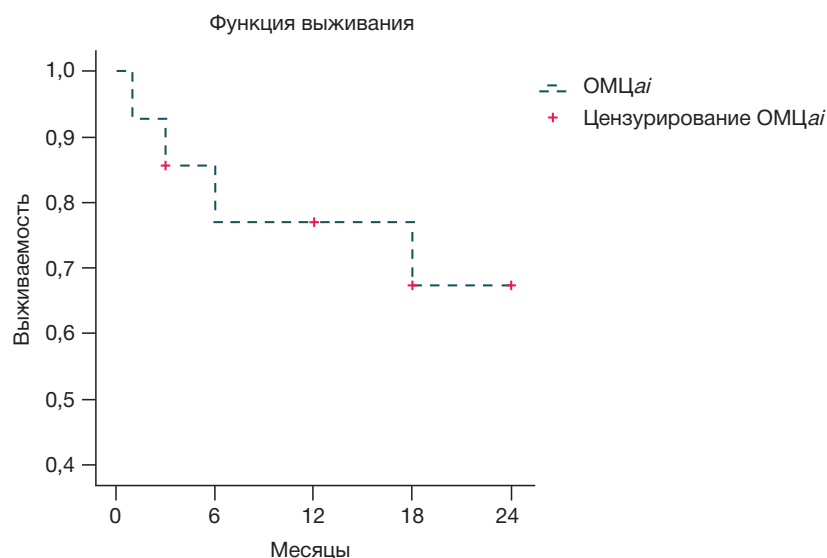


Рис. 2. Кривая выживаемости Каплана–Мейера для глаз после ОМЦай

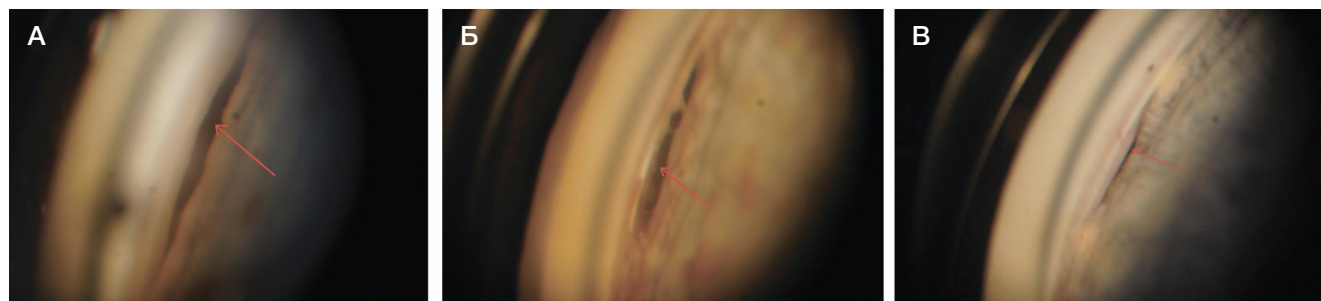


Рис. 3. Циклодиализная щель (обозначена красной стрелкой) у разных пациентов при разных посещениях: неделя (А); месяц (Б); 2 года (В); признаки фиброза или воспаления отсутствуют

послеоперационном периоде [27–29]. Морфологические исследования показали, что фибробласты и миофибробласты присутствуют во всех слоях сосудистой оболочки. Эти клетки очень чувствительны к любой травме, хирургическим манипуляциям и любому инородному телу. Их пролиферация вызывает образование рубцов [30].

Во время гониоскопической оценки состояния циклодиализа щели мы заметили, что во всех глазах, где было обнаружено повышение ВГД, наблюдалось повторное прикрепление корня радужной оболочки к склере. В большинстве таких глаз место прикрепления располагалось позади его первоначального анатомического прикрепления, т. е. имело место ретроградное расположение корня радужки. Полученные нами результаты согласуются с результатами более ранних исследований УПК в 14 подвергнутых циклодиализу глазах [27]. Согласно данным автора, во всех успешно прооперированных глазах присутствовала циклодиализная щель, соединявшая ПК с супрацилиарным пространством. В трех глазах с неудачным исходом операции автор наблюдал повторное прикрепление корня радужной оболочки к склере. Место прикрепления в этих случаях располагалось позади от места его первоначального анатомического прикрепления, что представляло собой ретроградное расположение корня радужки (как отмечено и в нашем исследовании).

Было проведено перспективное исследование, в которое включили 28 глаз у 20 пациентов с рефрактерной глаукомой [31]. Циклодиализ *ab interno* проводили под гониоскопическим контролем на протяжении 2 ч, чтобы обеспечить доступ к супрацилиарному пространству. По данным авторов, после операции исходное ВГД снизилось с $34,3 \pm 10,5$ до $14,6 \pm 12,4$ мм рт. ст. Однако через 60 дней 21 глазу (75%) потребовалось повторное хирургическое

вмешательство. Признанный успех наблюдали в 4 глазах (14,3%). Только в 3 глазах (10,7%) удалось достичь полного успеха. Наилучшие результаты были получены в «факических» глазах.

В нашем исследовании через 12, 18 и 24 месяца наблюдения полный успех был достигнут в 55,6, 37,5 и 40% случаев соответственно, тогда как признанный успех — в 44,4, 50,0 и 60,0% случаев. Наши результаты были более впечатляющими, чем результаты предыдущих исследований. Это может быть связано с тем, что во время операции глаз был травмирован минимально. Использование современных хирургических микроскопов, хирургических гониолинз и специально сконструированного шпателя позволило четко идентифицировать анатомическую структуру угла и сделать циклодиализ менее травматичным.

У нашего исследования было несколько недостатков — отсутствие контрольной группы, нерандомизированный характер исследования и небольшой размер выборки ($n = 14$). Для подтверждения представленных в настоящей работе результатов необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

ВЫВОДЫ

ОМЦai — это простая и безопасная процедура, которая эффективно снижает ВГД у пациентов с ПОУГ и РГ. Успех процедуры зависит от сохранности соустья между ПК и СХП. Фиброз циклодиализной щели является основной причиной неудачи хирургического вмешательства. Имплантация различных устройств или материалов для сохранения проходимости соустья может увеличить вероятность успеха операции.

Литература

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006; (90): 262–7. PubMed PMID: 16488940.
2. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol*. 1968; (66): 673–9. PubMed PMID: 4891876.
3. Jampel HD, Musch DC, Gillespie BW, Lichter PR, Wright MM, Guire KE, et al. Perioperative complications of trabeculectomy in the collaborative initial glaucoma treatment study (CIGTS). *Am J Ophthalmol*. 2005; (140): 16–22. PubMed PMID: 15939389.
4. Francis BA, Hong B, Winarko J, Kawji S, Dustin L, Chopra V. Vision loss and recovery after trabeculectomy: risk and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*. 2011; (129): 1011–17. PubMed PMID: 21825185.
5. El Sayyad F, Helal M, El-Kholify H, Khalil M, El-Maghraby A. Nonpenetrating deep sclerectomy versus trabeculectomy in bilateral primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology*. 2000; (107): 1671–4. PubMed PMID: 10964827.
6. Saheb H, Ahmed II. Micro-invasive glaucoma surgery: current perspectives and future directions. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012; (23): 96–104. PubMed PMID: 22249233.
7. Kahook MY, Sarwat S, Seibold LK. MIGS: advances in glaucoma surgery. Thorofare: SLACK Incorporated, 2014; 122 p.
8. Francis BA, Sarkisian SR, Tan JC. Minimally Invasive Glaucoma Surgery: A practical guide. New York: Thieme Medical Publisher, Inc., 2017; 199 p.
9. Alm A, Nilsson SF. Uveoscleral outflow — a review. *Exp Eye Res*. 2009; (88): 760–8. PubMed PMID: 19150349.
10. Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Camras CB. Aqueous humor dynamics in the aging human eye. *Am J Ophthalmol*. 1999; (127): 407–12. PubMed PMID: 10218693.
11. Yucel Y, Gupta N. Lymphatic drainage from the eye: A new target for therapy. *Prog Brain Res*. 2015; (220): 185–98. PubMed PMID: 26497791.
12. 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.
13. Краснов М. М. Микрохирургия глауком. 2-е издание. М.: Медицина, 1980; 248 с.
14. Kato Y, Nakakura S, Matsuo N, Yoshitomi K, Handa M, Tabuchi H, et al. Agreement among Goldmann applanation tonometer, iCare, and Icare PRO rebound tonometers; non-contact tonometer; and Tonopen XL in healthy elderly subjects. *Int Ophthalmol*. 2018; (38): 687–96. PubMed PMID: 28393323.
15. Wong B, Parikh D, Rosen L, Gorski M, Angelilli A, Shih C. Comparison of disposable Goldmann applanation tonometer, iCare ic100, and Tonopen XL to standards of care Goldmann nondisposable applanation tonometer for measuring intraocular pressure. *J Glaucoma*. 2018; (27): 1119–24. PubMed PMID: 30134367.
16. Chihara E, Hayashi K. Effect of a fenestration between an intrascleral lake and supraciliary space on deep sclerectomy. *J Glaucoma*. 2016 Apr; 25 (4): 299–307. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000277.
17. Фролов М. А., Фролов А. М., Казакова К. А. Комбинированные методы лечения при сочетании катаракты и глаукомы. *Вестник офтальмологии*. 2017; 133 (4): 42–6. PubMed PMID: 28980565.
18. Лапочкин В. И., Свирина А. В., Корчуганова Е. А. Новая операция

- в лечении рефрактерных глауком — лимбосклерэктомия с клапанным дренированием супрацилиарного пространства. Вестник офтальмологии. 2001; (1): 9–11.
19. 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. PubMed PMID: 28600745.
 20. Rekas M, Pawlik B, Grala B et al. Clinical and morphological evaluation of gold micro shunt after unsuccessful surgical treatment of patients with primary open-angle glaucoma. *Eye (Lond).* 2013; (27): 1214–17. PubMed PMID: 2387717.
 21. Heine L. Introduction of cyclodialysis in glaucoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 1905; (31): 824–26.
 22. Kammer JA, Mundy KM. Suprachoroidal devices in glaucoma surgery. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2015; (22): 45–52. PubMed PMID: 25624673.
 23. Bailey AK, Sarkisian SR, Jr, Vold SD. Ab interno approach to the suprachoroidal space. *J Cataract Refract Surg.* 2014; (40): 1291–4. PubMed PMID: 25088626.
 24. Hancock H. Division of the ciliary muscle for glaucoma. *Lancet.* 1861; (77): 137.
 25. Galin MA, Baras I, Sambursky J. Glaucoma and cataract. A study of cyclodialysis-lens extraction. *Am J Ophthalmol.* 1969; (69): 522–6. PubMed PMID: 5778611.
 26. Krauss W. Ueber die Zyklodialyse. *Zeitschr. f. Augenh.* 1907; (17): 318.
 27. Barkan O. Cyclodialysis: its mode of action. Histologic observations in a case of glaucoma in which both eyes were successfully treated by cyclodialysis. *Arch Ophthalmol.* 1950; (43): 793–803.
 28. Колесникова Л. Н., Панцырева Л. П., Свирин А. В. Дилатация супрахориоидального пространства в комбинации с циклодиализом. Вестник офтальмологии. 1976; (4): 18–20. PubMed PMID: 1021925.
 29. Demeler U. Direct cyclohexy following operative and traumatic cyclodialysis. *Fortschr Ophthalmol.* 1984; (81): 466–8. PubMed PMID: 6500429.
 30. Flügel-Koch C, May CA, Lütjen-Drecoll E. Presence of a contractile cell network in the human choroid. *Ophthalmologica.* 1996; (210): 296–302. PubMed PMID: 8878213.
 31. Jordan JF, Dietlein TS, Dinslage S, Lüke C, Konen W, Krieglstein GK. Cyclodialysis ab interno as a surgical approach to intractable glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; (245): 1071–6. PubMed PMID: 17219126.

References

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; (90): 262–7. PubMed PMID: 16488940.
2. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol.* 1968; (66): 673–9. PubMed PMID: 4891876.
3. Jampel HD, Musch DC, Gillespie BW, Lichter PR, Wright MM, Guire KE, et al. Perioperative complications of trabeculectomy in the collaborative initial glaucoma treatment study (CIGTS). *Am J Ophthalmol.* 2005; (140): 16–22. PubMed PMID: 15939389.
4. Francis BA, Hong B, Winarko J, Kawji S, Dustin L, Chopra V. Vision loss and recovery after trabeculectomy: risk and associated risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2011; (129): 1011–17. PubMed PMID: 21825185.
5. El Sayyad F, Helal M, El-Kholify H, Khalil M, El-Maghraby A. Nonpenetrating deep sclerectomy versus trabeculectomy in bilateral primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology.* 2000; (107): 1671–4. PubMed PMID: 10964827.
6. Saheb H, Ahmed IL. Micro-invasive glaucoma surgery: current perspectives and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* 2012; (23): 96–104. PubMed PMID: 22249233.
7. Kahook MY, Sarwat S, Seibold LK. MIGS: advances in glaucoma surgery. Thorofare: SLACK Incorporated, 2014; 122 p.
8. Francis BA, Sarkisian SR, Tan JC. Minimally Invasive Glaucoma Surgery: A practical guide. New York: Thieme Medical Publisher, Inc., 2017; 199 p.
9. Alm A, Nilsson SF. Uveoscleral outflow — a review. *Exp Eye Res.* 2009; (88): 760–8. PubMed PMID: 19150349.
10. Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Camras CB. Aqueous humor dynamics in the aging human eye. *Am J Ophthalmol.* 1999; (127): 407–12. PubMed PMID: 10218693.
11. Yucel Y, Gupta N. Lymphatic drainage from the eye: A new target for therapy. *Prog Brain Res.* 2015; (220): 185–98. PubMed PMID: 26497791.
12. Kumar V, Frolov MA, Dushina GN, Shradka AS, Bezzabotnov AI. Obratnyi meridional'nyi tsiklodializ ab interno v khirurgicheskoy lechenii glaukomy razlichnoy etiologii: ot dalennye rezul'taty. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma.* 2018; 17 (4): 63–73. Russian.
13. Krasnov MM. Mikrokhirurgiya glaukom. 2-e izdanie. Moscow: Meditsina, 1980; 248 c. Russian.
14. Kato Y, Nakakura S, Matsuo N, Yoshitomi K, Handa M, Tabuchi H, et al. Agreement among Goldmann applanation tonometer, iCare, and Icare PRO rebound tonometers; non-contact tonometer; and Tonopen XL in healthy elderly subjects. *Int Ophthalmol.* 2018; (38): 687–96. PubMed PMID: 28393323.
15. Wong B, Parikh D, Rosen L, Gorski M, Angelilli A, Shih C. Comparison of disposable Goldmann applanation tonometer, iCare ic100, and Tonopen XL to standards of care Goldmann nondisposable applanation tonometer for measuring intraocular pressure. *J Glaucoma.* 2018; (27): 1119–24. PubMed PMID: 30134367.
16. Chihara E, Hayashi K. Effect of a fenestration between an intrascleral lake and supraciliary space on deep sclerectomy. *J Glaucoma.* 2016 Apr; 25 (4): 299–307. DOI: 10.1097/IJG.0000000000000277.
17. Frolov MA, Frolov AM, Kazakova KA. Kombinirovannye metody lecheniya pri sochetanii katarakty i glaukomy. *Vestnik oftal'mologii.* 2017; 133 (4): 42–46. PubMed PMID: 28980565. Russian.
18. Lapochkin VI, Svirin AV, Korchuganova EA. Novaya operatsiya v lechenii refrakternykh glaukom — limbosklerektomiya s klappnym drenirovaniem supratsiliarnogo prostanstva. *Vestnik oftal'mologii.* 2001; (1): 9–11. Russian.
19. 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. PubMed PMID: 28600745.
20. Rekas M, Pawlik B, Grala B et al. Clinical and morphological evaluation of gold micro shunt after unsuccessful surgical treatment of patients with primary open-angle glaucoma. *Eye (Lond).* 2013; (27): 1214–17. PubMed PMID: 2387717.
21. Heine L. Introduction of cyclodialysis in glaucoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 1905; (31): 824–26.
22. Kammer JA, Mundy KM. Suprachoroidal devices in glaucoma surgery. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2015; (22): 45–52. PubMed PMID: 25624673.
23. Bailey AK, Sarkisian SR, Jr, Vold SD. Ab interno approach to the suprachoroidal space. *J Cataract Refract Surg.* 2014; (40): 1291–4. PubMed PMID: 25088626.
24. Hancock H. Division of the ciliary muscle for glaucoma. *Lancet.* 1861; (77): 137.
25. Galin MA, Baras I, Sambursky J. Glaucoma and cataract. A study of cyclodialysis-lens extraction. *Am J Ophthalmol.* 1969; (69): 522–6. PubMed PMID: 5778611.
26. Krauss W. Ueber die Zyklodialyse. *Zeitschr. f. Augenh.* 1907; (17): 318.
27. Barkan O. Cyclodialysis: its mode of action. Histologic observations in a case of glaucoma in which both eyes were successfully treated by cyclodialysis. *Arch Ophthalmol.* 1950; (43): 793–803.
28. Kolesnikova LN, Pansyryeva LP, Svirin AV. Dilyatatsiya suprachorioidal'nogo prostanstva v kombinatsii s tsiklodializom. *Vestnik oftal'mologii.* 1976; (4): 18–20. PubMed PMID: 1021925. Russian.
29. Demeler U. Direct cyclohexy following operative and traumatic cyclodialysis. *Fortschr Ophthalmol.* 1984; (81): 466–8. PubMed PMID: 6500429.
30. Flügel-Koch C, May CA, Lütjen-Drecoll E. Presence of a

- contractile cell network in the human choroid. *Ophthalmologica*. 1996; (210): 296–302. PubMed PMID: 8878213.
31. Jordan JF, Dietlein TS, Dinslage S, Lüke C, Konen W, Kriegstein GK. Cyclodialysis ab interno as a surgical approach to intractable glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; (245): 1071–6. PubMed PMID: 17219126.

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОХОДИМОСТИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ВЕНЫ И ПОРТОСИСТЕМНОГО ШУНТА ЧЕРЕЗ 10 ЛЕТ ПОСЛЕ TIPS

М. Ш. Цциашвили¹, В. Н. Шиповский^{1,2}, Д. В. Монахов^{1,2}, А. С. Челяпин^{1,2}✉, А. Б. Гусейнов¹

¹ Российский национальный исследовательский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Городская клиническая больница имени Д. Д. Плетнева, Москва, Россия

Одним из немногих доступных методов борьбы с осложнениями портальной гипертензии у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени является трансъюгулярное портосистемное шунтирование. С течением времени имеется тенденция к развитию дисфункции внутрипеченочного шунта вследствие нарушения его проходимости, что вновь приводит к развитию осложнений портальной гипертензии. Описанный клинический случай демонстрирует возможности внутрипеченочного шунтирования, а также повторных эндоваскулярных вмешательств при дисфункции шунта, позволяющих значительно продлить жизнь пациента и сохранить ее качество.

Ключевые слова: цирроз печени, портальная гипертензия, трансъюгулярное внутрипеченочное портосистемное шунтирование, дисфункция, реинтервенция

Информация о вкладе авторов: А. С. Челяпин, А. Б. Гусейнов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; А. С. Челяпин — статистическая обработка данных; М. Ш. Цциашвили, В. Н. Шиповский, Д. В. Монахов, А. С. Челяпин, А. Б. Гусейнов — написание текста; М. Ш. Цциашвили — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: работа одобрена этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 170 от 18 декабря 2017 г.). Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании

✉ **Для корреспонденции:** Александр Сергеевич Челяпин
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; ChelyapinAleks@yandex.ru

Статья получена: 24.10.2019 **Статья принята к печати:** 08.11.2019 **Опубликована онлайн:** 16.11.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.074

RE-ESTABLISHING THE PATENCY OF THE HEPATIC VEIN AND THE PORTOSYSTEMIC SHUNT 10 YEARS AFTER THE TIPS PROCEDURE: A CLINICAL CASE

Tsitsiashvili MSh¹, Shipovskiy VN^{1,2}, Monakhov DV^{1,2}, Chelyapin AS^{1,2}✉, Huseynov AB¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Pletnev City Clinical Hospital, Moscow, Russia

Transjugular intrahepatic portosystemic shunt is one of the few available options for treating complications of portal hypertension in patients with chronic diffuse liver diseases. Over time, shunt patency can become compromised, causing a recurrence of such complications. The clinical case presented below demonstrates the potential of TIPS and illustrates the use of an endovascular reintervention for re-establishing shunt patency, which improves the life expectancy of patients, as well as their quality of life.

Keywords: liver cirrhosis, portal hypertension, transjugular intrahepatic portosystemic shunt, dysfunction, reintervention

Author contribution: Chelyapin AS, Huseynov AB — study conception and design, data acquisition and processing; Chelyapin AS — statistical analysis; Tsitsiashvili MSh, Shipovskiy VN, Monakhov DV, Chelyapin AS, Huseynov AB — manuscript draft; Tsitsiashvili MSh — manuscript revision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol 170 dated December 18, 2017). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander Chelyapin
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; ChelyapinAleks@yandex.ru

Received: 24.10.2019 **Accepted:** 08.11.2019 **Published online:** 16.11.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.074

Наиболее серьезное осложнение синдрома портальной гипертензии — кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка (ВРВП и ВРВЖ). Летальность при первом эпизоде геморрагий достигает 50%, а при рецидиве кровотечения — 70% [1, 2]. Для снижения летальности в России разработан специальный алгоритм, изложенный в «клинических рекомендациях по лечению кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка» [3]. Согласно алгоритму, после выполнения экстренной эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС) приоритетным эндоскопическим методом является лигирование вен пищевода, применение которого позволяет добиться гемостаза у 80% пациентов с продолжающимся кровотечением [3]. Однако данная методика наиболее эффективна в качестве профилактики первого эпизода кровотечения и при этом не влияет на давление в воротной вене. Повторное появление ВРВП и рецидив кровотечения

в отдаленном послеоперационном периоде наблюдают в 50–60% случаях [4]. В связи с этим для пациентов с рецидивирующими кровотечениями предложены такие хирургические вмешательства, как операции портосистемного шунтирования, непосредственно снижающие давление в портальной системе, а также операции азигопортального разобщения. Среди операций портосистемного шунтирования у пациентов с циррозом печени класса В и С методом выбора является операция трансъюгулярного внутрипеченочного портосистемного шунтирования (TIPS). В настоящее время нашей клиникой накоплен опыт выполнения 226 подобных операций.

Актуальная проблема внутрипеченочного шунтирования — нарушение проходимости стента, приводящее к рецидиву осложнений портальной гипертензии [5–8]. Причинами нарушений проходимости шунта могут быть тромбоз и псевдоинтимальная гиперплазия TIPS, гиперплазия

интимы печеночной вены, сдавление стента тканью печени высокой плотности, миграция и фрагментация стента. Средняя продолжительность работы шунта при использовании стент-графта, по нашим данным, составляет 3–5 лет, в единичных случаях — до 10 лет.

На сегодняшний день разработаны различные виды эндоваскулярных вмешательств, направленных на восстановление проходимости шунта. Применение подобных операций позволяет увеличить срок функционирования внутрипеченочного шунта, снизить риск развития осложнений портальной гипертензии, тем самым продлить жизнь пациентов с терминальными стадиями диффузных хронических заболеваний печени.

В изложенном клиническом случае мы приводим опыт выполнения повторной операции после TIPS через 10 лет после имплантации стента в паренхиму печени.

Описание клинического случая

Впервые диагноз цирроза печени (ЦП), осложненный синдромом портальной гипертензии, пациенту К. (возраст 40 лет) был установлен в 2006 г. в ГУЗ «Центральном научно-исследовательском институте гастроэнтерологии ДЗ г. Москвы». 10 декабря 2007 г. пациент поступил в 4-е хирургическое отделение ГKB № 57 ДЗ г. Москвы в срочном порядке с диагнозом: цирроз печени, класс В по Чайлду–Пью, осложненный синдромом портальной гипертензии и состоявшимся кровотечением из ВРВП III степени.

При поступлении состояние пациента средней тяжести. Кожные покровы бледные, склеры субиктеричные. В легких дыхание везикулярное, проводится во все отделы. ЧДД — 14 в минуту. Тоны сердца приглушены. АД — 110/70 в минуту, ЧСС — 96 в минуту. Живот мягкий, безболезненный во всех отделах. Печень выступает из-под края реберной дуги на 3 см. Патологии со стороны мочевыделительной системы не выявлено.

По результатам инструментальных методов диагностики у больного диагностированы следующие признаки портальной гипертензии: дилатация воротной (14 мм) и селезеночной (9 мм) вен, гепатоспленомегалия, ВРВП III степени. При обследовании выявлена постгеморрагическая анемия легкой степени тяжести: снижение уровня гемоглобина до 96 г/л, снижение количества эритроцитов до $3,89 \times 10^{12}/л$. Отмечены тромбоцитопения ($102 \times 10^9/л$) и гипербилирубинемия за счет непрямой фракции (34 мкмоль/л). Изменений в коагулограмме не обнаружено.

На вторые сутки от момента поступления у пациента рецидивировало желудочно-кишечное кровотечение. Диагноз продолжающегося кровотечения из ВРВП III степени был подтвержден при ЭГДС. В дальнейшем был выполнен гемостаз с помощью зонда-обтуратора и лечение продолжили в условиях отделения реанимации. При контрольной ЭГДС в средней и нижней третях пищевода выявили варикозно-расширенные венозные стволы диаметром до 7–9 мм, с синюшного цвета слизистой над ними, покрытой налетом солянокислого гематина. Для снижения риска рецидива кровотечения пациенту первым этапом 17 декабря 2007 г. выполнили эндоскопическое лигирование ВРВП, наложив 20 лигатур. Вторым этапом 19 декабря 2007 г. провели трансъюгулярное внутрипеченочное портосистемное шунтирование стент-графтом Viatorr TIPS Endoprosthesis (Gore; USA). Интраоперационно было отмечено снижение

давления в воротной вене с 520 мм водн. ст. до 300 мм водн. ст.

Послеоперационный период протекал гладко; 22 декабря 2007 г. была выполнена контрольная ультразвуковая доплерография, по данным которой выявлен магистральный кровоток по стенту со скоростью 85 см/с. На фоне проводимой консервативной терапии состояние пациента стабилизировалось, 25 декабря 2007 г. пациент был выписан в удовлетворительном состоянии.

В дальнейшем в течение девяти лет пациент каждые полгода госпитализировался в нашу клинику для проведения гепатотропной терапии и динамического наблюдения. За данный период наблюдения (9 лет) клинических проявлений осложнений портальной гипертензии не было.

При очередной контрольной госпитализации (декабрь 2017 г.) по данным ультразвукового дуплексного сканирования (УЗДС) отмечено увеличение скорости кровотока в проксимальной части стента, снижение скорости кровотока в дистальной части, заподозрен стеноз правой печеночной вены (рис. 1). При ЭГДС выявлены ВРВП III степени, свидетельствующие о нарастании давления в системе воротной вены.

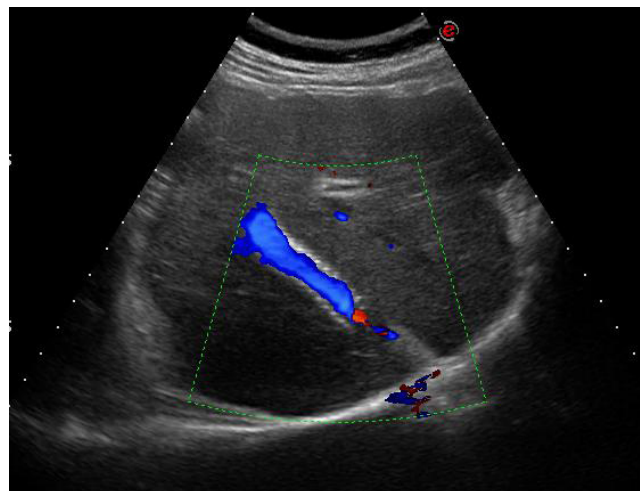


Рис. 1. Больной К. Цирроз печени, класс В, после TIPS. Стеноз проксимальной части TIPS. Скорость кровотока 37 см/с

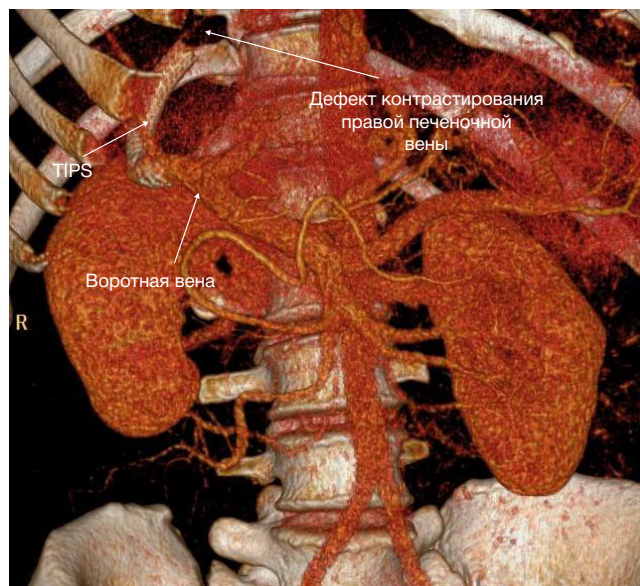


Рис. 2. КТ-ангиография при гиперплазии интимы правой печеночной вены

С целью дальнейшего дообследования и верификации диагноза больному выполнили компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием. По данным исследования диагноз стеноза правой печеночной вены был подтвержден (рис. 2).

Учитывая признаки стеноза правой печеночной вены — изменение гемодинамических показателей во внутривенном шунте, в портальной системе (снижение скорости в воротной вене), увеличение степени ВРВП — было принято решение о необходимости восстановления проходимости TIPS.

После выполнения портографии и визуализации стеноза принято решение о его нивелировании при помощи стентирования стент-в-стент (рис. 3 и 4).

При контрольной портографии после реинтервенции выявлено, что трансъюгулярный внутривенный шунт полностью проходим — стеноз ликвидирован (рис. 5).

Послеоперационный период протекал гладко, при выполнении УЗДС портального кровотока выявлен магистральный кровоток во внутривенном шунте со скоростью 112 см/с, проведен курс гепатотропной терапии, пациент был выписан в удовлетворительном состоянии.

В течение последующих двух лет пациент проходил наблюдение в нашей клинике, последняя госпитализация состоялась в августе 2019 г., осложнений портальной гипертензии за данный период наблюдения не выявлено.

Обсуждение клинического случая

Анализируя литературные данные и наш собственный опыт, мы пришли к выводу, что оптимально в качестве внутривенного шунта при TIPS использовать стент-графты. Применение стент-графтов позволяет не только уменьшить риск развития тромбоза шунта в раннем послеоперационном периоде, но и снизить частоту дисфункции TIPS в позднем послеоперационном периоде [8, 9].

Несмотря на все выше перечисленные преимущества при использовании стент-графтов, с течением времени может возникнуть нарушение проходимости внутривенного шунта в результате стеноза, обусловленного гиперплазией интимы правой печеночной вены. Для снижения риска

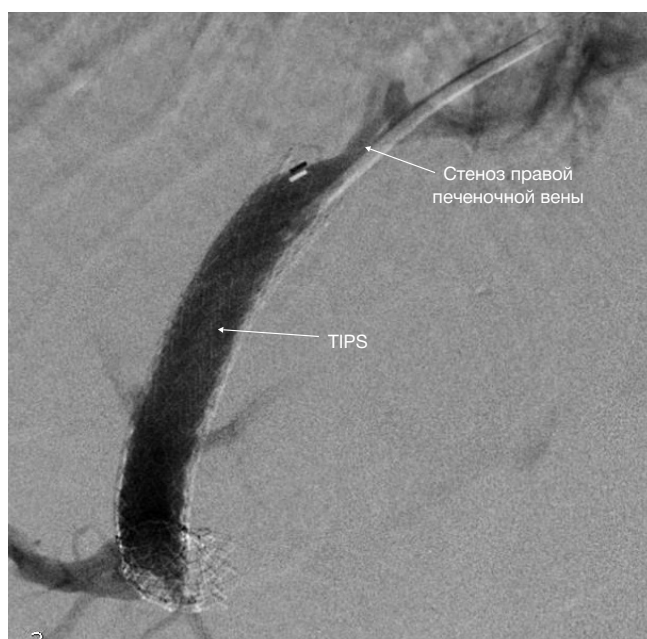


Рис. 3. Трансъюгулярная портография пациента К

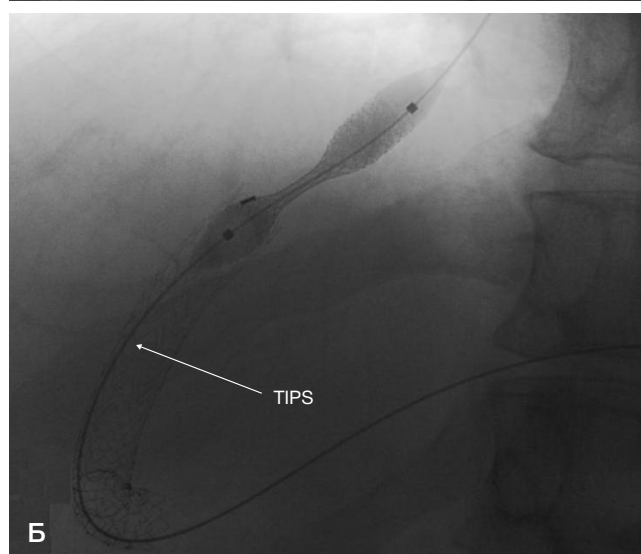
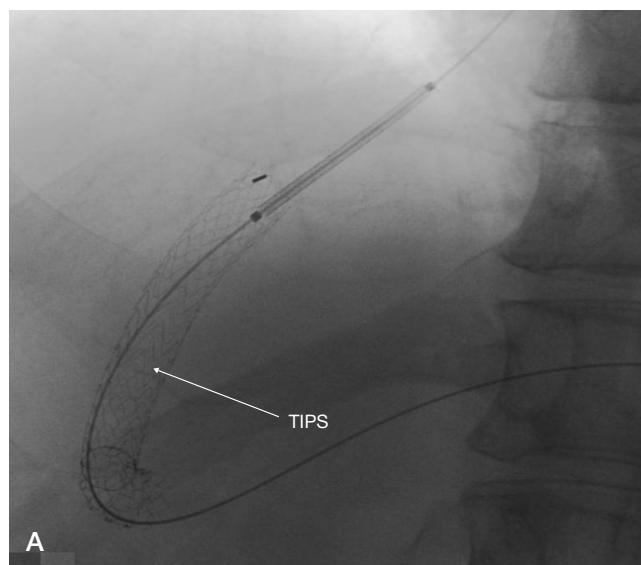


Рис. 4. Трансъюгулярная портография пациента К. Этапы стентирования стент-в-стент. А. Имплантация стента. Б. Раскрытие стента

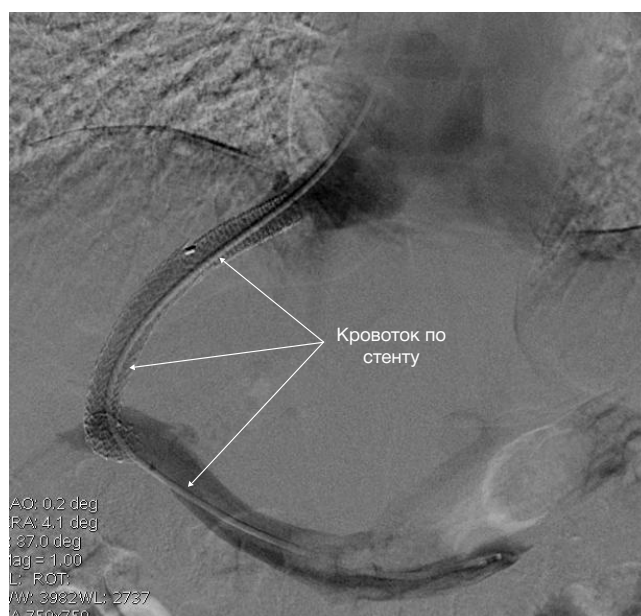


Рис. 5. Трансъюгулярная портография пациента К. после реинтервенции в объеме стентирования стент-в-стент

развития данного состояния необходимо оптимальное позиционирование стента в устье правой печеночной вены [10, 11].

Как демонстрирует описанный клинический случай, реинтервенции после TIPS, включая стентирование правой печеночной вены, позволяют не только продлить жизнь пациентов без развития осложнений портальной гипертензии, но и сохранить ее качество.

ВЫВОДЫ

Восстановление проходимости внутрипеченочного шунта при его дисфункции играет важную роль, поскольку длительно функционирующий TIPS дает возможность пациенту достаточно долго находиться в листе ожидания трансплантации печени без угрозы возникновения кровотечения.

Литература

1. Elsebaey MA, et al. Endoscopic injection sclerotherapy versus N-Butyl-2 Cyanoacrylate injection in the management of actively bleeding esophageal varices: a randomized controlled trial. *BMC gastroenterology*. 2019; 19 (1): 23.
2. Shi L, et al. Favorable Effects of Endoscopic Ligation Combined with Drugs on Rebleeding and Mortality in Cirrhotic Patients: A Network Meta-Analysis. *Digestive Diseases*. 2018; 36 (2): 136–49.
3. Анисимов А. Ю., Верткин А. Л., Девятков А. В., Дзидзава И. И., Жигалова С. Б., Затевахин И. И., и др. Клинические рекомендации по лечению кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода и желудка. Доступно по ссылке: <http://xn---9sdbbejx7bdduahou3a5d.xn--p1ai/stranica-pravlenija/unkr/urgentnaja-abdominalnaja-hirurgija/klinicheskie-rekomendaci-po-lecheniyu-krovotecenii-iz-varikozno-rasshirenyh-ven-pischevoda-i-zheludka.html>.
4. Masalaite L, Valantinas J, Stanaitis J. Endoscopic ultrasound findings predict the recurrence of esophageal varices after endoscopic band ligation: a prospective cohort study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015; 50 (11): 1322–30.
5. Bureau C, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts with covered stents increase transplant-free survival of patients with cirrhosis and recurrent ascites. *Gastroenterology*. 2017; 152 (1): 157–63.
6. Lv Y, Han G, Fan D. Thrombosis after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: an ominous sign? *AME Medical Journal*. 2017; 2 (40).
7. Li YH, et al. Long-term shunt patency and overall survival of transjugular intrahepatic portosystemic shunt placement using covered stents with bare stents versus covered stents alone // *Clinical radiology*. 2018; 73 (6): 580–7.
8. Saad WE. A. Portal Hypertension: Imaging, Diagnosis, and Endovascular Management. Thieme, 2017.
9. Luo, Xue-Feng, et al. Stent-Grafts for the Treatment of TIPS Dysfunction: Fluency Stent vs Wallgraft Stent. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19 (30): 5000–5.
10. Wang Q, et al. Eight millimetre covered TIPS does not compromise shunt function but reduces hepatic encephalopathy in preventing variceal rebleeding. *Journal of hepatology*. 2017; 67 (3): 508–16.
11. Suhocki PV, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt complications: prevention and management // *Seminars in interventional radiology*. Thieme Medical Publishers. 2015; 32 (2): 123–32.

References

1. Elsebaey MA, et al. Endoscopic injection sclerotherapy versus N-Butyl-2 Cyanoacrylate injection in the management of actively bleeding esophageal varices: a randomized controlled trial. *BMC gastroenterology*. 2019; 19 (1): 23.
2. Shi L, et al. Favorable Effects of Endoscopic Ligation Combined with Drugs on Rebleeding and Mortality in Cirrhotic Patients: A Network Meta-Analysis. *Digestive Diseases*. 2018; 36 (2): 136–49.
3. Anisimov AY, Vertkin AL, Devyatov AV, Dzidzava II, Zhigalova SB, Zatevakhin II, et al. Clinical guidelines on treatment of esophageal and stomach variceal bleeding. Available from: <http://xn---9sdbbejx7bdduahou3a5d.xn--p1ai/stranica-pravlenija/unkr/urgentnaja-abdominalnaja-hirurgija/klinicheskie-rekomendaci-po-lecheniyu-krovotecenii-iz-varikozno-rasshirenyh-ven-pischevoda-i-zheludka.html>.
4. Masalaite L, Valantinas J, Stanaitis J. Endoscopic ultrasound findings predict the recurrence of esophageal varices after endoscopic band ligation: a prospective cohort study. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015; 50 (11): 1322–30.
5. Bureau C, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts with covered stents increase transplant-free survival of patients with cirrhosis and recurrent ascites. *Gastroenterology*. 2017; 152 (1): 157–63.
6. Lv Y, Han G, Fan D. Thrombosis after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: an ominous sign? *AME Medical Journal*. 2017; 2 (40).
7. Li YH, et al. Long-term shunt patency and overall survival of transjugular intrahepatic portosystemic shunt placement using covered stents with bare stents versus covered stents alone // *Clinical radiology*. 2018; 73 (6): 580–7.
8. Saad WE. A. Portal Hypertension: Imaging, Diagnosis, and Endovascular Management. Thieme, 2017.
9. Luo, Xue-Feng, et al. Stent-Grafts for the Treatment of TIPS Dysfunction: Fluency Stent vs Wallgraft Stent. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19 (30): 5000–5.
10. Wang Q, et al. Eight millimetre covered TIPS does not compromise shunt function but reduces hepatic encephalopathy in preventing variceal rebleeding. *Journal of hepatology*. 2017; 67 (3): 508–16.
11. Suhocki PV, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt complications: prevention and management // *Seminars in interventional radiology*. Thieme Medical Publishers. 2015; 32 (2): 123–32.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ: УДАЛЕНИЕ ПРОЛИФЕРИРУЮЩЕЙ ПИЛОМАТРИКОМЫ CO₂-ЛАЗЕРОМТ. А. Гайдина , А. С. Дворников, П. А. Скрипкина

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

В клинической практике врачи разных специальностей наблюдают большое разнообразие новообразований кожи (НК) и ее придатков. Алгоритм диагностики включает оценку анамнестических и клинических данных, дерматоскопическое и гистологическое исследования. Описание пиломатриксомы с гистологическим подтверждением диагноза представляет собой редкий клинический случай. При локализации пиломатриксомы на эстетически значимом участке кожного покрова задача врача минимизировать косметический дефект после удаления. Мы получили положительный косметический результат после удаления пиломатриксомы размером менее 2 см² на коже лица методом CO₂-лазерной деструкции.

Ключевые слова: пиломатрикса, доброкачественные новообразования кожи, удаление, CO₂-лазер, методы диагностики новообразований кожи, искусственный интеллект

Информация о вкладе авторов: Т. А. Гайдина — проведение оперативного лечения, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. С. Дворников — анализ литературы, сбор, анализ, интерпретация данных; П. А. Скрипкина — подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: пациентка подписала добровольное информированное согласие на проведение оперативного лечения.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Анатольевна Гайдина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; doc429@yandex.ru

Статья получена: 14.11.2019 **Статья принята к печати:** 21.11.2019 **Опубликована онлайн:** 01.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.077

CASE REPORT: REMOVAL OF A PROLIFERATING PILOMATRICOMA WITH A CO₂ LASERGaydina TA , Dvornikov AS, Skripkina PA

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Tumors of the skin/skin adnexa are astonishingly diverse. The diagnostic algorithms for skin neoplasms includes history taking, the assessment of clinical data, dermoscopy and a histopathological examination. Literature descriptions of a histologically confirmed pilomatricoma are scarce. If the lesion is localized to an esthetically sensitive body area, it is important to minimize the postoperative cosmetic defect. In the case described below, we were able to achieve a positive esthetic outcome in a patient with a facial pilomatricoma sized < 2 cm² using a CO₂ laser.

Keywords: pilomatricoma, benign skin tumor, removal, CO₂ laser, diagnostic methods for skin neoplasms, artificial intelligence

Author contribution: Gaydina TA — surgery; literature analysis; data acquisition, analysis and interpretation; manuscript preparation; Dvornikov AS — literature analysis; data acquisition, analysis and interpretation; Skripkina PA — manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the patient gave informed consent to the surgical intervention and publication of her personal data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Gaydina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; doc429@yandex.ru

Received: 14.11.2019 **Accepted:** 21.11.2019 **Published online:** 01.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.077

Многообразие клинической картины новообразований кожи (НК) и сложность их дифференциальной диагностики обязывают врача уметь использовать дополнительные методы исследования. При первичном осмотре НК пациенту проводят дерматоскопию [1], а при возможности ультразвуковое дерматосканирование, сиаскопию, конфокальную микроскопию [2], мультиспектральную визуализацию в инфракрасном диапазоне [3]. Тем не менее диагностические ошибки встречаются даже при патогистологическом исследовании, которое является «золотым стандартом» [4]. Широко применяемый метод дерматоскопии в основном используют для диагностики меланокитарных НК [5]. Дерматоскопические изображения таких редких НК, как пиломатрикса, недостаточно представлены в литературе.

Пиломатрикса (син.: эпителиома доброкачественная кальцифицирующаяся, эпителиома некротизирующаяся, эпителиома обызвествленная Малерба–Шенантс, матрикса) — редкая доброкачественная опухоль кожи с фолликулярной дифференцировкой. В 1880 г. A. Malherbe и J. Chenantais предположили, что опухоль развивается из сальных желез [6]. В 1961 г. R. Forbis и E. Helwig назвали опухоль пиломатриксомой, так как обнаружили, что клетки, из которых она происходит, представляют собой

клетки внешней оболочки корня волосного фолликула [6]. F. Moehlenbeck, проанализировав 140 000 опухолей кожи, отметил, что на долю пиломатриксомы приходится 0,12% случаев [6]. В настоящее время доказано, что пиломатрикса развивается из клеток матрикса волосного фолликула [7]. Обычно она локализуется в области головы или шеи. Встречается в детском возрасте, чаще у девочек, но может возникнуть и у взрослого человека [8]. Клинические признаки опухоли многообразны. Она может проявляться в виде как малозаметного подкожного образования, так и большого агрессивного поражения с локальной инвазией [9]. Из-за различий в клинических проявлениях пиломатрикса может быть ошибочно диагностирована как злокачественная опухоль. При локализации пиломатриксомы на коже лица сильным психотравмирующим фактором для пациентов становится косметический дефект, обусловленный формированием рубцовой ткани после удаления. В связи с этим выбирать метод удаления необходимо индивидуально, учитывая размер и локализацию НК, риск развития гипертрофического или келоидного рубца, сопутствующие заболевания и возраст пациента. Важно минимизировать косметический дефект и получить эстетически приемлемый результат.

Описание клинического случая

Пациентка К., 52 года, обратилась в клинику с жалобами на образование на коже левой щеки (рис. 1). Впервые пациентка заметила образование более 20 лет назад, за медицинской помощью не обращалась. В последние несколько лет самостоятельно неоднократно пыталась выдавить из образования содержимое, после чего заметила рост опухоли.

Status localis: кожа лица нормальной окраски. III фототип кожи по Фитцпатрику. В области левой щеки узел размером 10,0 × 10,0 × 0,5 мм светло-розового цвета, имеющий неоднородное дольчатое строение с вкраплениями желтого цвета. При пальпации образование мягкое, безболезненное. Кожа вокруг не изменена.

Дерматоскопия: увеличение ×20. Объемное образование с четкими границами, симметричное по двум осям, дольчатая структура, гомогенные зоны желтого и светло-розового цвета, извитые сосуды, шелушение (рис. 2).

Анализ дерматоскопического снимка сверточной нейронной сетью: доброкачественное образование.

Клинический диагноз: доброкачественное образование кожи лица. D23.3.

Дифференциальная диагностика: базалиома, эпидермальная киста, атерома, ксантогранулема, цилиндрома, фиброма.

С учетом локализации НК на эстетически значимом участке лица и размера до 2 см² было принято решение об удалении опухоли CO₂-лазером под местной анестезией с предварительным забором гистологического материала скальпелем.

Гистологическое исследование: D17.0 Проллиферирующая пиломатриксома (некротизирующаяся эпителиома Малерба) (рис. 3). ICD-O code: 8110/0.

Результаты осмотра через 2 недели после удаления: формирование нормотрофического рубца (рис. 4, 5).

Обсуждение клинического случая

Пациенты с НК обращаются за медицинской помощью в учреждения как онкологического, так и неонкологического профиля. По литературным данным, в структуре онкологической заболеваемости ведущей локализацией у обоих полов в Российской Федерации является кожа (12,6% — без меланомы, 14,2% — с меланомой) [10]. Принципиально важно при подозрении или выявлении врачом злокачественного НК или ее придатков в учреждениях неонкологического профиля незамедлительно направить пациента в первичный онкологический кабинет для уточнения диагноза и своевременного определения последующей тактики ведения пациента [11]. Пиломатриксома — редкая опухоль кожи, диагностировать которую только по клинической картине почти невозможно. Для уточнения диагноза мы использовали дерматоскопию НК и гистологическое исследование удаленного материала. При диагностике редких НК возможна субъективная интерпретация дерматоскопической картины. В связи с этим перспективно использование искусственного интеллекта (ИИ) для скрининговой первичной диагностики НК [12]. ИИ в настоящее время используют для анализа цифровых микроснимков, он показывает высокую чувствительность при выявлении злокачественных новообразований. В качестве ИИ используют сверточную нейронную сеть (convolutional neural networks, CNN), которая обучена на



Рис. 1. Узел на коже левой щеки светло-розового цвета с желтыми вкраплениями



Рис. 2. Дерматоскопия: объемное образование с четкой дольчатой структурой, гомогенные зоны желтого и светло-розового цвета, извитые сосуды, чешуйки (увеличение ×20)

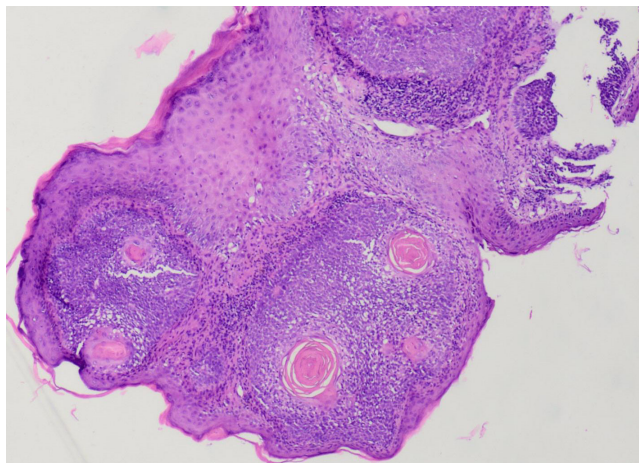


Рис. 3. Фрагмент кожи, в глубине которого определяется опухолевый узел, состоящий из пластов-гирлянд, представленных эпителиальными клетками с признаками пролиферации. Часть клеток некротизирована (представляют собой так называемые клетки-тени). Вокруг эпителиальных пластов — воспалительный инфильтрат (окраска гематоксилин-эозином; увеличение ×40)

более чем 100 000 микроснимков НК с гистологически подтвержденным диагнозом [13]. Такая нейронная сеть способна выстраивать собственные алгоритмы принятия решений при анализе изображений. Обученная CNN при оценке НК показывает лучшую специфичность и чувствительность по сравнению с дерматологами, имеющими начальный (до 2 лет) и средний (до 5 лет) опыт в дерматоскопической оценке [13]. Безусловно, ИИ не может заменить врача в диагностике НК, но способен стать хорошим инструментом в поддержке принятия решений у начинающих специалистов. Обнадеживает понимание того, что ИИ на основе CNN в ближайшее время будет развиваться и обучаться на реальных клинических случаях, что положительно повлияет на точность диагностики даже таких редких НК, как пиломатриксома.

Хирургические вмешательства в области лица являются сильным психотравмирующим фактором для пациентов, так как могут сопровождаться формированием гипертрофических рубцов. Выбор метода удаления пиломатриксомы достаточно широк: хирургическое иссечение, кюретаж, каутеризация, криодеструкция, фотодинамическая терапия, лазерная абляция. Опыт успешного применения CO_2 -лазера с хорошим эстетическим результатом описан при удалении различных НК и ее придатков при локализации на лице [14, 15]. Удаление пиломатриксомы CO_2 -лазером снижает частоту рецидивирования по сравнению с другими методами удаления, сокращает срок эпителизации послеоперационной раны и частоту интраоперационных и послеоперационных осложнений, увеличивает число положительных оценок качества косметической реабилитации. При размерах пиломатриксомы до 2 см² удаление CO_2 -лазером предпочтительнее, так как характеризуется высокой эффективностью и дает хороший эстетический результат.

ВЫВОДЫ

Пиломатриксому трудно диагностировать только на основании клинической картины. Необходимо использовать дополнительные неинвазивные методы исследования. Наиболее широко используют дерматоскопию, однако дерматоскопических изображений таких редких НК, как пиломатриксома, недостаточно. Важно создавать базу дерматоскопических изображений редких НК с их последующим компьютерным анализом для развития скрининговой диагностики. Пиломатриксому диаметром менее 2 см², особенно при локализации на эстетически значимых участках кожного покрова, предпочтительно удалять методом CO_2 -лазерной деструкции. Данный метод позволяет получить хороший эстетический результат и минимизировать косметический дефект.

Литература

1. Кубанов А. А., Сысоева Т. А., Галлямова Ю. А., Бишарова А. С., Мерцалова И. Б. Алгоритм обследования пациентов с новообразованиями кожи. Лечащий врач. 2018; (3): 83–8.
2. Малишевская Н. П., Соколова А. В. Современные методы неинвазивной диагностики меланомы кожи. Вестник дерматологии и венерологии. 2014; (4): 46–53.
3. Rey-Barroso L, Burgos-Fernández FJ, Delpueyo X, Ares M, Royo S, Malvehy J, et al. Visible and Extended Near-Infrared Multispectral Imaging for Skin Cancer Diagnosis Sensors. 2018; 18 (5): 1441.
4. Кит О. И., Фоменко Ю. А., Карнаухов Н. С., Лаптева Т. О. Частота расхождения диагноза в прижизненной патологоанатомической диагностике онкологических заболеваний (по материалам пересмотра готовых гистологических препаратов в патологоанатомическом отделении ФГБУ РНИОИ МЗ РФ). Исследования и практика в медицине. 2019; 6 (1S): 148.
5. Синельников И. Е., Барышников К. А., Демидов Л. В. Клиническая диагностика меланомы кожи. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2017; 28 (1–2): 68–73.



Рис. 4. Дерматоскопия: пятно однородного бледно-розового цвета, симметричное, с четкими границами (увеличение $\times 20$)



Рис. 5. Формирование нормотрофического рубца

6. Меньщикова Г. В., Ермилова А. И., Абрамов К. С., Голубев С. С. Случаи редкой доброкачественной опухоли у ребенка. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2015; 18 (1): 15–17.
7. Юнусбаева М. М., Юнусбаев Б. Б., Валиев Р. Р., Хамматова А. А., Хуснутдинова Э. К. Широкое многообразие кератинов человека. Вестник дерматологии и venerологии. 2015; (5): 42–52.
8. Sudip S, Pranaya K, Barnali C, Kisalaya G. Pilomatricoma mimicking ruptured epidermal cyst in a middle aged woman. Indian Journal of Dermatology. 2016; 61 (1): 88–90.
9. Mainak D, Indranil C. A lesson learnt: retrospection in a case of pilomatricoma mimicking as parotid neoplasm. Einstein (Sao Paulo). 2016; 14 (1): 104–5.
10. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2016; 250 с.
11. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 18 апреля 2012 г. № 381н Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «Косметология». Доступно по ссылке: <https://legalacts.ru/doc/prikaz-minzdravsotsrazvitija-rossii-ot-18042012-n-381n/>.
12. Fujisawa Y, Inoue S, Nakamura Y. The Possibility of Deep Learning-Based, Computer-Aided Skin Tumor Classifiers. Front Med (Lausanne). 2019; 27 (6): 191.
13. Haenssle HA, Fink C, Schneiderbauer R, Toberer F, Buhl T, Blum A, et al. Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. Annals of Oncology. 2018; (0): 1–7.
14. McGee JS, Suchter MF, Milgraum SS. Multiple Familial Trichoepithelioma Successfully Treated with CO₂-Laser and Imiquimod. Skinmed. 2016; Dec 1; 14 (6): 467–8.
15. Cho HJ, Lee W, Jeon MK, Park JO, Yang EJ. Staged Mosaic Punching Excision of a Kissing Nevus on the Eyelid. Aesthetic Plast Surg. 2019; Jun; 43 (3): 652–7.

References

1. Kubanov AA, Sysoeva TA, Gallyamova YuA, Bisharova AS, Mercalova IB. Algoritm obsledovanija pacientov s novoobrazovanijami kozhi. Lechashhij vrach. 2018; (3): 83–8. Russian.
2. Malishevskaya NP, Sokolova AV. Sovremennye metody neinvazivnoj diagnostiki melanomy kozhi. Vestnik dermatologii i venerologii. 2014; (4): 46–53. Russian.
3. Rey-Barroso L, Burgos-Fernández FJ, Delpueyo X, Ares M, Royo S, Malvehy, J, et al. Visible and Extended Near-Infrared Multispectral Imaging for Skin Cancer Diagnosis Sensors. 2018; 18 (5): 1441.
4. Kit OI, Fomenko YuA, Karnauhov NS, Lapteva TO. Chastota rashozhdenija diagnoza v przhiznennoj patologoanatomicheskoy diagnostike onkologicheskikh zabolevanij (po materialam peresmotra gotovyh gistologicheskikh preparatov v patologoanatomicheskom otdelenii FGBU RNIOL MZ RF). Issledovaniya i praktika v medicine. 2019; 6 (1S): 148. Russian.
5. Sinelnikov IE, Baryshnikov KA, Demidov LV. Klinicheskaja diagnostika melanomy kozhi. Vestnik RONC im. N. N. Blohina RAMN. 2017; 28 (1–2): 68–73. Russian.
6. Menshchikova GV, Ermilova AI, Abramov KS, Golubev SS. Sluchai redkoj dobrokachestvennoj opuholi u rebenka. Rossijskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej. 2015; 18 (1): 15–17. Russian.
7. Junusbaeva MM, Junusbaev BB, Valiev RR, Hammatova AA, Husnutdinova YeK. Shirokoe mnogoobrazie keratinov cheloveka. Vestnik dermatologii i venerologii. 2015; (5): 42–52. Russian.
8. Sudip S, Pranaya K, Barnali C, Kisalaya G. Pilomatricoma mimicking ruptured epidermal cyst in a middle aged woman. Indian Journal of Dermatology. 2016; 61 (1): 88–90.
9. Mainak D, Indranil C. A lesson learnt: retrospection in a case of pilomatricoma mimicking as parotid neoplasm. Einstein (Sao Paulo). 2016; 14 (1): 104–5.
10. Kaprin AD, Starinskij VV, Petrova GV. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2014 godu (zabolevaemost' i smertnost'). M.: MNIOL im. P. A. Gercena — filial FGBU «NMIIRC» Minzdrava Rossii; 2016; 250 s. Russian.
11. Prikaz Ministerstva zdravooohranenija i social'nogo razvitija Rossijskoj Federacii ot 18 aprelja 2012g. # 381n Ob utverzhenii Porjadka okazaniya medicinskoj pomoshhi naseleniju po profilju «Kosmetologija». Dostupno po ssylke: <https://legalacts.ru/doc/prikaz-minzdravsotsrazvitija-rossii-ot-18042012-n-381n/>.
12. Fujisawa Y, Inoue S, Nakamura Y. The Possibility of Deep Learning-Based, Computer-Aided Skin Tumor Classifiers. Front Med (Lausanne). 2019; 27 (6): 191.
13. Haenssle HA, Fink C, Schneiderbauer R, Toberer F, Buhl T, Blum A, et al. Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. Annals of Oncology. 2018; (0): 1–7.
14. McGee JS, Suchter MF, Milgraum SS. Multiple Familial Trichoepithelioma Successfully Treated with CO₂-Laser and Imiquimod. Skinmed. 2016; Dec 1; 14 (6): 467–8.
15. Cho HJ, Lee W, Jeon MK, Park JO, Yang EJ. Staged Mosaic Punching Excision of a Kissing Nevus on the Eyelid. Aesthetic Plast Surg. 2019; Jun; 43 (3): 652–7.

ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОЙ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

М. Р. Рахматулина¹✉, И. С. Галкина²

¹ Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения Минздрава России, Москва, Россия

В статье представлены современные методы диагностики инфекций, передаваемых половым путем, их преимущества и недостатки, показания к применению. Описаны возможности количественной полимеразной цепной реакции для диагностики воспалительных заболеваний и дисбиотических состояний у мужчин и женщин. Данный метод, являющийся в настоящее время «золотым стандартом» диагностики урогенитальной патологии, имеет неоспоримые преимущества перед микробиологическими методами и полимеразной цепной реакцией в качественном формате: менее жесткие требования к преаналитическому этапу для сохранения количественных соотношений между микроорганизмами (нуклеиновыми кислотами микроорганизмов), значительно меньший риск влияния на результат исследования контаминации образцов микроорганизмами из внешней среды, равные условия по чувствительности и специфичности для всех микроорганизмов, в том числе некультивируемых и труднокультивируемых, возможность контроля взятия материала и оценки состояния микробиоты по отношению микроорганизмов и их групп друг к другу, скорость получения результата и возможность исследования неинвазивно взятых образцов.

Ключевые слова: микробный биоценоз, урогенитальные инфекции, количественная полимеразная цепная реакция

Декларации: авторы заявляют о наличии конфликта интересов в связи с аффилиацией с группой компаний «ДНК-Технология» — разработчиком и производителем упоминаемых в статье реагентов.

Информация о вкладе авторов: М. Р. Рахматулина — анализ данных литературы, написание и редактирование текста; И. С. Галкина — анализ данных литературы, написание текста.

✉ **Для корреспонденции:** Маргарита Рафиковна Рахматулина
Новоясеневский проспект, д. 9, г. Москва, 117588; ra.marg@yandex.ru

Статья получена: 03.12.2019 **Статья принята к печати:** 18.12.2019 **Опубликована онлайн:** 25.12.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.088

QUANTITATIVE PCR IN DIAGNOSING INFECTIOUS UROGENITAL PATHOLOGY

Rakhmatulina MR¹✉, Galkina IS²

¹ Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Federal Research Institute for Health Organization and Informatics of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

This article describes the contemporary methods of diagnosing sexually transmitted infections, their advantages and disadvantages, indications for use. The authors describe application of quantitative polymerase chain reaction in diagnosing inflammatory diseases and dysbiotic conditions in men and women. This method, which is currently the “golden standard” in urogenital pathology diagnostics, has undeniable advantages over microbiological methods and qualitative polymerase chain reaction: the preanalytical stage requirements (preservation of quantitative ratios between microorganisms or nucleic acids of microorganisms) are not as strict, the risk of contamination from outside environment and subsequent corruption of the results is significantly smaller, the conditions for all microorganisms, including those impossible and hard to cultivate, are the same sensitivity and specificity-wise, it is possible to sample materials and evaluate microbiota (ratios of microorganisms and their groups) and also possible to collect samples non-invasively, the speed of testing is high.

Keywords: microbial biocenosis, urogenital infections, qPCR

Declarations: the authors declare a conflict of interests in connection with affiliation with DNA-Technology JSC, developer and manufacturer of the reagents mentioned in the article.

Author contribution: Rakhmatulina MR — literature data analysis, text authoring and editing; Galkina IS — literature data analysis, text authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Margarita R. Rakhmatulina
Novoyasenevsky Prospekt, 9, Moscow, 117588; ra.marg@yandex.ru

Received: 03.12.2019 **Accepted:** 18.12.2019 **Published online:** 25.12.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.088

Согласно оценкам современных исследователей, ежегодно более 357 млн людей оказываются инфицированными бактериальными возбудителями инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) [1, 2], а частота воспалительных заболеваний урогенитального тракта, вызванных аэробными и анаэробными условно-патогенными микроорганизмами, достигает 80% среди патологических состояний половой сферы [3–5].

С целью снижения заболеваемости и ликвидации ИППП была разработана Глобальная стратегия сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем (2009–2016, 2016–2021 гг.), одной из задач которой является обеспечение ранней диагностики данных

заболеваний, в том числе при отсутствии симптомов у инфицированных лиц, что создаст оптимальные условия для проведения результативного лечения и предупреждения дальнейшего распространения инфекционных агентов [2].

До недавнего времени «золотым стандартом» диагностики урогенитальных инфекций являлось культуральное исследование. Однако значительное количество этиологических агентов инфекционно-воспалительных процессов урогенитального тракта является труднокультивируемым или некультивируемым. Кроме того, трудоемкость и длительность выполнения культурального исследования существенно ограничивает его применение в рутинной клинической практике,

что требует внедрения новых технологий диагностики урогенитальной патологии.

Методы диагностики урогенитальных инфекций

В настоящее время подтверждение диагноза гонококковой инфекции на основании результатов микроскопического исследования рекомендовано только у мужчин с манифестными формами заболевания. Существенные недостатки микроскопии (субъективность оценки результата, низкая чувствительность (30–40%) при исследовании цервикальных, фарингеальных и ректальных проб, а также при бессимптомной инфекции) ограничивают его применение [6]. При обследовании детей, беременных, женщин в период менопаузы, при подозрении на экстрагенитальные и осложненные формы заболевания необходимо использовать культуральный и/или молекулярно-биологические методы. Чувствительность и специфичность молекулярно-биологических методов для идентификации *N. gonorrhoeae* достигают 100%. Они имеют приоритетное значение в диагностике бессимптомных

форм заболевания, при подозрении на микст-инфекцию, при скрининговых обследованиях, а также при наличии анамнестических и/или клинических признаков гонококковой инфекции и отрицательном результате микроскопического исследования или при наличии измененных грамотрицательных или грамвариабельных диплококков [7, 8].

В основе диагностики урогенитального трихомониаза лежат микроскопия нативного препарата, молекулярно-биологические и культуральный методы. Необходимое условие микроскопии нативного препарата — проведение исследования немедленно после получения биологического материала, что ограничивает применение данного метода. Микроскопическое исследование окрашенных препаратов не рекомендовано для диагностики, так как имеет самую низкую чувствительность и специфичность (30–60%) относительно других лабораторных методов (влагалищная трихомонада часто представлена округлыми формами, напоминающими полиморфноядерные лейкоциты, а ее типичные морфологические признаки теряются во время фиксации и окрашивания) [6].

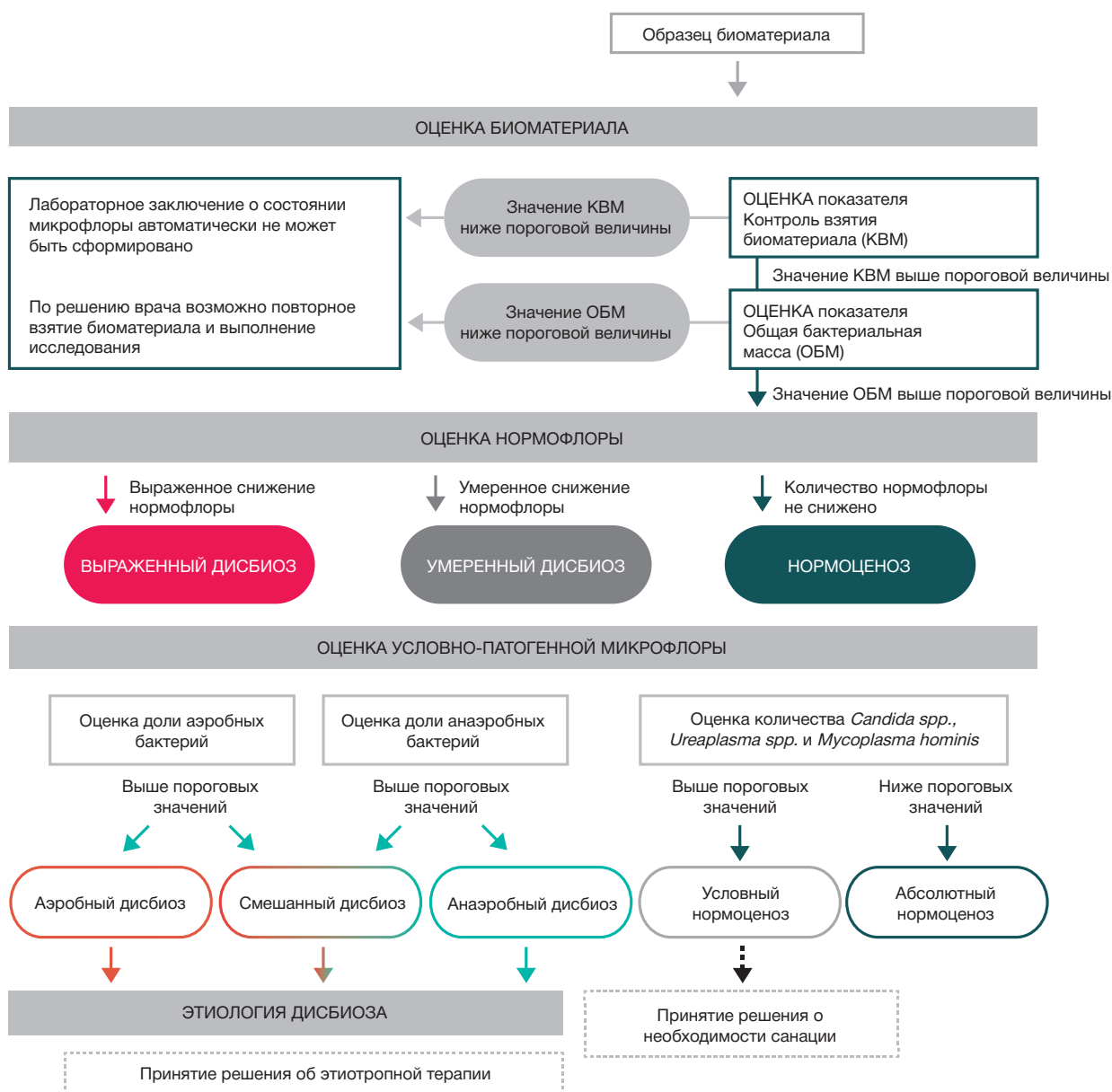


Рис. 1. Принципиальный алгоритм трактовки исследования микрофлоры урогенитального тракта женщин методом ПЦР-РВ

Чувствительность и специфичность культурального метода во многом зависят от состава питательных сред и от условий культивирования трихомонад. Метод отличается большей трудоемкостью и длительностью выполнения по сравнению с молекулярно-биологическими методами, чувствительность которых составляет 88–97%, а специфичность — 98–99%. Применение молекулярно-биологических тестов приоритетно при бессимптомном течении трихомониаза (наиболее часто наблюдающемся у лиц мужского пола), при подозрении на микст-инфекцию, при скрининговых обследованиях, а также для контроля качества микроскопического исследования [5, 8].

Для верификации диагноза хламидийной инфекции, заболеваний, вызванных *M. genitalium*, и вирусных ИППП (аногенитальной герпесвирусной и папилломавирусной инфекций) рекомендовано применение только молекулярно-биологических методов, обладающих высокими специфичностью и чувствительностью, практически приближающимися к 100% [5, 9].

Таким образом, молекулярно-биологические методы — полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-PB), NASBA — регламентированы для диагностики всех инфекций, передаваемых половым путем.

Возможности молекулярно-биологических методов в диагностике патологических состояний урогенитальной системы

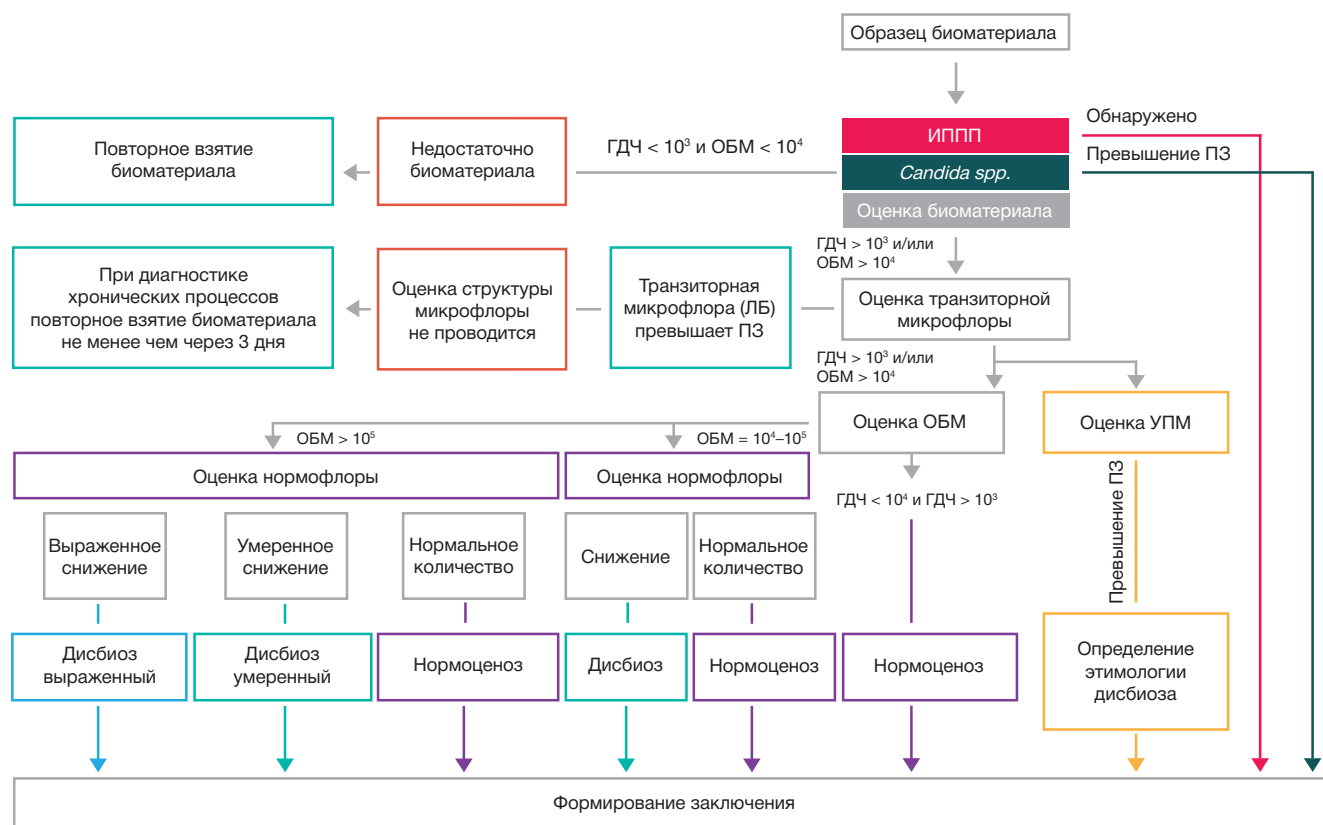
Внедрение метода ПЦР в клиническую практику имело поистине революционное значение для идентификации возбудителей ИППП. Однако на чувствительность исследования методом ПЦР могут влиять неправильно подобранные генетические мишени и/или различные

ингибирующие факторы, а проблемы со специфичностью при исследовании могут быть обусловлены присутствием в пробе непатогенных представителей того же рода/семейства микроорганизмов. Кроме того, ПЦР в качественном формате неинформативна для идентификации условно-патогенных микроорганизмов.

Модификацией метода ПЦР, совмещающей амплификацию с одновременной детекцией накопления ее продуктов непосредственно в процессе реакции, является метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-PB, или Real-Time PCR), позволяющий не только определять ДНК микроорганизма, но и проводить количественную оценку ее содержания в клинической пробе. ПЦР-PB не предполагает пост-амплификационного анализа продуктов реакции и извлечения содержимого пробирок, следовательно, значительно снижается риск контаминации проб, отсутствует необходимость в отдельной лабораторной зоне, сокращается общее время исследования и увеличивается объективность интерпретации его результатов [10].

До недавнего времени идентификация условно-патогенных аэробных микроорганизмов была возможна только культуральным методом, а анаэробные микроорганизмы, нередко являющиеся этиологическими агентами воспалительных и дисбиотических заболеваний мочеполовой системы, обнаружить не удавалось. Между тем известно, что эта группа бактерий часто конкурирует с лактобациллами за доминирующее место в биотопе, и при дисбиотических нарушениях у женщин, как правило, именно облигатно-анаэробные микроорганизмы колонизируют вагинальный эпителий [11].

В настоящее время адекватную диагностику ИППП и одновременное выявление дисбиотических состояний (аэробных/анаэробных вагинитов, уретритов, баланопоститов, бактериального вагиноза и др.),



Сокращения: ОБМ — общая бактериальная масса, ГДЧ — геномная ДНК человека, ЛБ — лактобациллы, УПМ — условно-патогенные микроорганизмы, ПЗ — пороговое значение.

Рис. 2. Принципиальный алгоритм трактовки исследования микрофлоры урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-PB

являющихся следствием нарушения баланса между условно-патогенными микроорганизмами и нормальной микробиотой мочевого тракта, позволяет обеспечить применение метода ПЦР-РВ. На сегодняшний день в России зарегистрирован ряд тест-систем на основе данного метода («Флороценоз», «Амплифлор», «Амплисенс» и др.), позволяющих проводить качественную и количественную оценку патогенных и условно-патогенных аэробных микроорганизмов. Так, тест-системы «Флороценоз» и «Амплифлор» позволяют идентифицировать лактобациллы, представителей рода *Candida*, семейства *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *G. vaginalis*, *A. vaginae*, условно-патогенные микоплазмы, но не дают возможности определять облигатно-анаэробные микроорганизмы. Из всех имеющихся методик наиболее полный спектр условно-патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов представлен в тестах «Фемофлор-16» и «Андрофлор». Применение данных уникальных «парных» тестов, разработанных соответственно для женщин и мужчин, позволяет выработать эффективный алгоритм лабораторного обследования пар и подбора терапии в случае выявления у одного/обоих партнеров заболеваний репродуктивной системы инфекционной этиологии либо нарушений репродуктивной функции (рис. 1, 2) [12, 13].

Одним из важнейших, с клинической точки зрения, параметров данных тестов является контроль качества взятия биоматериала — маркер достаточного количества эпителиальных клеток, попавших в транспортную среду при взятии соскоба. Данный показатель на начальных этапах обследования позволяет оценить адекватность получения биологического материала и избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов исследования [14, 15].

Абсолютные количественные результаты исследования в тестах ПЦР-РВ представляют в геном-эквивалентах

(ГЭ), значения которых пропорциональны микробной обсемененности урогенитального биотопа. Однако, по данным ряда исследователей, абсолютные количественные показатели не всегда коррелируют с выраженностью клинической картины заболевания, а превышение их пороговых значений — с наличием клинических проявлений инфекционно-воспалительного процесса. Так, еще в 1986 г. F. J. Roberts выявил уровень бактериурии ниже значимого у 30% пациентов с выраженными клинически и подтвержденными лабораторно бактериальными инфекциями мочеполовых путей, а в 1987 г. J. A. Kellogg с соавторами установили отсутствие корреляции между клиническими проявлениями уретрита и значимым уровнем бактериурии. В связи с этим наибольший практический интерес представляет определение относительных количественных показателей (долей) условно-патогенных микроорганизмов в виде логарифмической разницы и в процентах от общей бактериальной массы. Используя данный показатель, специалист имеет возможность оценивать в конкретном биологическом образце долю каждого микроорганизма или группы микроорганизмов, их превалирование над другими видами, в том числе над нормофлорой, что существенно повышает клиническую значимость исследования.

ВЫВОДЫ

Ранее дискредитированная излишней для урогенитальных патологий сверхчувствительностью ПЦР оправдывает себя благодаря внедрению в рутинную клиническую практику количественных ПЦР-тестов, позволяющих в формате экспресс-анализа комплексно оценивать состояние урогенитального биоценоза. Такой подход демонстрирует соотношение ключевых представителей микробного сообщества, снижая долю ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Литература

- Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet. 2018 Jun; 297 (6): 1377–87.
- Глобальная стратегия сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем. 2016–2021 гг. World Health Organization, 2016. Доступно по ссылке: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/ru/>
- Khan J, Farzand R. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum among women with unexplained infertility with and without vaginitis and cervicitis. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5 (8): 861–4.
- Красносельских Т. В., Манашева Е. Б., Гезей М. А. Коморбидность сифилиса и ВИЧ-инфекции: отрицательный эпидемиологический и клинический синергизм. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2018; 10 (3): 7–16.
- Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. М.: ДЭКС-пресс, 2012; 112 с.
- Долгов В. В., редактор. Клиническая лабораторная диагностика. Учебник в 2-х томах. М.: ООО «Лабдиаг», 2018; 624 с.
- European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults 2012. Доступно по ссылке: http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/ Gonorrhoea_2012.pdf.
- Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR, 2015; 64 (3).
- Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, Stary A, Radcliffe K, Unemo M. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. Int J STD AIDS. 2016 Apr; 27 (5): 333–48.
- Рахматулина М. Р., Шаталова А. Ю. Современные представления о микробиоценозе вагинального биотопа и его нарушениях у женщин репродуктивного возраста. Вестник дерматологии и венерологии. 2009; (3): 38–42.
- Ворошилина Е. С., Донников А. Е., Плотно Е. Э. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? Акушерство и гинекология. 2011; (1): 57–65.
- Болдырева М. Н., Галкина И. С. Андрофлор® – новый метод диагностики заболеваний урогенитального тракта мужчин. Медицинский алфавит. 2016; 3 (282): 40–1.
- Боровец С. Ю. Диагностическая значимость исследования микрофлоры эякулята у больных хроническим бактериальным простатитом методом PCR-RT «Андрофлор». Урологические ведомости. 2019; 9 (5): 22–3.
- Шипицына Е. В., Мартикайнен З. М., Воробьева Н. Е., Ермошкина М. С., Степанова О. С., Донников А. Е., и др. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища. Журнал акушерства и женских болезней. 2009; 58 (3): 44–50.
- Фомина О. В., Болотина Е. С. Опыт применения тест-системы

«Фемофлор-скрин» для оценки вагинальной микробиоты. В сборнике: IX Всероссийской научно-практической конференции

с международным участием. Молекулярная диагностика 2017; 2017 г. Москва: 379–80.

References

1. Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet. 2018 Jun; 297 (6): 1377–87.
2. Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections. 2016–2021. World Health Organization, 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/ru/>
3. Khan J, Farzand R. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum among women with unexplained infertility with and without vaginitis and cervicitis. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5 (8): 861–64.
4. Krasnoselskikh TV, Manasheva EB, Gezey MA. Komorbidnost' sifilisa i VICH-infektsii: otritsatel'nyy epidemiologicheskii i klinicheskii sinergizm. VICH-infektsiya i immunosupressii. 2018; 10 (3): 7–16. Russian.
5. Klinicheskie rekomendatsii po vedeniyu bol'nykh infektsiyami, peredavaemyimi polovym putem, i urogenital'nymi infektsiyami. M.: DEKS-press, 2012; 112 s. Russian.
6. Dolgov VV, redaktor. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Uchebnik v 2 tomakh. M.: OOO «Labdiag», 2018; 624 s. Russian.
7. European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults 2012. Available from: http://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2012/ Gonorrhoea_2012.pdf.
8. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR, 2015; 64 (3).
9. Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, Stary A, Radcliffe K and Unemo M. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. Int J STD AIDS. 2016 Apr; 27 (5): 333–48.
10. Rakhmatulina MR, Shatalova AYU. Sovremennye predstavleniya o mikrobiotsenoze vaginal'nogo biotopa i ego narusheniyakh u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta. Vestnik dermatologii i venerologii. 2009; (3): 38–42. Russian.
11. Voroshilina ES, Donnikov AE, Plotko EE. Biotsenoz vlagalishcha s tochki zreniya kolichestvennoy polimeraznoy tsepnoy reaktsii: chto est' norma? Akusherstvo i ginekologiya. 2011; (1): 57–65. Russian.
12. Boldyreva MN, Galkina IS. Androflor® — novyy metod diagnostiki zabolevaniy urogenital'nogo trakta muzhchin. Meditsinskiy alfavit. 2016; 3 (282): 40–1. Russian.
13. Borovets SYu. Diagnosticheskaya znachimost' issledovaniya mikroflory eyakulyata u bol'nykh khronicheskimi bakterial'nymi prostatitom metodom PCR-RT «Androflor». Urologicheskie vedomosti. 2019; 9 (S): 22–3. Russian.
14. Shipitsyna EV, Martikaynen ZM, Vorobeva NE, Ermoshkina MS, Stepanova OS, Donnikov AE, i dr. Primenenie testa Femoflor dlya otsenki mikrobiotsenoza vlagalishcha. Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney. 2009; 58 (3): 44–50. Russian.
15. Fomina OV, Bolotina ES. Opyt primeneniya test-sistemy «Femoflor-skrin» dlya otsenki vaginal'noy mikrobioty. V sbornike: IKh Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Molekulyarnaya diagnostika 2017. 2017 g. Moskva: 379–80. Russian.