

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

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

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

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Доронина

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

В. В. 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: 4

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Журнал включен в РИНЦ. IF 2018: 0,321

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2020-01

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



Подписано в печать 29.02.2020
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
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)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

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

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

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 4

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,321

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2020-01

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



Approved for print 29.02.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Сравнительный филогенетический анализ клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* России, стран Евросоюза и Японии

Б. Л. Шаскольский, И. Д. Кандинов, А. В. Честков, В. С. Соломка, А. А. Кубанов, Д. Г. Дерябин, Д. А. Грядун, Е. И. Дементьева

Comparative phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in Russia, European Union, and Japan

Shaskolskiy BL, Kandinov ID, Chestkov AV, Solomka VS, Kubanov AA, Deryabin DG, Gryadunov DA, Dementieva EI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

14

Возможности оценки микробиоты полости матки с использованием ПЦР в реальном времени

Е. С. Ворошилина, Д. Л. Зорников, О. В. Копосова, Д. К. Исламиди, К. Ю. Игнатова, Е. И. Абакумова, Н. В. Курбатова, Е. Э. Плотко

The Use of Real-Time PCR for Evaluation of Endometrial Microbiota

Voroshilina ES, Zornikov D, Kuposova OV, Islamidi DK, Ignatova KY, Abakumova EI, Kurbatova NV, Plotko EE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

22

Изониазид-резистентные *Mycobacterium tuberculosis*: частота выявления, спектры резистентности и генетические детерминанты устойчивости

С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов

Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence, resistance spectrum and genetic determinants of resistance

Andreevskaya SN, Smirnova TG, Larionova EE, Andrievskaya IYu, Chernousova LN, Ergeshov A

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

29

Наследственные факторы риска развития миомы матки: поиск маркерных однонуклеотидных полиморфизмов

К. А. Свирипова, М. В. Кузнецова, Н. С. Согоян, Д. В. Зеленский, Е. А. Лоломадзе, Г. В. Михайловская, Н. Д. Мишина, А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов

Hereditary risk factors for uterine leiomyoma: a search for marker SNPs

Svirepova KA, Kuznetsova MV, Sogoyan NS, Zelensky DV, Lolomadze EA, Mikhailovskaya GV, Mishina ND, Donnikov AE, Trofimov DYU

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

36

Значение однонуклеотидного полиморфизма некоторых генов системы биотрансформации ксенобиотиков в развитии острого панкреатита

Т. А. Самгина, П. М. Назаренко, А. В. Полоников, В. А. Лазаренко

The role of some xenobiotic biotransformation genes snp in the development of acute pancreatitis

Samgina TA, Nazarenko PM, Polonikov AV, Lazarenko VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

42

Активация коры головного мозга при выполнении задачи Стернберга на вербальную рабочую память

И. С. Бакулин, А. Х. Забирова, П. Н. Копнин, Д. О. Синицын, А. Г. Пойдашева, М. В. Федоров, Е. В. Гнедовская, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов

Cerebral cortex activation during the Sternberg verbal working memory task

Bakulin IS, Zabirowa AH, Kopnin PN, Sinitsyn DO, Poydasheva AG, Fedorov MV, Gnedovskaya EV, Suponeva NA, Piradov MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

51

Изучение фармакокинетики и нейропротекторной активности нового производного 4-фенилпирролидинона-2 в модели ишемического инсульта на животных

Д. А. Борозденко, Д. Н. Ляхман, Я. В. Голубев, Д. В. Тарасенко, Н. М. Киселева, Вад. В. Негребетский

Study of the new 4-phenylpyrrolidinone-2 derivative pharmacokinetics and neuroprotective effect in the ischemic stroke animal model

Borozdenko DA, Lyakhmun DN, Golubev YaV, Tarasenko DV, Kiseleva NM, Negrebetsky VadV

Морфологическая характеристика клинического случая болезни Бюргера

Н. С. Цимбалист, Б. А. Суфтин, А. В. Крючкова, Е. А. Чупятова, И. И. Бабиченко

Case report: morphological aspects of Buerger's disease

Tsimbalist NS, Suftin BA, Kriuchkova AV, Chupyatova EA, Babichenko II

Влияние острой соматической боли на киллинговую активность нейтрофилов новорожденных крыс

В. В. Алексеев, А. Х. Каде

The effect of acute somatic pain on the killing activity of neutrophils in newborn rats

Alekseev VV, Kade AKh

Прогностические критерии развития тяжелого постэмболизационного синдрома у пациенток с миомой матки

Э. Т. Нурмухаметова, М. Е. Шляпников

Prognosis criteria of the severe postembolization syndrome in patients with uterine myoma

Nurmukhametova ET, Shlyapnikov ME

Синтез нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола с противоэпилептической активностью

А. С. Малыгин, М. А. Демидова, С. Я. Скачилова, Е. В. Шилова

Synthesis of a novel amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole with antiepileptic activity

Malygin AS, Demidova MA, Skachilova SYa, Shilova EV

Оценка эффективности путей выявления опухолей женских половых органов на уровне первичного звена здравоохранения

А. Г. Бочкова, А. С. Доможирова, И. А. Аксенова

Efficiency of the gynecologic malignancies identification measures at the level of primary health care

Bochkova AG, Domozhirova AS, Aksenova IA

Непереносимость консервантосодержащих глазных капель при глаукоме: трудности диагностики, сложности лечения

М. А. Фролов, К. А. Казакова, Г. Н. Душина, А. М. Фролов, П. А. Гончар

Intolerance of preservative-containing eye drops in a glaucoma patient: diagnostic and therapeutic challenges

Frolov MA, Kazakova KA, Dushina GN, Frolov AM, Gonchar PA

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *NEISSERIA GONORRHOEAE* РОССИИ, СТРАН ЕВРОСОЮЗА И ЯПОНИИ

Б. Л. Шаскольский¹✉, И. Д. Кандинов¹, А. В. Честков², В. С. Соломка², А. А. Кубанов², Д. Г. Дерябин², Д. А. Грядун², Е. И. Дементьева¹

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, Россия

Мониторинг возбудителей инфекционных заболеваний, развивающих множественную устойчивость к антимикробным препаратам, является важной и актуальной задачей. Целью работы являлось генотипирование современных российских клинических изолятов *N. gonorrhoeae* по протоколу NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence types) и сравнительный филогенетический анализ возбудителя гонококковой инфекции в России, странах ЕС и Японии. Всего исследовано 822 изолята, собранных в РФ в период с 2013 по 2018 гг. Использовали также данные NG-MAST-типирования из баз данных «PathogenWatch» (страны ЕС, 1071 образец) и «PubMLST» (Япония, 206 образцов). Изоляты РФ принадлежали к 301 различному NG-MAST типу, наиболее распространенными являлись 807, 228, 1993, 5714, 9476 (8,3%; 3,3%; 3,2%; 3,2%; 2,7% соответственно). В РФ обнаружено только 3 изолята (0,4%) пандемически значимого NG-MAST 1407, характеризующегося множественными детерминантами резистентности к антимикробным препаратам и доминирующего во многих странах мира. Построено филогенетическое древо NG-MAST типов, найденных в России и в европейских странах. Кластерный анализ данных по доле изолятов с уникальными сиквенс-типами и численности населения показал существование двух кластеров (уровень значимости 0,01): первый составили Россия и Япония, второй — европейские страны. Показана тенденция в распределении уникальных сиквенс-типов — их доля тем выше, чем больше численность населения страны. Филогенетический анализ показал генетическую отдаленность наиболее распространенных российских, европейских и японских сиквенс-типов, что указывает на локальный характер формирования и эволюции российской популяции *N. gonorrhoeae*.

Ключевые слова: филогения *Neisseria gonorrhoeae*, NG-MAST

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-75-20039 (оценка генетического разнообразия сиквенс-типов) и Соглашения с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1660 (сбор и верификация клинических изолятов, определение соответствия уникальных сиквенс-типов и численности населения). Секвенирование изолятов выполнено в ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Вклад авторов: Б. Л. Шаскольский, Е. И. Дементьева, И. Д. Кандинов — проведение исследования, анализ данных, написание статьи; Д. А. Грядун — организация исследования, работа над рукописью; А. В. Честков, В. С. Соломка, А. А. Кубанов, Д. Г. Дерябин — сбор и верификация клинических изолятов, анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Государственного научного центра дерматовенерологии и косметологии (протокол № 11 от 29 ноября 2019 г.). Отбор биологического материала для исследования был произведен с учетом положений Хельсинской декларации ВМА (2000) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999).

✉ **Для корреспонденции:** Борис Леонидович Шаскольский
ул. Вавилова, д. 32, г. Москва, 119991; b.shaskolskiy@biochip.ru

Статья получена: 09.01.2020 **Статья принята к печати:** 08.02.2020 **Опубликована онлайн:** 21.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.009

COMPARATIVE PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* CLINICAL ISOLATES IN RUSSIA, EUROPEAN UNION, AND JAPAN

Shaskolskiy BL¹✉, Kandinov ID¹, Chestkov AV², Solomka VS², Kubanov AA², Deryabin DG², Gryadunov DA¹, Dementieva EI¹

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Surveillance of multidrug-resistant infections is a priority task for contemporary epidemiology. The aim of this study was to genotype modern clinical isolates of *N. gonorrhoeae* using the NG-MAST technique (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing) and to compare the phylogeny of the gonococcal pathogens coming from Russia, European Union and Japan. We studied a total of 822 isolates collected in Russia from 2013 through 2018. We also used NG-MAST data from the following databases: PathogenWatch (European Union, 1,071 isolates) and PubMLST (Japan, 206 isolates). Russian isolates represented 301 different NG-MAST types. The most common were types 807, 228, 1993, 5714, and 9476 (8.3%, 3.3%, 3.2%, 3.2%, and 2.7%, respectively). There were only 3 isolates (0.4%) from Russia that represented the epidemiologically significant sequence type 1407 prevailing in many countries and characterized by multiple determinants of antimicrobial resistance. A phylogenetic tree for the NG-MAST types found in Russia and European countries was constructed. The cluster analysis of the proportion of isolates belonging to unique sequence types and the country population size allowed us to identify 2 clusters (significance level — 0.01): the first cluster included Russia and Japan, the second, European countries. A distribution pattern was identified for unique sequence types: the greater is the population size, the higher is their proportion. The phylogenetic analysis demonstrated a genetic distance between the most common Russian, European and Japanese sequence types, suggesting that the Russian population of *N. gonorrhoeae* has been evolving relatively locally.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, NG-MAST, phylogenetic analysis

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project 17-75-20039 on the assessment of genetic diversity of sequence types) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2019-1660 on the collection and verification of clinical isolates and the establishment of the association between the unique sequence types and the population size). The isolates were sequenced at the facilities of the *Genome* center for collective use (Engelhardt Institute of Molecular Biology; http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Author contribution: Shaskolskiy BL, Dementieva EI, Kandinov ID carried out the study, analyzed the data and wrote the manuscript; Gryadunov DA supervised the study and wrote the manuscript; Chestkov AV, Solomka VS, Kubanov AA, Deryabin DG collected and verified clinical isolates, analyzed the obtained data.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the State Research Centre of Dermatovenereology and Cosmetology (Protocol № 11, dated November 29, 2019). Specimens were collected in compliance with the Declaration of Helsinki (2000) and the European Convention on Human Rights and Biomedicine (1999).

✉ **Correspondence should be addressed:** Boris L. Shaskolskiy
Vavilova, 32, Moscow, 119991; b.shaskolskiy@biochip.ru

Received: 09.01.2020 **Accepted:** 08.02.2020 **Published online:** 21.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.009

Методы молекулярно-генетического типирования, выявляющие внутривидовую вариабельность бактериальных патогенов, с начала XXI в. активно используют для проведения эпидемиологических исследований [1]. Особую актуальность типирование приобрело для мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний, развивающих множественную устойчивость к антимикробным препаратам, в частности, возбудителя гонореи *Neisseria gonorrhoeae*. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила *N. gonorrhoeae* в список из 12 патогенов, представляющих глобальную угрозу и требующих безотлагательной разработки новых лекарственных препаратов [2].

Задачу контроля и слежения за глобальным и региональным распространением эпидемически значимых, в том числе мультирезистентных, клонов *N. gonorrhoeae* решают такими методами молекулярного типирования, как NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing) и MLST (Multilocus sequence typing) [3, 4], а также полногеномным секвенированием (WGS) [5]. Наиболее полная информация о филогении исследуемых клинических изолятов может быть получена с использованием WGS, однако применение этого подхода в рутинной практике пока ограничено его относительно высокой стоимостью и требованиями к качеству анализируемого образца ДНК. Методом MLST, первоначально разработанным для молекулярного типирования *N. meningitidis*, анализируют гены, более консервативные, чем гены *porB* и *tbpB*, используемые в NG-MAST-типировании. В связи с этим NG-MAST остается основным и широко используемым методом, позволяющим исследовать эволюцию патогена и определять пути распространения инфекции [4, 6]; показана высокая разрешающая способность метода при анализе клинических изолятов [7, 8].

Метод NG-MAST основан на определении нуклеотидных последовательностей вариабельных участков двух генов, кодирующих трансмембранный белок порин (*porB*) и трансферринсвязывающий белок (*tbpB*). По результатам их секвенирования каждой уникальной последовательности присваивают оригинальный номер аллеля и каждой совокупности аллелей — номер сиквенса-типа (ST). По мере выявления новых аллелей их перечень постоянно

дополняют, и к настоящему времени (январь 2020 г.) в базе данных www.ng-mast.net представлено более 11 000 аллелей *porB* и свыше 2900 аллелей *tbpB*, определяющих существование более 19 500 NG-MAST типов.

Целью исследования являлись NG-MAST-типирование современных российских клинических изолятов *N. gonorrhoeae* и сравнительный филогенетический анализ возбудителей гонококковой инфекции в России, странах Европейского Союза и Японии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические изоляты *N. gonorrhoeae* (822 образца) получены Государственным научным центром дерматовенерологии и косметологии (Москва) из 17 регионов Российской Федерации в рамках долговременной программы мониторинга гонококковой инфекции RU-GASP (Russian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme). Изоляты собраны в период с 2013 по 2018 г. Регионы РФ включали Архангельскую, Астраханскую, Брянскую, Иркутскую, Калужскую, Новосибирскую, Омскую, Пензенскую, Псковскую, Рязанскую, Томскую и Челябинскую области, г. Москву, Ставропольский край, Республику Татарстан, Республику Тыва и Чувашскую Республику (таким образом, были охвачены 7 из 8 федеральных округов РФ, кроме Дальнего Востока). Образцы поступали из специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля, каждый образец от отдельного пациента. Количество клинических изолятов варьировало в зависимости от плотности населения и показателей заболеваемости гонококковой инфекцией в регионе, в относительных величинах составляя 1–10% от общего количества зарегистрированных случаев заболевания, а в абсолютных — 5–35 штаммов в год. Сбор клинических изолятов, их транспортировка, культивирование, верификация и хранение подробно описаны [9–11]. Данные по количеству проанализированных клинических изолятов для каждого года исследования представлены в табл. 1.

Молекулярное типирование *N. gonorrhoeae* проводили путем анализа нуклеотидных последовательностей

Таблица 1. Наиболее часто встречающиеся NG-MAST-типы в России (2013–2018 гг.)

Год	Число проанализированных клинических изолятов (число выявленных сиквенса-типов)	Наиболее распространенные сиквенса-типы	Доля образцов данного сиквенса-типа, %
2013	160 (81)	807	13,1
		1152*	5,6
		5941*	3,7
2015	123 (57)	9476*	11,4
		807	8,1
		1544*, 571	4,9
2016	261 (128)	807	6,5
		5714*	6,1
		1993	4,6
2017	127 (63)	807	10,2
		1751*	6,3
		13058*	5,5
2018	151 (67)	228*	14,6
		14942*	5,3
		807, 1993, 14020*	4,6

Примечание: * — NG-MAST-типы, уникальные для России.

вариабельных участков генов *porB* (490 пн) и *tbpB* (390 пн) в соответствии с протоколом NG-MAST [12]. После первого раунда ПЦР-амплификации и очистки полученные фрагменты ДНК секвенировали по Сэнгеру с использованием 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems; США). Определенные последовательности аллелей сравнивали с последовательностями из базы данных NG-MAST database (www.ng-mast.net), и делали заключение о принадлежности исследуемого клинического изолята к определенному сиквенс-типу. Обнаруженные новые последовательности аллелей *porB* и *tbpB* или их сочетания регистрировали в указанной выше международной базе данных с присвоением номеров NG-MAST.

При характеристике образцов *N. gonorrhoeae* из стран ЕС использовали данные NG-MAST типирования, представленные в базе данных <https://pathogen.watch/collection/eurogasp2013>. Всего в анализ включили 1071 изолят из 21 страны: Австрии, Бельгии, Великобритании, Венгрии, Германии, Греции, Дании, Ирландии, Исландии, Испании, Италии, Кипра, Латвии, Мальты, Нидерландов, Норвегии, Португалии, Словакии, Словении, Франции и Швеции. Данные по NG-MAST-типированию *N. gonorrhoeae* в Японии (2015 г.) были представлены сведениями о 206 клинических изолятах из базы данных <https://pubmlst.org/> (нами выбраны образцы *N. gonorrhoeae* с известными вариантами *porB* и *tbpB*). Изоляты со смешанным или неопределенным NG-MAST-типом не учитывали. Таким образом, из исходной выборки (страны ЕС и Япония) было удалено 29 изолятов, что составило 1,4% от всего объема выборки.

Для филогенетического анализа использовали конкатенированные последовательности генов *porB* и *tbpB*. С использованием Байесовского критерия и информационного критерия Акаике было показано, что лучшая модель замен для наших данных — GTR с вычислением пропорции инвариантных сайтов и Г-моделью гетерогенной скорости. Для полученных последовательностей и выбранной модели методом максимального правдоподобия в программе RAxML ver. 7.4.8 [13] построено филогенетическое древо с числом итераций 999 на платформе <http://galaxy-dev.cnsi.ucsb.edu/osiris/>. Для построения древа использовали данные для российских и европейских клинических изолятов *N. gonorrhoeae* за 2013 г. Для клад на филогенетическом древе достоверными считали значения уровня поддержки (bootstrap value) 90% и выше.

Данные по численности населения и доле изолятов уникальных сиквенс-типов по странам анализировали, используя иерархическую агломеративную кластеризацию методом Варда в пакете «cluster» для языка R. Для определения оптимального числа кластеров использовали пакет «Nbclust» [14]. Информация о численности населения стран и коэффициенты миграционного прироста (число мигрантов на 1000 человек населения) взяты из The World Factbook, <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/>.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам молекулярного типирования, 822 клинических изолята *N. gonorrhoeae*, собранных в России в период с 2013 по 2018 г., были отнесены к 301 различному NG-MAST-типу. Наиболее распространенными сиквенс-типами были 807, 228, 1993, 5714, 9476 (8,3%; 3,3%; 3,2%; 3,2%; 2,7% от общей численности анализируемой

выборки соответственно). В 2013 г. изоляты NG-MAST 807 составляли более 13% российской популяции *N. gonorrhoeae*, а далее их доля постепенно уменьшалась от года к году до 4,6% в 2018 г. (см. табл. 1). Представители сиквенс-типов 807 и 1993 обнаружены также среди образцов, полученных в европейских странах, однако в Европе они встречались спорадически: NG-MAST 807 — в Испании и Словакии и NG-MAST 1993 — в Дании. В 2018 г. на первом месте в России по распространенности оказался уникальный российский тип NG-MAST 228, сформировавший 14,6% популяции. Доля российских изолятов, относящихся к уникальным российским сиквенс-типам (см. табл. 1, отмечены звездочкой), в общем числе сохранилась (2013–2018) и в среднем составляла около 80%.

Следует отметить высокую долю сиквенс-типов, представленных одним образцом, которая сохранялась год от года и равнялась 25–31% от общего количества изолятов. Для образцов *N. gonorrhoeae* стран ЕС эта доля в 2013 г. составила 24% [6].

Результаты молекулярного типирования *N. gonorrhoeae* в странах Европы [5, 6], а также наиболее часто встречающиеся сиквенс-типы представлены в табл. 2. В европейских странах в 2013 г. обнаружено 389 сиквенс-типов, наиболее распространенным среди которых был NG-MAST 1407, встречающийся в 13 странах и составивший 7,3% от общей численности проанализированных клинических изолятов.

Популяция *N. gonorrhoeae* Японии (см. табл. 2) сильно отличалась как от российской, так и от европейской. Изоляты из Японии принадлежали к 65 молекулярным типам, из них только два сиквенс-типа присутствовали в России и в европейских странах: NG-MAST 1407 (в странах ЕС и в России) и NG-MAST 4186 (один образец этого типа в Швеции), остальные 63 молекулярных типа были уникальными для Японии.

Для определения филогенетического родства клинических изолятов *N. gonorrhoeae* Европы и России построено филогенетическое древо по максимальному правдоподобию. Филогенетическое древо с раскраской, соответствующей наличию NG-MAST-типа в той или иной стране, представлено на рис. 1.

Анализ расположения сиквенс-типов изолятов, полученных в России и Европе, на древе позволил выделить 16 клад с высокими значениями уровня поддержки (более 90%) (см. рис. 1). Некоторые клады полностью либо частично соответствуют европейским геногруппам, установленным в докладе Европейского центра профилактики и контроля болезней для образцов *N. gonorrhoeae*, полученных в Европе в 2013 г. [6].

Клада α (уровень поддержки 100) включает 40 NG-MAST-типов (82 изолята) из 17 стран Европы и России, из них 6 сиквенс-типов принадлежат 7 российским изолятам (8,5%). Клада включает NG-MAST 5624 (15 образцов из 7 стран) и соответствует ранее установленной европейской геногруппе G5624 [6].

Клада β (уровень поддержки 94) состоит из 33 сиквенс-типов (91 изолят), включая часто встречающиеся в Европе NG-MAST 225 (24 образца из 12 европейских стран) и NG-MAST 292 (15 образцов из 6 стран, из них один образец из России). Российские образцы в данной кладе представлены 19 изолятами (21,3%), принадлежащими к 12 сиквенс-типам. Клада β соответствует европейской геногруппе G225 [6].

Клада γ (уровень поддержки 96) состоит из 14 сиквенс-типов (98 изолятов), полученных в 17 странах Европы (из

Таблица 2. Наиболее часто встречающиеся NG-MAST-типы в странах ЕС и Японии

Страна (код страны)	Год	Число проанализированных клинических изолятов (число выявленных сиквенс-типов)	Наиболее распространенные сиквенс-типы	Доля образцов данного сиквенс-типа, %
Австрия (AT)	2013	50 (24)	3785* 11575* 387, 4994	18,0 12,0 8,0
Бельгия (BE)	2013	55 (24)	1407 387, 2992 2400, 5624	16,4 14,5 7,3
Кипр (CY)	2013	6 (4)	1407 4269, 6146*, 10803*	49 17,0
Германия (DE)	2013	45 (30)	4995 359, 5441, 9500*	8,9 6,7
Дания (DK)	2013	54 (28)	1993 1407 2400	20,4 14,8 7,4
Испания (ES)	2013	110 (64)	1407 2400 21	10,0 9,1 7,3
Франция (FR)	2013	56 (40)	645 4995, 5624, 11352*	8,9 5,4
Греция (GR)	2013	48 (20)	3128 225, 4730, 11055*	18,8 10,4
Венгрия (HU)	2013	46 (20)	1407 995 387, 11046*	21,7 13,0 6,5
Ирландия (IE)	2013	44 (26)	2992 384 21, 225, 437, 649*, 2400, 10843*, 10846*	15,9 11,4 4,5
Исландия (IS)	2013	5 (5)	1034, 2400, 9541*, 10640*, 11080*	20,0
Италия (IT)	2013	24 (13)	2992 6360 5624, 8826*	33,3 12,5 8,3
Латвия (LV)	2013	38 (15)	5 10828* 21, 4269	36,8 13,2 7,9
Мальта (MT)	2013	20 (10)	2992 1407, 484*, 9905*, 10788*	35,0 10,0
Нидерланды (NL)	2013	66 (38)	2992 2400 4995, 5624, 8154, 8919	13,6 12,1 4,5
Норвегия (NO)	2013	55 (41)	1407 4275 2400	9,1 7,3 5,5
Португалия (PT)	2013	103 (54)	1407 7445 1034	16,5 11,7 4,9
Швеция (SE)	2013	49 (31)	5445 3128, 7164, 7445	10,2 6,1
Словения (SI)	2013	53 (26)	21 10800, 10801* 10798*, 10799*	13,2 11,3 7,5
Словакия (SK)	2013	38 (19)	1407, 10800, 11042* 359, 2992	13,2 10,5
Великобритания (UK)	2013	106 (52)	2992 51 4995	11,3 10,4 6,6
Польша (PL)**	2012	–	1407 8391* 1861, 2992	47,0 7,0 5,0
Япония (JP)	2015	206 (65)	5687* 1407 6778*	7,8 6,3 4,4

Примечание: * — NG-MAST-типы, уникальные для данной страны; ** — наиболее часто встречающиеся NG-MAST-типы для Польши, описанные в [17].

России — один изолят), из них 78 образцов принадлежат сиквенс-типу NG-MAST 2992 (2-е место в Европе по распространенности). Клада Υ соответствует европейской геногруппе G2992 [6].

Клада δ (уровень поддержки 98) включает 3 сиквенс-типа (образцы из Португалии, Норвегии, Великобритании). Клада ε (уровень поддержки 100) состоит из 4 сиквенс-типов (4 изолята из Норвегии, Греции и Великобритании). Клада ζ (уровень поддержки 100) включает только уникальные российские сиквенс-типы (7 образцов, принадлежащих 5 NG-MAST-типам).

Клады η и θ (уровни поддержки 98 и 90 соответственно) включают только европейские сиквенс-типы, не обнаруженные в России. Клада η состоит из 9 NG-MAST-типов (16 образцов), клада θ — из 11 сиквенс-типов (34 образца). NG-MAST-типы этих двух клад принадлежат одной европейской геногруппе G5333 [6].

Клада ι (уровень поддержки 98) состоит из 4 сиквенс-типов (4 образца, полученных в Португалии, Италии и Нидерландах).

Клада К (уровень поддержки 94) содержит 4 европейских сиквенс-типа (36 образцов), в том числе сиквенс-тип NG-MAST 4995 (4-е место в Европе по распространенности, обнаружен в 10 европейских странах), к которому принадлежит 31 изолят. Клада К соответствует европейской геногруппе G4995 [6].

В кладу λ (уровень поддержки 95) входят 3 сиквенс-типа европейских стран: 10 образцов, из них 8 принадлежит NG-MAST 5441, обнаруженному в 5 странах.

Клада μ (уровень поддержки 94) состоит из 4 сиквенс-типов (10 образцов, обнаруженных в Греции, Дании, Словении, Португалии). Клада ν (уровень поддержки 98) включает 3 сиквенс-типа (5 образцов из 5 европейских стран).

В кладу ξ (уровень поддержки 100) входят три сиквенс-типа (4 образца из Ирландии и Дании). Клада ο (уровень поддержки 98) состоит из 5 NG-MAST-типов (17 образцов), включающих часто встречающиеся в России типы NG-MAST 1993 и 5714.

Клада π (уровень поддержки 97) включает 7 сиквенс-типов (12 изолятов), обнаруженных как в России, так и в

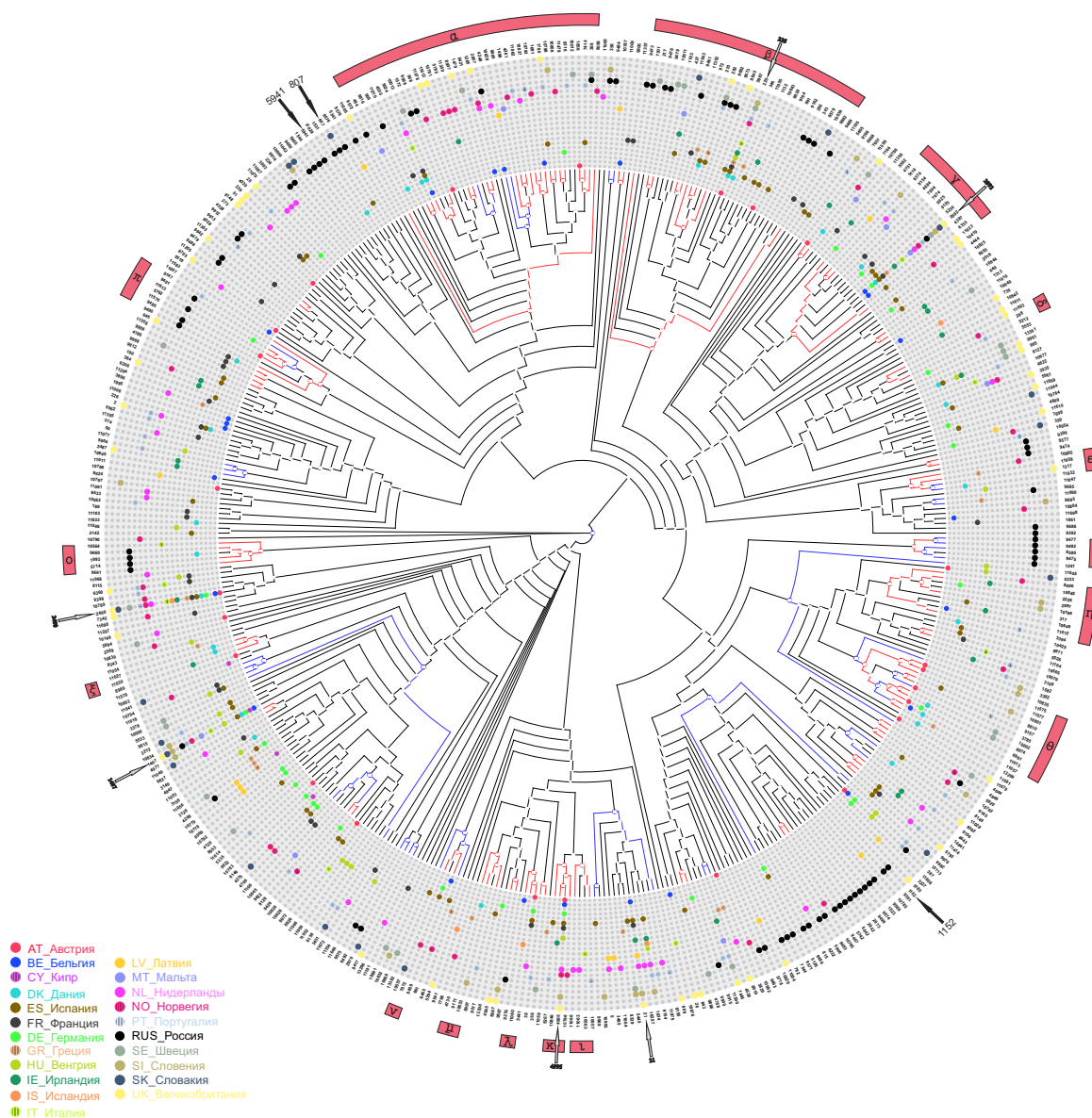


Рис. 1. Филогенетическое древо NG-MAST-типов *N. gonorrhoeae*, обнаруживаемых в России и странах ЕС. Синими линиями на древе обозначены ветви со значением уровня поддержки 80–89, красным — со значением уровня поддержки 90–100. Филогенетические клады (уровень поддержки $\geq 90\%$) обозначены греческими буквами α–π. Черными стрелками показаны NG-MAST-типы, наиболее часто встречающиеся в России, серыми заштрихованными стрелками — NG-MAST-типы, наиболее распространенные в европейских странах

европейских странах. Сюда входят уникальные российские сиквенс-типы NG-MAST 5792, 9485, 9490, 9491.

Для каждой страны были обнаружены изоляты, принадлежащие к уникальным сиквенс-типам, не найденным в других странах. Доля изолятов с уникальными сиквенс-типами от общего количества изолятов в стране в европейских странах варьировала от 25 до 56%, наименьшие значения у Великобритании и Бельгии, наибольшие у Австрии, Словении, Швеции (> 50%). Для России и Японии доля изолятов с уникальными сиквенс-типами превышала 80% (табл. 3).

Для нахождения групп со сходными параметрами распространения уникальных сиквенс-типов и их связи с численностью населения страны проведен кластерный анализ, включающий 21 страну (см. табл. 3). Из анализа были исключены Кипр и Исландия из-за малого количества доступных образцов (6 и 5 соответственно). После проведения иерархической кластеризации методом Варда оптимальное число кластеров определили с помощью пакета «NbClust» для языка R, используя правило большинства. Девять методов (Silhouette, Duda, PseudoT2, Beale, Ratkowsky, PtBiserial, McClain, Dunn, SDindex) из 30 показали, что оптимально разбиение стран на два кластера (уровень значимости 0,01), шесть методов (Hartigan, Scott, Marriot, TrCovW, TraceW, Ball) показали, что оптимально разбиение на три кластера. В соответствии с правилом большинства было принято решение, что оптимальным является разбиение на два кластера, но в то же время имеется статистическое обоснование для разбиения кластера 2 на два подкластера (рис. 2А).

В первый кластер входят Россия и Япония — страны с населением свыше 125 млн человек, во второй — все европейские страны с населением 0,4–81 млн человек. Второй кластер подразделен на два подкластера 2а и 2б; подкластер 2а включает Великобританию, Германию,

Испанию, Италию и Францию — страны с населением 47–81 млн человек, подкластер 2б включает европейские страны с численностью населения менее 17 млн человек (Ирландия, Норвегия, Дания, Словакия, Мальта, Латвия, Словения, Нидерланды, Бельгия, Португалия, Греция, Австрия, Венгрия, Швеция).

В целом, изолятов с уникальными сиквенс-типами тем больше, чем больше население страны, что видно на примере стран с численностью населения свыше 47 млн человек, входящих в кластер 1 и подкластер 2а (рис. 2Б). Для стран кластера 2б с меньшей численностью населения такой зависимости не наблюдается. Переход из кластера 2 в кластер 1 происходит для стран с численностью населения более 125 млн человек (Россия, Япония).

Интересно было также проанализировать вклад мобильности населения (миграции) в распределение образцов уникальных сиквенс-типов по странам. При анализе только коэффициентов миграции по странам и доли образцов уникальных сиквенс-типов не удалось выявить кластеры, подтверждаемые статистическими критериями. При кластерном анализе трех параметров (миграции населения, численности населения и доли образцов уникальных сиквенс-типов) коэффициент агломерации оказался равен 0,83, что ниже, чем коэффициент 0,93, полученный при анализе двух параметров: численности населения и доли образцов уникальных сиквенс-типов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение результатов молекулярного типирования изолятов *N. gonorrhoeae* в России, странах Европы и в Японии показало существенные различия между популяциями гонококка. Большинство российских изолятов обладали сиквенс-типами, не встречающимися в анализируемый период в европейских странах и Японии. Так, в России обнаружено

Таблица 3. Распределение образцов уникальных NG-MAST-типов по странам (2013 г.)

Страна	Число уникальных сиквенс-типов	Число изолятов с уникальными сиквенс-типами	Доля изолятов с уникальными сиквенс-типами от общего числа образцов, %	Население, тыс. чел.	Коэффициент миграционного прироста
Россия	73	129	80,6	142 500	1,69
Япония	63	192	93,2	126 920	0
Германия	15	18	40,0	81 147	0,89
Франция	24	27	48,2	65 952	1,10
Великобритания	24	27	25,5	63 396	2,57
Италия	6	7	29,2	61 482	4,47
Испания	31	36	32,7	47 370	6,14
Нидерланды	18	19	28,8	16 805	1,99
Португалия	32	40	38,8	10 799	2,82
Греция	10	21	43,8	10 773	2,32
Бельгия	13	14	25,5	10 444	1,22
Венгрия	10	14	30,4	9 939	1,36
Швеция	19	25	51,0	9 119	1,64
Австрия	13	28	56,0	8 222	1,78
Дания	14	17	31,5	5 556	2,30
Словакия	9	13	34,2	5 488	0,28
Ирландия	12	15	34,1	4 776	2,51
Норвегия	20	21	38,2	4 723	1,68
Латвия	11	16	42,1	2 178	– 2,36
Словения	14	27	50,9	1 993	0,38
Мальта	5	8	40,0	411	1,99

только 3 образца (0,4%) пандемически значимого молекулярного типа 1407, который доминировал в Бельгии, Венгрии, Дании, Испании, Норвегии, Португалии, Словакии, а также в Японии. Следует отметить, что изоляты этого молекулярного типа еще в 2010 г. составляли более 10% во многих европейских странах, в том числе в Австрии, Бельгии, Великобритании, Голландии, Испании, Италии, Португалии, Румынии, Словении, Польше [15–17], Японии и США [18, 19]. Этот сиквенс-тип представляет большую опасность, так как в нем обнаружены множественные детерминанты резистентности к антимикробным препаратам, включающие мозаичный тип пенициллинсвязывающего белка PBP2 и дополнительную мутацию остатка Ala501 в PBP2, вызывающие устойчивость к цефалоспорином [16, 20, 21].

В России присутствовало только 3 образца *N. gonorrhoeae* NG-MAST типа 2992 (0,4%) и 7 образцов типа 2400 (0,9%), которые занимали второе и третье места по распространенности в Европе в 2013 г. (7,0 и 4,7% соответственно). Напротив, в европейских странах не были обнаружены NG-MAST-типы 228, 5714, 1751, которые входили в число ключевых среди российских изолятов.

Сравнение с ситуацией в соседней с Россией Польше (данные по этой стране отсутствовали в базе данных EUROGASP и были взяты из работы [17]) показало, что распределение NG-MAST-типов в Польше ближе к европейским странам, чем к России, с доминированием NG-MAST 1407 (см. табл. 2).

Анализ филогенетического древа NG-MAST-типов клинических изолятов Европы и России демонстрирует, что популяция *N. gonorrhoeae* как в России, так и в Европе гетерогенна. Существуют сиквенс-типы, одновременно присутствующие в разных странах, и в то же время в одной стране обнаружены изоляты, принадлежащие к филогенетически неблизким кладам. Не наблюдается близкого филогенетического родства между наиболее распространенными европейскими сиквенс-типами NG-MAST 1407, 2992, 2400, 4995, 21, 225, которые в сумме составляют более четверти (25,9%) от всех европейских штаммов: данные сиквенс-типы филогенетически далеки друг от друга и распределены по всему древу. Следует также отметить отсутствие близкого родства

между наиболее распространенными европейскими и российскими сиквенс-типами, такими как NG-MAST 807, 1152, 5941. На древе выделено 16 клад с высокими значениями уровня поддержки, которые полностью либо частично соответствуют европейским геногруппам [6].

Дальнейший филогенетический анализ NG-MAST-типов позволил заключить, что географически разделенные популяции *N. gonorrhoeae* эволюционируют относительно локально. Это может быть одной из причин различий в уровне и динамике заболеваемости гонококковой инфекцией в России и странах ЕС [22]: в России наблюдается тенденция к снижению заболеваемости гонореей [9, 23], при этом не обнаружено изолятов, обладающих устойчивостью к цефтриаксону (основной препарат, используемый для лечения гонореи) [9, 10].

Нами проанализирована связь между долей изолятов с уникальными сиквенс-типами и численностью населения страны, в которой их обнаружили. В России и Японии преобладающая доля изолятов (> 80%) относилась к уникальным для данной страны NG-MAST-типам. Кластерный анализ данных по доле изолятов с уникальными сиквенс-типами, обнаруженными в данной стране, и численности населения страны показал существование двух кластеров: первый кластер включал Россию и Японию с численностью населения свыше 125 млн человек, второй — анализируемые европейские страны с численностью населения 0,4–81 млн человек. В целом, показана тенденция в распределении уникальных сиквенс-типов: их доля тем выше, чем больше численность населения страны.

ВЫВОДЫ

NG-MAST-типирование российских клинических изолятов *N. gonorrhoeae* показало их существенное отличие от современных популяций возбудителей гонококковой инфекции в странах ЕС и Японии. Наиболее широко распространенные в России молекулярные типы NG-MAST 807, 1152 и 5941 в других странах представлены спорадически, а NG-MAST 228, 5714 и 1751 вообще не обнаружены. За период 2013–2018 гг. в России выявлено только три образца пандемически значимого молекулярного типа 1407 (0,4% от общей численности анализируемой

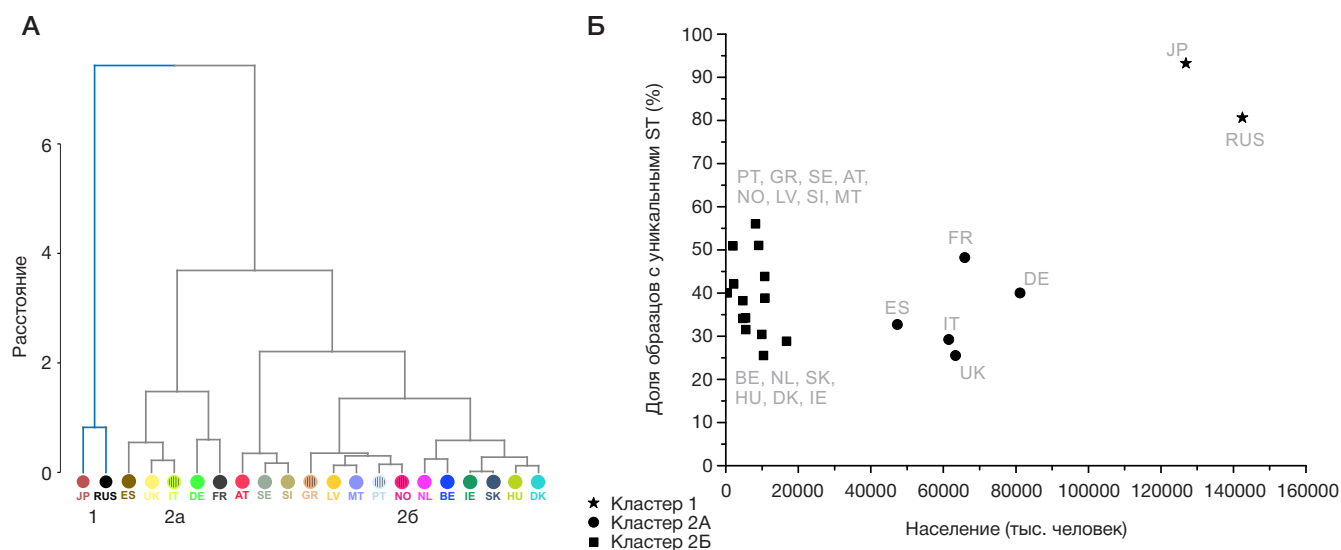


Рис. 2. Ассоциации между долей изолятов *N. gonorrhoeae* с уникальными сиквенс-типами и численностью населения стран, в которых они были обнаружены. Кодовые обозначения стран см. в табл. 1. **А.** Дендрограмма разбиения на кластеры. Выделенные кластеры обозначены цифрами. **Б.** Зависимость доли клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, принадлежащих к уникальным сиквенс-типам, от численности населения

выборки), который представляет большую опасность из-за наличия множественных детерминант резистентности к антимикробным препаратам и доминирует во многих странах ЕС и Японии.

Филогенетический анализ NG-MAST-типов для изолятов России и стран ЕС показал их высокую генетическую гетерогенность, а также генетическую отдаленность распространенных европейских сиквенс-типов и сиквенс-типов, наиболее часто встречающихся в России, что указывает на локальный характер формирования и эволюции российской популяции *N. gonorrhoeae*.

Преобладающая (> 80%) доля российских и японских изолятов относилась к уникальным для данной страны NG-MAST-типам, что гораздо выше, чем доля изолятов уникальных типов в европейских странах. Кластерный анализ данных по доле изолятов с уникальными сиквенс-типами и численности населения показал существование двух кластеров: Россия и Япония в одном и европейские

страны в другом. При этом в странах с численностью населения более 47 млн человек (Великобритании, Германии, Испании, Италии, Франции, России и Японии) чем больше население, тем больше доля изолятов уникальных сиквенс-типов. Не удалось выявить зависимости доли изолятов с уникальными сиквенс-типами от миграции (мобильности) населения.

Таким образом, проведенный филогенетический анализ выявил относительную изолированность современной российской популяции *N. gonorrhoeae*, эволюционирующей на основе собственных закономерностей. Тем не менее сохраняется необходимость непрерывного динамического контроля за распространением гонококковой инфекции и антибиотикорезистентностью изолятов *N. gonorrhoeae* в РФ, целью которого являются своевременное выявление и эффективная элиминация глобально распространенных сиквенс-типов с множественными детерминантами резистентности.

Литература

1. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol*. 2001; 153 (12): 1135–41. DOI: 10.1093/aje/153.12.1135.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
3. Unemo M, Dillon JA. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev*. 2011; (24): 447–58. DOI: 10.1128/CMR.00040-10.
4. Town K, Bolt H, Croxford S, Cole M, Harris S, Field N, et al. *Neisseria gonorrhoeae* molecular typing for understanding sexual networks and antimicrobial resistance transmission: A systematic review. *J Infect*. 2018; (76): 507–14. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.02.011.
5. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, et al. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (7): 758–68. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30225-1.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical Report. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — a study of 2013 isolates. Stockholm: ECDC; 2018. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Molecular-typing-N-gonorrhoeae-web.pdf>.
7. Ilina EN, Oparina NY, Shitikov EA, Borovskaya AD, Govorun VM. Molecular surveillance of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (10): 3681–89. DOI: 10.1128/JCM.00565-10.
8. Шпилева М. В., Образцова О. А., Честков А. В. Использование методов генотипирования *Neisseria gonorrhoeae*. Вестник дерматологии и венерологии. 2015; (6): 33–40. DOI: 10.25208/0042-4609-2015-0-6-33-40.
9. Kubanov A, Solomka V, Plakhova X, Chestkov A, Petrova N, Shaskolskiy B, et al. Summary and trends of the Russian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, 2005–2016. *J Clin Microbiol*. 2019; 5 (6): e02024–18. DOI: 10.1128/JCM.02024-18.
10. Shaskolskiy B, Dementieva E, Kandinov I, Filippova M, Petrova N, Plakhova X, et al. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin and ceftriaxone) in Russia, 2015–2017. *PLoS One*. 2019; 14 (7): e0220339. DOI: 10.1371/journal.pone.0220339.
11. Воробьев Д. В., Соломка В. С., Плахова К. И., Дерябин Д. Г., Кубанов А. А. NG-MAST генотипирование штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2012–2015 годах. Журнал Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; (4): 42–51.
12. Martin IMC, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Sprat BG. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis*. 2004; (189): 1497–505. DOI: 10.1086/383047.
13. Stamatakis A. Using RAxML to infer phylogenies. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2015; 51 (1): 6.14.1–14.14. DOI: 10.1002/0471250953.bi0614s51.
14. Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A. NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*. 2014; 61 (6): 1–36. DOI: 10.18637/jss.v061.i06.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical Report. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — results from a pilot study 2010–2011. Stockholm: ECDC; 2012. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/201211109-Molecular-typing-gonorrhea.pdf>.
16. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill*. 2013; 18 (3): pii 20358. DOI: 10.2807/ese.18.03.20358-en.
17. Mlynarczyk-Bonikowska B, Malejczyk M, Majewski S, Unemo M. Antibiotic resistance and NG-MAST sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Poland compared to the world. *Postepy Dermatol Alergol*. 2018; 5 (6): 346–51. DOI: 10.5114/ada.2018.79780.
18. Shimuta K, Watanabe Y, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Kuroki T, Unemo M, et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. *BMC Infect Dis*. 2015; (15): 378. DOI: 10.1186/s12879-015-1110-x.
19. Pandori M, Barry PM, Wu A, Ren A, Whittington WL, Liska S, et al. Mosaic penicillin-binding protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2008 in San Francisco, California. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; (53): 4032–34. DOI: 10.1128/AAC.00406-09.
20. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27 (3): 587–613. DOI: 10.1128/CMR.00010-14.
21. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea — the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. *BMC Infect Dis*. 2015; (15): 364. DOI: 10.1186/s12879-015-1029-2.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea.

Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2017.pdf>.

23. Кубанова А. А., Кубанов А. А., Мелехина Л. Е., Богданова Е. В.

Результаты деятельности медицинских организаций дерматовенерологического профиля, достигнутые в 2016 г. Вестник дерматологии и венерологии. 2017; (4): 12–27. DOI: 10.25208/0042-4609-2017-0-4-20-21.

References

1. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. Am J Epidemiol. 2001; 153 (12): 1135–41. DOI: 10.1093/aje/153.12.1135.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
3. Unemo M, Dillon JA. Review and international recommendation of methods for typing *Neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. Clin Microbiol Rev. 2011; (24): 447–58. DOI: 10.1128/CMR.00040-10.
4. Town K, Bolt H, Croxford S, Cole M, Harris S, Field N, et al. *Neisseria gonorrhoeae* molecular typing for understanding sexual networks and antimicrobial resistance transmission: A systematic review. J Infect. 2018; (76): 507–14. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.02.011.
5. Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, et al. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. Lancet Infect Dis. 2018; 18 (7): 758–68. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30225-1.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical Report. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — a study of 2013 isolates. Stockholm: ECDC; 2018. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Molecular-typing-N-gonorrhoeae-web.pdf>.
7. Ilna EN, Oparina NY, Shitikov EA, Borovskaya AD, Govorun VM. Molecular surveillance of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. J Clin Microbiol. 2010; 48 (10): 3681–89. DOI: 10.1128/JCM.00565-10.
8. Shpilevaya MV, Obraztsova OA, Chestkov AV. The use of current genotyping assay methods for *Neisseria gonorrhoeae*. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2015; (6): 33–40. DOI: 10.25208/0042-4609-2015-0-6-33-40. Russian.
9. Kubanov A, Solomka V, Plakhova X, Chestkov A, Petrova N, Shaskolskiy B, et al. Summary and trends of the Russian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, 2005–2016. J Clin Microbiol. 2019; 5 (6): e02024–18. DOI: 10.1128/JCM.02024-18.
10. Shaskolskiy B, Dementieva E, Kandinov I, Filippova M, Petrova N, Plakhova X, et al. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin and ceftriaxone) in Russia, 2015–2017. PLoS One. 2019; 14 (7): e0220339. DOI: 10.1371/journal.pone.0220339.
11. Vorobiev DV, Solomka VS, Plakhova KI, Deryabin DG, Kubanov AA. NG-MAST genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Russian Federation in 2012–2015. Journal of microbiology, epidemiology, immunobiology. 2016; (4): 42–51. Russian.
12. Martin IMC, Ison CA, Aanensen DM, Fenton KA, Sprat BG. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. J Infect Dis. 2004; (189): 1497–505. DOI: 10.1086/383047.
13. Stamatakis A. Using RAxML to infer phylogenies. Curr Protoc Bioinformatics. 2015; 51 (1): 6.14.1–14.14. DOI: 10.1002/0471250953.bi0614s51.
14. Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A. NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. Journal of Statistical Software. 2014; 61 (6): 1–36. DOI: 10.18637/jss.v061.i06.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical Report. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — results from a pilot study 2010–2011. Stockholm: ECDC; 2012. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/201211109-Molecular-typing-gonorrhea.pdf>.
16. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. Euro Surveill. 2013; 18 (3): pii 20358. DOI: 10.2807/ese.18.03.20358-en.
17. Mlynarczyk-Bonikowska B, Malejczyk M, Majewski S, Unemo M. Antibiotic resistance and NG-MAST sequence types of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Poland compared to the world. Postepy Dermatol Alergol. 2018; 5 (6): 346–51. DOI: 10.5114/ada.2018.79780.
18. Shimuta K, Watanabe Y, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Kuroki T, Unemo M, et al. Emergence and evolution of internationally disseminated cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clones from 1995 to 2005 in Japan. BMC Infect Dis. 2015; (15): 378. DOI: 10.1186/s12879-015-1110-x.
19. Pandori M, Barry PM, Wu A, Ren A, Whittington WL, Liska S, et al. Mosaic penicillin-binding protein 2 in *Neisseria gonorrhoeae* isolates collected in 2008 in San Francisco, California. Antimicrob Agents Chemother. 2009; (53): 4032–34. DOI: 10.1128/AAC.00406-09.
20. Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. Clin Microbiol Rev. 2014; 27 (3): 587–613. DOI: 10.1128/CMR.00010-14.
21. Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea — the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. BMC Infect Dis. 2015; (15): 364. DOI: 10.1186/s12879-015-1029-2.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonorrhoea. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/gonorrhoea-annual-epidemiological-report-2017.pdf>.
23. Kubanova AA, Kubanov AA, Melekhina LE, Bogdanova EV. Results of work of dermatovenereologic healthcare organizations in 2016. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2017; (4): 12–27. DOI: 10.25208/0042-4609-2017-0-4-20-21. Russian.

ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ ПОЛОСТИ МАТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Е. С. Ворошилина^{1,2}✉, Д. Л. Зорников², О. В. Копосова², Д. К. Исламиди^{1,2}, К. Ю. Игнатова¹, Е. И. Абакумова¹, Н. В. Курбатова¹, Е. Э. Плотно¹

¹ Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

Наличие хронического эндометрита (ХЭ) у женщин репродуктивного возраста ассоциируют с бесплодием и невынашиванием беременности. Целью работы было оценить состояние микробиоты полости матки методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) у женщин репродуктивного возраста в зависимости от морфологической картины эндометрия. С помощью теста «Андрофлор» исследовали микробиоту аспирата эндометрия, полученного от 23 пациенток с ХЭ, 30 пациенток с гиперплазией эндометрия и 19 здоровых женщин. Во всех исследуемых образцах обнаружили ДНК от 1–9 групп микроорганизмов в количествах, превышающих показатели, полученные для отрицательных контрольных образцов. Общая бактериальная масса выявляемых микроорганизмов (ОБМ) составила 10^3 – $10^{6.4}$ (медиана $10^{3.8}$) ГЭ/мл. В 86,1% случаев выявили *Lactobacillus spp.* Условно-патогенные микроорганизмы идентифицировали в 36,1% образцов, в том числе в 22,2% — в сочетании с лактобациллами и в 13,9% — без лактобацилл. У пациенток с ХЭ достоверно реже в сравнении с группой здоровых женщин выявляли вариант микробиоты, характеризующийся наличием *Lactobacillus spp.* с удельным весом в ОБМ не менее 90%. Таким образом, метод ПЦР-РВ может быть использован для оценки микробиоты полости матки и позволяет определить ее особенности при различной морфологической картине эндометрия.

Ключевые слова: микробиота эндометрия, ПЦР-РВ, хронический эндометрит, *Lactobacillus spp.*

Благодарности: авторы благодарят В. Хаютина, директора медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург), за возможность выполнения исследования на базе центра. Авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в методах исследования.

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — организация исследования, молекулярно-генетические исследования, анализ данных, статистический анализ, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ данных, статистический анализ, написание статьи; О. В. Копосова — анализ данных, молекулярно-генетические исследования; Д. К. Исламиди — клинический анализ, отбор пациентов, взятие образцов, написание статьи; К. Ю. Игнатова — патоморфологические исследования; Е. И. Абакумова — клинический анализ, отбор пациентов, взятие образцов; Н. В. Курбатова — клинический анализ, отбор пациентов, взятие образцов; Е. Э. Плотно — организация исследования, анализ данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 20 сентября 2019 г.). Все участницы исследования подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

✉ Для корреспонденции: Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Фурманова, д. 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 03.02.2020 Статья принята к печати: 17.02.2020 Опубликована онлайн: 29.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.012

THE USE OF REAL-TIME PCR FOR EVALUATION OF ENDOMETRIAL MICROBIOTA

Voroshilina ES^{1,2}✉, Zornikov DL², Kuposova OV², Islamidi DK^{1,2}, Ignatova KY¹, Abakumova EI¹, Kurbatova NV¹, Plotko EE¹

¹ "Garmonia" Medical Center, Yekaterinburg, Russia

² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Chronic endometritis (CE) in women of the reproductive age is associated with infertility and recurrent pregnancy loss. The aim of this study was to evaluate the endometrial microbiota by means of real-time PCR in reproductive-age women depending on the morphological pattern of the endometrium. Using the Androflor real-time PCR kit, we analyzed endometrial aspirate collected from 23 patients with chronic endometritis, 30 patients with endometrial hyperplasia, and 19 healthy women. DNA of up to 9 groups of microorganisms was detected in all the analyzed samples in the amounts exceeding negative control. The total bacterial load (TBL) of the detected microorganisms was 10^3 – $10^{6.4}$ (median $10^{3.8}$) GE/ml. *Lactobacillus spp.* were detected the most often (86.1% of all samples). Opportunistic microorganisms (OM) were identified in 36.1% of all samples, including 22.2% of samples with lactobacilli and 13.9% — without lactobacilli. The variant of microbiota composition with *Lactobacillus*-dominance (more than 90% in the TBL) was detected significantly less often in women with chronic endometritis compared to healthy women. Real-time PCR could be used for assessment of endometrial microbiota and allows us to determine its characteristics depending on the morphological pattern.

Keywords: endometrial microbiota, real-time PCR, chronic endometritis, *Lactobacillus spp.*

Acknowledgement: the authors thank Khayutin V, director of "Garmonia" Medical Center (Yekaterinburg), for letting them use its facilities for this research study. We thank to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Author contribution: Voroshilina ES organized the study, reviewed the literature, performed real-time PCR and statistical analysis, contributed to manuscript preparation; Zornikov DL reviewed the literature, conducted statistical analysis, contributed to manuscript preparation; Kuposova OV reviewed the literature, performed molecular genetic assays; Islamidi DK analyzed medical histories, recruited patients, performed endometrial aspiration and pipelle biopsies, contributed to manuscript preparation; Ignatova KY conducted histological examinations; Abakumova EI reviewed medical histories, recruited patients, performed endometrial aspiration and pipelle biopsies; Kurbatova NV reviewed medical histories, recruited patients, performed endometrial aspiration and pipelle biopsies; Plotko EE organized the study, reviewed the literature, contributed to manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol № 7 dated September 20, 2019). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Ekaterina C. Voroshilina
Furmanova, 30, Yekaterinburg, 620142; voroshilina@gmail.com

Received: 03.02.2020 Accepted: 17.02.2020 Published online: 29.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.012

На протяжении долгого времени полость матки считали стерильным биотопом [1]. Однако в настоящее время применение молекулярно-генетических методов исследования позволяет выявлять ассоциации трудно культивируемых и некультивируемых микроорганизмов на поверхности эндометрия у женщин репродуктивного возраста [2–7]. Нет единой точки зрения о вкладе тех или иных групп условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в развитие воспалительной патологии эндометрия [8, 9], и это вызывает сомнения в целесообразности назначения антимикробной терапии при хроническом эндометрите (ХЭ). Важно отметить, что ХЭ выявляют примерно у 10% женщин репродуктивного возраста [10], а его наличие ассоциируют с бесплодием и невынашиванием беременности [1, 8, 11–14].

Интерпретация положительных результатов, полученных с помощью молекулярно-генетических методик, затруднена вследствие возможной контаминации исследуемых образцов. С одной стороны, источником контаминации может быть микробиота влагалища или шейки матки, так как в клинической практике используют трансцервикальный способ взятия биоматериала [5, 6]. С другой стороны, положительные результаты могут быть обусловлены наличием малых концентраций бактериальной ДНК в самих наборах реагентов для проведения молекулярно-генетических исследований (так называемый *kitome*), избавиться от которой не представляется возможным по ряду технических причин [15]. Последнее не является проблемой при исследовании биоматериалов с высоким содержанием микроорганизмов (например, фекалии или вагинальное отделяемое), так как концентрации исследуемой ДНК гораздо выше китомной. Однако при исследовании эндометрия, концентрация микроорганизмов в котором редко превышает 10^4 клеток на образец, данный момент становится критичным [16].

Кроме того, стоит отметить, что большинство исследований микробиоты эндометрия выполнено с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS-секвенирования) [3–6] — дорогостоящего подхода, плохо адаптированного для практического здравоохранения. Наиболее подходящий для рутинных исследований молекулярно-генетический метод — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Однако на сегодняшний день отмечены лишь единичные отчеты об использовании данной методики при исследовании микробиоты эндометрия [7, 17].

Цель настоящего исследования — оценить состояние микробиоты полости матки методом ПЦР-РВ у женщин репродуктивного возраста в зависимости от морфологической картины эндометрия.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Группа обследованных

В исследование были включены 72 женщины репродуктивного возраста (21–45 лет, средний возраст составил $33 \pm 5,2$ года), обратившиеся в медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург) в период с сентября по декабрь 2019 г. Все женщины обратились с целью решения репродуктивных проблем или в рамках предгравидарной подготовки.

Критерии включения: репродуктивный возраст 18–45 лет, интервальный период (вне беременности), регулярный менструальный цикл; отягощенный акушерско-гинекологический анамнез: бесплодие, искусственные и

самопроизвольные аборт, неразвивающаяся беременность, хронический эндометрит.

Критерии исключения: гормональная и внутриматочная контрацепция на момент обследования и в течение предшествующих 6 месяцев; онкологические заболевания любой локализации; ВИЧ-инфекция; наличие острых воспалительных заболеваний нижних отделов гениталий и органов малого таза на момент обследования; антибактериальная терапия в течение четырех недель до обследования.

Техника получения образцов эндометрия

Исследование проводили на 7–10-й день менструального цикла. Аспират эндометрия для исследования микробиоты отбирали с помощью устройства для получения эндометриальной цитологии Endobrush Standard for Endometrial Cytology (Laboratoire C.C.D.; Франция). Данное устройство снабжено специальным защитным проводником, который предохраняет расположенную внутри него щетку от контакта со слизистой цервикального канала. Щетка раскрывается только после введения в полость матки, а перед извлечением задвигается внутрь проводника. Предварительно шейку матки выводили в зеркалах, очищали тампоном, смоченным 0,05%-м раствором хлоргексидина, затем вводили устройство, не касаясь стенок влагалища, в полость матки. После извлечения устройства из полости матки поверхность проводника дополнительно протирали стерильным тампоном, смоченным 95%-м этиловым спиртом для удаления отделяемого цервикального канала и предотвращения контаминации пробы его микрофлорой. Затем выдвигали щетку с образцом эндометрия и переносили в жидкость PreservCyt Solution для консервирования клеточных образцов при диагностике *in vitro* (Hologic, Inc.; США).

После аспирации эндометрия для исследования микробиоты у всех пациенток отбирали образцы эндометрия для гистологического исследования методом пайпель-биопсии, которые помещали во флаконы с 10%-м забуференным раствором формалина.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛЮС («ДНК-Технология»; Россия). Образцы эндометрия подвергали предварительной депротеинизации по следующей методике. Пробирки с аспиратом эндометрия центрифугировали 10 мин при 13 000 об./мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf; Германия), удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 100 мкл лизирующего раствора из набора ПРОБА-НК-ПЛЮС. Переносили 50 мкл гомогенизата в чистую пробирку, содержащую смесь из 25 мкл лизирующего раствора из набора ПРОБА-НК-ПЛЮС, 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) (VWR Life Science; США) и 120 мкл стерильного физиологического раствора. После перемешивания образцы инкубировали при 60 °C в течение 30 мин, далее при 95 °C в течение 10 мин. По окончании инкубации пробирки центрифугировали 60 с при 13 000 об./мин. Надосадочную жидкость в объеме 100 мкл использовали для выделения ДНК согласно инструкции производителя.

Оценка микробиоты эндометрия

Выявление ДНК облигатно-патогенных возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП), и

условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в аспирате эндометрия проводили с помощью набора «Андрофлор» («ДНК-Технология»; Россия), включающего максимально широкий перечень микроорганизмов, важных в поисковой работе для установления роли инфекционного фактора в развитии воспалительной патологии эндометрия. Тест-система позволяет провести количественную оценку 24 групп микроорганизмов: *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), *Megasphaera spp.*, *Veillonella spp.*, *Dialister spp.*, *Sneathia spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*), *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*), *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Atopobium cluster*, *Bacteroides spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Parvimonas spp.*, *Eubacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia spp.*, *Burkholderia spp.*, *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.*, *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*), *Candida spp.* ПЦР-РВ проводили на детектирующем амплификаторе ДТпрайм ЧМ1 («ДНК-Технология»; Россия).

Количество каждого микроорганизма или группы микроорганизмов рассчитывали по пороговому циклу амплификации, затем определяли его долю относительно общей бактериальной массы (ОБМ). В качестве отрицательных контрольных образцов (ОКО) использовали стерильную деионизированную воду. В ОКО положительные сигналы по некоторым группам микроорганизмов в ПЦР-РВ фиксировали не ранее 35-го цикла амплификации (что соответствовало микробной нагрузке менее 10^3 геном-эквивалентов на образец, или ГЭ/образец). На основании этого значимым считали количество микроорганизмов не менее 10^3 ГЭ/образец, что соответствовало положительному сигналу в ПЦР-РВ до 35-го цикла. Меньшие показатели рассматривали как отрицательные с учетом высокой чувствительности метода и невозможности дифференцировать положительные сигналы, получаемые в ОКО и образцах с крайне низким содержанием бактериальной ДНК.

Исключение составляли *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в ОКО отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам микроорганизмов расценивали как положительный.

Патоморфологическое исследование

Морфологическому исследованию подвергали ткань эндометрия, полученную при пайпель-биопсии. Материал фиксировали в забуференном 10%-м нейтральном формалине и обрабатывали по общепринятой методике. Парафиновые срезы стандартной толщины (5,0 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили с применением светового бинокулярного микроскопа Eclipse E200 (Nikon; Япония) (объективы 10, 40; окуляры 10).

Статистические методы

Средний возраст пациенток выражали средним арифметическим и стандартным отклонением. В качестве средних величин ОБМ и количеств отдельных групп

микроорганизмов использовали медианы. Для отображения дисперсии признака внутри групп указывали процентилю 0,05 и 0,95. Все перечисленные показатели рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.; США).

Для оценки достоверности различий между средними показателями ОБМ и количеством отдельных групп микроорганизмов рассчитывали критерии Краскела–Уоллеса (при сравнении показателей между тремя исследуемыми группами) и Манна–Уитни (при сравнении показателей между двумя исследуемыми группами) в программе IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp.; США). Для оценки достоверности различий частотных показателей в исследуемых группах рассчитывали двусторонний критерий Фишера с помощью свободно распространяемого продукта WinPepi (JH Abramson; Израиль). Во всех случаях различия интерпретировали как достоверные при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты патоморфологического исследования эндометрия

В зависимости от морфологической картины эндометрия все обследованные пациентки были разделены на три группы [18].

В группу 1 (хронический эндометрит, ХЭ) вошли 23 пациентки с хроническим эндометритом. Диагноз верифицирован на основании выявления признаков продуктивного воспаления с формированием лимфоидных фолликулов и фиброза стромы эндометрия, склеротических изменений стенок спиральных артерий.

В группу 2 (гиперплазия эндометрия, ГПЭ) вошли 30 пациенток с простой гиперплазией эндометрия без атипии. Диагноз основан на гистологическом выявлении признаков пролиферации в железистых криптах и цитогенной строме эндометрия, спиральных артериях с наличием/отсутствием клеточного и ядерного полиморфизма.

В группу 3 (норма) включили 19 пациенток, у которых при гистологическом исследовании не было выявлено структурных изменений эндометрия и он соответствовал дню менструального цикла.

Результаты молекулярно-биологического исследования

Во всех 72 образцах аспирата эндометрия была выявлена бактериальная ДНК: ОБМ определяли в диапазоне 10^3 – $10^{6,4}$ (медиана $10^{3,8}$) ГЭ/образец. Не было выявлено существенных различий по данному показателю между группами пациенток с патологией эндометрия и без таковой. Таким образом, детектируемый методом ПЦР-РВ уровень ОБМ в полости матки отличался в 100–10 000 раз от показателей, типичных для влагалища женщин репродуктивного возраста [19].

Чаще всего в исследованных образцах эндометрия определяли *Lactobacillus spp.* — в 62 (86,1%) из 72 образцов. *G. vaginalis* выявили в 19 (26,8%) пробах, *U. parvum* — в 9 (12,7%) пробах и группу *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* — в 8 (11,3%) образцах. Прочие группы микроорганизмов определяли в единичных пробах (табл. 1).

Отдельные группы микроорганизмов выявляли с разной частотой у женщин с различной гистологической картиной. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий (что возможно обусловлено малой численностью групп) были выявлены некоторые интересные тенденции.

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп микроорганизмов методом ПЦР-РВ в образцах эндометрия с различной гистологической картиной

Группы микроорганизмов	Частота выявления отдельных групп микроорганизмов в обследованных группах (n / %)			
	Группа 1 — ХЭ N = 23	Группа 2 — ГПЭ N = 30	Группа 3 — норма N = 19	Всего N = 72
<i>Lactobacillus spp.</i>	19/82,6	25/83,3	18/94,7	62/86,1
<i>Staphylococcus spp.</i>	0	0	0	0
<i>Streptococcus spp.</i>	1 / 4,3	0	0	1/1,4
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	3/10,0	0	3/4,2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	7/30,4	9/30,0	3/15,8	19/26,4
<i>Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp.</i>	1/4,3	2/6,7	0	3/4,2
<i>Sneathia spp. / Leptotrichia spp. / Fusobacterium spp.</i>	1/4,3	0	0	1/1,4
<i>Atopobium cluster</i>	1/4,3	3/10,0	0	4/5,6
<i>Bacteroides spp. / Porphyromonas spp. / Prevotella spp.</i>	2/8,7	3/10,0	2/10,5	7/9,7
<i>Anaerococcus spp.</i>	0	1/3,3	0	1/1,4
<i>Peptostreptococcus spp. / Parvimonas spp.</i>	2/8,7	0	2/10,5	4/5,6
<i>Eubacterium spp.</i>	2/8,7	3/10,0	1/5,3	6/8,3
<i>Haemophilus spp.</i>	1/4,3	0	0	1/1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa / Ralstonia spp. / Burkholderia spp.</i>	0	1/3,3	0	1/1,4
<i>Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.</i>	4/17,4	3/10,0	1/5,6	8/11,3
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0	1/3,3	0	1/1,4
<i>Ureaplasma parvum</i>	4/17,4	4/13,3	1/5,3	9/12,5
<i>Mycoplasma hominis</i>	3/13,0%	2/6,7	0	5/6,9

В образцах, гистологическая картина которых соответствовала норме, выявляли ограниченное число групп УПМ. В то время как у пациенток с ХЭ и ГПЭ выявляли все определяемые группы УПМ, за исключением *Staphylococcus spp.*

Некоторые УПМ чаще выявляли у женщин с ХЭ и ГПЭ. Так, ДНК *G. vaginalis* присутствовала в 30% образцов у пациенток с патологией эндометрия, а у женщин группы нормы только в 16,7% проб. ДНК *U. parvum* и *M. hominis* была определена в 17,4 и 13,0% образцов, которые гистологически отвечали критериям ХЭ, в то время как у женщин группы нормы только в одном образце была выявлена *U. parvum*.

Облигатно патогенные возбудители ИППП отсутствовали в эндометрии обследованных пациенток.

В разных образцах эндометрия определяли 1–9 групп микроорганизмов (рис. 1). Микробиота эндометрия женщин группы нормы в 78,9% случаев (15 из 19 проб)

была представлена одной группой микроорганизмов, в то время как у пациенток с ХЭ одну группу микроорганизмов определяли в 9 (39,1%) из 23 образцов ($p = 0,013$). У пациенток с ХЭ чаще всего одновременно определяли две группы бактерий (в 11 (47,8%) из 23 образцов). У пациенток с ГПЭ одну группу микроорганизмов определяли в 16 (53,3%) из 30 случаев, в остальных пробах микробиота была представлена двумя и более группами микроорганизмов. В целом образцы эндометрия, гистологическая картина которых соответствует ГПЭ и ХЭ, отличало большее видовое разнообразие микробиоты.

Количественные показатели для каждой из определяемых групп микроорганизмов представлены в табл. 2. При сравнении трех групп, сформированных на основе гистологического заключения (ХЭ, ГПЭ, норма), статистически достоверных различий получено не было.

Учитывая значительное количество определяемых групп микроорганизмов, было принято решение определять

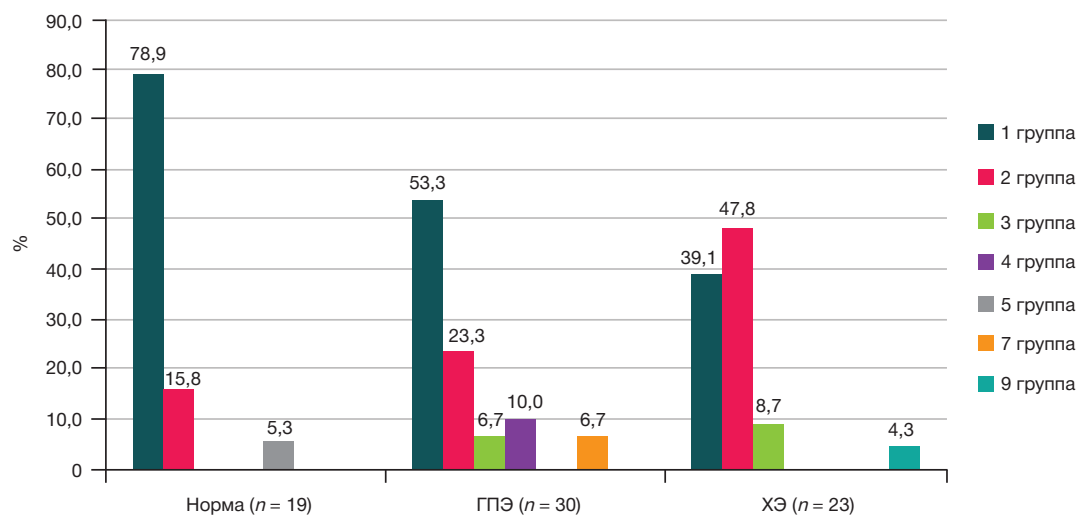
Рис. 1. Число одновременно определяемых групп микроорганизмов в образцах эндометрия у пациенток с различной гистологической картиной (* $p = 0,013$)

Таблица 2. Качественный и количественный состав микробиоты эндометрия по данным ПЦР-РВ у обследованных групп женщин (N = 72)

Группы определяемых микроорганизмов	Медиана (0,05–0,95 процентиль)			
	Группа 1 ХЭ, N = 23	Группа 2 ГПЭ, N = 30	Группа 3 Норма, N = 19	Всего N = 72
ОБМ	$10^{3,8}$ ($10^{3,2}$ – $10^{4,7}$)	$10^{3,8}$ ($10^{3,3}$ – $10^{5,1}$)	$10^{3,9}$ ($10^{3,3}$ – $10^{5,1}$)	$10^{3,8}$ ($10^{3,3}$ – $10^{5,1}$)
<i>Lactobacillus spp.</i>	$10^{3,8}$ (0 – $10^{4,6}$)	$10^{3,7}$ (0 – $10^{5,1}$)	$10^{3,8}$ ($10^{2,6}$ – $10^{5,1}$)	$10^{3,8}$ (0 – $10^{4,9}$)
<i>Staphylococcus spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Streptococcus spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Corynebacterium spp.</i>	0 0	0 (0 – $10^{3,1}$)	0 0	0 0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0 (0 – $10^{3,8}$)	0 (0 – $10^{3,7}$)	0 (0 – $10^{3,2}$)	0 (0 – $10^{3,9}$)
<i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Atopobium cluster</i>	0 0	0 (0 – $10^{3,2}$)	0 0	0 (0 – $10^{1,5}$)
<i>Bacteroides spp.</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> / <i>Prevotella spp.</i>	0 0	0 (0 – $10^{3,2}$)	0 (0 – $10^{3,3}$)	0 (0 – $10^{3,2}$)
<i>Anaerococcus spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Peptostreptococcus spp.</i> / <i>Parvimonas spp.</i>	0 (0 – $10^{2,8}$)	0 0	0 (0 – $10^{3,0}$)	0 (0 – $10^{1,5}$)
<i>Eubacterium spp.</i>	0 (0 – $10^{2,7}$)	0 (0 – $10^{3,0}$)	0 (0 – $10^{3,5}$)	0 (0 – $10^{3,0}$)
<i>Haemophilus spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia spp.</i> / <i>Burkholderia spp.</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0 (0 – $10^{3,3}$)	0 (0 – $10^{3,1}$)	0 (0 – $10^{0,5}$)	0 (0 – $10^{3,2}$)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0 0	0 0	0 0	0 0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0 (0 – $10^{1,9}$)	0 (0 – $10^{1,9}$)	0 (0 – $10^{0,1}$)	0 (0 – $10^{1,9}$)
<i>Mycoplasma hominis</i>	0 (0 – $10^{2,4}$)	0 (0 – $10^{1,1}$)	0 0	0 (0 – $10^{2,2}$)

суммарное количество УПМ в образце. Далее рассчитывали долю лактобацилл и суммарную долю УПМ относительно ОБМ. На основании этих показателей выделили три варианта микробиоты эндометрия.

1. С преобладанием *Lactobacillus spp.* Доля лактобацилл составляла не менее 90% в ОБМ, а остальные группы микроорганизмов отсутствовали либо были представлены в незначительных количествах (менее 10% относительно ОБМ).

2. Смешанный тип микробиоты. Доля лактобацилл составляла не более 90% в ОБМ, соответственно, доля УПМ составляла не менее 10% в ОБМ. В зависимости от преобладающей группы УПМ возможно выделение подвариантов данного типа микробиоты.

3. Микробиота представлена исключительно УПМ в отсутствие *Lactobacillus spp.* В зависимости от того, какая группа УПМ была выявлена, возможно выделение подвариантов данного типа микробиоты.

Критериям варианта 1 соответствовали 46 (63,9%) из 72 образцов, варианта 2 — 16 (22,2%) образцов, варианта

3 — 10 (13,9%) образцов. Таким образом, у большинства обследованных женщин микробиота эндометрия была представлена исключительно лактобациллами или сочетанием лактобацилл с УПМ. Далее проанализировали частоту выявления предложенных вариантов микробиоты эндометрия в исследуемых группах.

У женщин группы нормы в 16 (84,2%) из 19 образцов микробиота эндометрия соответствовала критериям варианта 1 — с преобладанием лактобацилл (рис. 2). Критериям варианта 2 соответствовали два (10,5%) из 19 образцов. Вариант 3 (представленный исключительно УПМ) был определен только в одном (5,3%) образце. Примечательно, что УПМ во всех трех образцах была представлена *G. vaginalis*.

У пациенток с ГПЭ варианты 2 и 3 определяли несколько чаще по сравнению с группой нормы, однако различия были статистически не достоверны. Критериям варианта 2 соответствовали пять (16,7%) из 30 образцов, при этом УПМ во всех случаях была представлена *G. vaginalis*. Вариант 3 (представленный исключительно

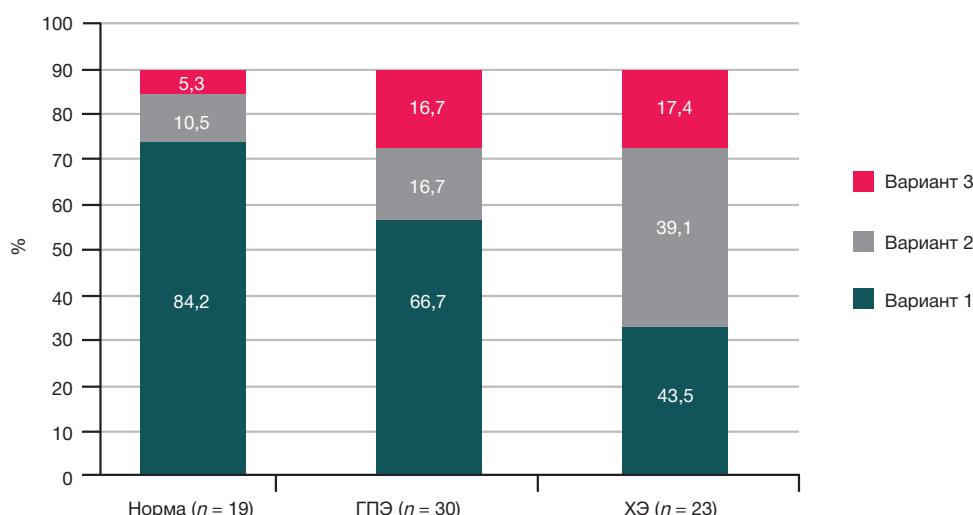


Рис. 2. Частота выявления отдельных вариантов микробиоты в аспирате эндометрия у женщин с различной гистологической картиной эндометрия (* $p = 0,011$)

УПМ) определили также в пяти (16,7%) образцах, в четырех из них УПМ была представлена *G. vaginalis*, в одном — группой *Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.*

Наибольшее разнообразие вариантов микробиоты определяли в образцах эндометрия пациенток с ХЭ. Критериям варианта 1 (с преобладанием лактобацилл) соответствовали только 10 (43,5%) из 23 образцов ($p = 0,012$ в сравнении с группой нормы). Критериям варианта 2 соответствовала микробиота девяти (39,1%) проб, при этом в пяти пробах УПМ была представлена анаэробами (*G. vaginalis* и *Bacteroides spp. / Porphyromonas spp. / Prevotella spp.*). В четырех пробах УПМ была представлена факультативно анаэробными грамположительными и грамотрицательными бактериями. Критериям варианта 3 соответствовало четыре (17,4%) из 23 проб. При этом УПМ была представлена исключительно *G. vaginalis* в двух случаях, *Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.* — в одном случае; ассоциацией *Peptostreptococcus spp. / Parvimonas spp.* и *Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp.* — в одном случае.

Таким образом, у пациенток с ХЭ чаще выявляли варианты микробиоты, в составе которых присутствовали представители УПМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании оценку микробиоты эндометрия мы производили методом ПЦР-РВ на доступном оборудовании с использованием стандартных реагентов. Полученные результаты по ключевым позициям согласуются с данными, полученными ранее другими исследователями с применением высокотехнологичных дорогостоящих методов [2–6], не применимых в клинической практике.

Во всех исследованных образцах аспирата эндометрия выявлена бактериальная ДНК, при этом количество ее составляло 10^3 – 10^5 ГЭ/образец и различалось между образцами не более чем в 10–100 раз. Аналогичные данные были получены в других исследованиях при получении материала трансцервикальным путем [2, 5, 6]. Такой способ отбора материала потенциально чреват риском контаминацией [5, 6], что может объяснять присутствие бактериальной ДНК во всех исследуемых образцах. Ради чистоты эксперимента были исследованы образцы эндометрия, полученные из средней зоны

полости матки, извлеченной путем трансабдоминальной гистеректомии у пациенток позднего репродуктивного возраста, страдавших патологией матки и эндометрия [20]. При таком подходе авторы выявили бактериальную ДНК (в количестве, превышающем показатели ОКО) в 60% образцов. Однако в клинической практике такой подход невозможен. Техника отбора проб и устройство, которые мы применяли для получения эндометриального аспирата трансцервикальным путем, позволяют минимизировать риск контаминации, но полностью исключить его невозможно.

В большинстве исследованных образцов эндометрия нами выявлена ДНК лактобацилл, что также согласуется с литературными данными [7]. Ряд авторов рассматривают присутствие лактобацилл в эндометрии как прогностически благоприятный признак для имплантации эмбриона при вспомогательных репродуктивных технологиях и вынашивания беременности [2]. В настоящем исследовании лактобациллы выявляли в большинстве образцов, но в разном количестве и с разным удельным весом в ОБМ.

Облигатно и факультативно анаэробные УПМ были обнаружены в каждом третьем образце эндометрия, как при наличии лактобацилл, так и при их отсутствии. При этом УПМ достоверно реже выявляли у женщин группы нормы по сравнению с пациентками с ХЭ.

На основании доли лактобацилл и УПМ выделили три варианта микробиоты эндометрия, которые с разной частотой определяли у пациенток с ХЭ, ГПЭ и женщин без гистологических признаков патологии эндометрия. Микробиота эндометрия женщин группы нормы в большинстве случаев была представлена одной группой микроорганизмов, как правило, *Lactobacillus spp.* Выявление этого варианта микробиоты у женщин с ХЭ, вероятно, не требует назначения антибактериальной терапии и согласуется с современными представлениями о преобладании аутоиммунных механизмов в патогенезе ХЭ. Обнаружение УПМ в полости матки женщин с морфологическими признаками эндометрита может быть дополнительным маркером этиологической значимости этих микроорганизмов в развитии воспалительного процесса. Вопрос о взаимосвязи отдельных групп УПМ с развитием ГПЭ требует дальнейшего изучения.

Полученные в ходе настоящего исследования данные подтверждают, что полость матки не является стерильной.

При этом по ряду параметров микробиота эндометрия схожа с вагинальной микробиотой: в 86,1% случаев в полости матки были выявлены лактобациллы, а в 63,9% — они доминировали. В то же время количество микроорганизмов в полости матки в 100–10 000 раз меньше, чем во влагалище. Насколько схожи профили микробиоты верхних и нижних отделов гениталий у женщин и какова роль лактобацилл в полости матки — эти вопросы требуют дальнейшего изучения. Также не очевидно, составляют ли микроорганизмы, выявляемые в эндометрии, резидентную или транзитную микрофлору.

ВЫВОДЫ

1. Использование ПЦР-РВ позволило выявить бактериальную ДНК в количествах, превышающих показатели для отрицательных контрольных образцов, во всех образцах аспирата эндометрия. 2. В каждом образце аспирата эндометрия выявляли 1–9 групп микроорганизмов. Чаще остальных идентифицировали группу *Lactobacillus spp.*; данные микроорганизмы обнаружены в 86,1% проб, в том числе в сочетании с УПМ — в 22,2%. У 13,9% пациенток

микробиота эндометрия была представлена исключительно УПМ, преимущественно облигатно анаэробными. 3. Интегральная оценка состояния микробного пейзажа эндометрия с учетом доли *Lactobacillus spp.* и УПМ относительно ОБМ позволила выделить три варианта микробиоты: с преобладанием *Lactobacillus spp.*, с преобладанием УПМ и смешанный. 4. У большинства женщин с гистологически подтвержденным ХЭ в составе микробиоты эндометрия присутствовали УПМ, в то время как при гистологически нормальном эндометрии микробиота была представлена преимущественно *Lactobacillus spp.* (удельный вес в ОБМ не менее 90%). 5. В отсутствие единого подхода к диагностике и лечению столь актуальной и распространенной проблемы, как хронический эндометрит, применение современных молекулярно-генетических методов для оценки микробиоты эндометрия и ее роли в возникновении воспалительного процесса выглядит перспективным. Исследование микробиоты полости матки с использованием ПЦР-РВ позволит точно верифицировать диагноз и назначить патогенетически обоснованную терапию, что улучшит прогнозы при последующих беременностях.

Литература

- Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci.* 2014; (21): 640–7.
- Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Dec; 215 (6): 684–703.
- Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertil Steril.* 2017 Jul; 108 (1): 32–39.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017 Apr 28; 5 (1): 48.
- Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front Immunol.* 2018 Mar 2; (9): 208.
- Peric A, Weiss J, Vulliemoz N, Baud D, Stojanov M. Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 11; 20 (14) pii: E3405.
- Цыпурдеева Н. Д., Шипицына Е. В., Савичева А. М., Гзгзян А. М., Коган И. Ю. Состав микробиоты эндометрия и степень выраженности хронического эндометрита у пациенток с неэффективными протоколами экстракорпорального оплодотворения. Есть ли связь? *Журнал акушерства и женских болезней.* 2018; 67 (2): 5–15.
- Cicinelli E, Resta L, Nicoletti R, Tartagni M, Marinaccio M, Bulletti C, et al. Detection of chronic endometritis at fluid hysteroscopy. *J Minim Invasive Gynecol.* 2005 Nov-Dec; 12 (6): 514–8.
- Espinoza J, Erez O, Romero R. Preconceptional antibiotic treatment to prevent preterm birth in women with a previous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Mar; 194 (3): 630–7.
- Гомболевская Н. А., Марченко Л. А. Современные критерии диагностики хронического эндометрита (обзор литературы). *Проблемы репродукции.* 2012; 18 (1): 42–46.
- Kushnir VA, Solouki S, Sarig-Meth T, Vega MG, Albertini DF, Darmon SK et al. Systemic inflammation and autoimmunity in women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol.* 2016; (75): 672–7.
- Yang R, Du X, Wang Y, Song X, Yang Y, Qiao J. The hysteroscopy and histological diagnosis and treatment value of chronic endometritis in recurrent implantation failure patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; (289): 1363–9.
- Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod.* 2015; (30): 323–30.
- Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010; (93): 437–41.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J1, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol.* 2018 Aug; 3 (8): 851–3.
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014 Nov 12; (12): 87.
- Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 May; 212 (5): 611.e1–9.
- Пальцев М. А., Кактурский Л. В., Зайратьянц О. В., редакторы. *Патологическая анатомия: национальное руководство.* М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014; 1264 с.
- Ворошилина Е. С., Тумбинская Л. В., Донников А. Е., Плотно Е. Э., Хаютин Л. В. Биосенсорная диагностика с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? *Акушерство и гинекология.* 2011; (1): 57–65.
- Winters AD, Romero R, Gervasi MT, Gomez-Lopez N, Tran MR, Garcia-Flores V, et al. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Sci Rep.* 2019 Jul 9; 9 (1): 9905.

References

1. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci*. 2014; (21): 640–7.
2. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec; 215 (6): 684–703.
3. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertil Steril*. 2017 Jul; 108 (1): 32–39.
4. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017 Apr 28; 5 (1): 48.
5. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front Immunol*. 2018 Mar 2; (9): 208.
6. Peric A, Weiss J, Vulliemmoz N, Baud D, Stojanov M. Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 11; 20 (14) pii: E3405.
7. Tsyurdeeva ND, Shipitsyna EV, Savicheva AM, Gzgzyan AM, Kogan IYu. Composition of endometrial microbiota and chronic endometritis severity in patients with in vitro fertilization failures. Is there any connection? *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2018; 67 (2): 5–15. Russian.
8. Cicinelli E, Resta L, Nicoletti R, Tartagni M, Marinaccio M, Bulletti C, et al. Detection of chronic endometritis at fluid hysteroscopy. *J Minim Invasive Gynecol*. 2005 Nov-Dec; 12 (6): 514–8.
9. Espinoza J, Erez O, Romero R. Preconceptional antibiotic treatment to prevent preterm birth in women with a previous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Mar; 194 (3): 630–7.
10. Gombolevskaia NA, Marchenko LA. Modern diagnostic criteria of chronic endometritis (a review). *Russian Journal of Human Reproduction*. 2012; 18 (1): 42–6. Russian.
11. Kushnir VA, Solouki S, Sarig-Meth T, Vega MG, Albertini DF, Darmon SK et al. Systemic inflammation and autoimmunity in women with chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2016; (75): 672–7.
12. Yang R, Du X, Wang Y, Song X, Yang Y, Qiao J. The hysteroscopy and histological diagnosis and treatment value of chronic endometritis in recurrent implantation failure patients. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; (289): 1363–9.
13. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod*. 2015; (30): 323–30.
14. Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010; (93): 437–41.
15. de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J1, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol*. 2018 Aug; 3 (8): 851–3.
16. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*. 2014 Nov 12; (12): 87.
17. Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 May; 212 (5): 611.e1–9.
18. Palcev MA, Kakturskij LV, Zajrat'janc OV, editors. *Pathological anatomy: national guide*. M.: GJeOTAR-Media, 2014; 1264 p.
19. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EA, Khayutin LV. Vaginal biocenosis in the context of view of quantitative polymerase chain reaction: what is its norm? *Obstetrics and Gynecology*. 2011; (1): 57–65. Russian.
20. Winters AD, Romero R, Gervasi MT, Gomez-Lopez N, Tran MR, Garcia-Flores V, et al. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Sci Rep*. 2019 Jul 9; 9 (1): 9905.

ИЗОНИАЗИД-РЕЗИСТЕНТНЫЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ, СПЕКТРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ

С. Н. Андреевская ✉, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Отсутствие ускоренной диагностики туберкулеза с устойчивостью возбудителя к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину (ИР-ТБ) может быть причиной низкой эффективности терапии и приводить к амплификации лекарственной резистентности, в том числе к формированию множественной лекарственной устойчивости. Целью работы было определить частоту встречаемости ИР-ТБ в современной популяции, охарактеризовать фенотипическую чувствительность и генетические детерминанты устойчивости к изониазиду представителей этой группы *M. tuberculosis* на репрезентативном материале. Анализировали результаты определения лекарственной чувствительности, полученные при исследовании молекулярно-генетическими и/или культуральными методами изолятов *M. tuberculosis* / ДНК *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из клинических отделений Центрального научно-исследовательского института туберкулеза за период 2011–2018 гг. Частота ИР-ТБ составила 12% от всех выявленных случаев туберкулеза. *M. tuberculosis* с ИР были как монорезистентными к изониазиду (45%), так и полирезистентными (устойчивыми к 2–6 противотуберкулезным препаратам), а устойчивость к изониазиду была обусловлена мутациями в гене *katG*, приводящими к высокому уровню резистентности. На основании анализа литературных данных и собственных наблюдений подчеркивается важность разработки и внедрения новых простых молекулярных тестов для определения устойчивости одновременно к рифампицину и изониазиду.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, изониазид-резистентность, лекарственная чувствительность, молекулярная диагностика, одонуклеотидный полиморфизм, туберкулез

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 05.586.21.0065 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI58619X0065).

Вклад авторов: А. Эргешов, Л. Н. Черноусова — разработка дизайна исследования; Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская — получение данных для анализа; Т. Г. Смирнова — анализ полученных данных; С. Н. Андреевская — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соблюдение этических стандартов: был проведен ретроспективный анализ результатов, полученных при выполнении рутинных лабораторных исследований для пациентов, проходящих лечение в Центральном НИИ туберкулеза; все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования.

✉ Для корреспонденции: Софья Николаевна Андреевская
Яузская аллея, д. 2, г. Москва, 107564; andsofia@mail.ru

Статья получена: 11.12.2019 Статья принята к печати: 07.01.2020 Опубликована онлайн: 12.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.001

ISONIAZID-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: PREVALENCE, RESISTANCE SPECTRUM AND GENETIC DETERMINANTS OF RESISTANCE

Andreevskaya SN ✉, Smirnova TG, Larionova EE, Andrievskaya IYu, Chernousova LN, Ergeshov A

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

The lack of simple, rapid diagnostic tests for isoniazid-resistant rifampicin-susceptible tuberculosis infection (Hr-TB) can result in low treatment efficacy and further amplification of drug resistance. Based on the clinical data, this study sought to estimate the prevalence of Hr-TB in the general population and characterize the phenotypic susceptibility and genetic determinants of isoniazid resistance in *M. tuberculosis* strains. Molecular-genetic and culture-based drug susceptibility tests were performed on *M. tuberculosis* isolates and *M. tuberculosis* DNA obtained from the patients with pulmonary TB undergoing treatment at the Central Tuberculosis Research Institute between 2011 and 2018. The tests revealed that Hr-TB accounted for 12% of all TB cases in the studied sample. Hr-TB strains were either resistant to isoniazid only (45%) or had multiple resistance to 2–6 anti-TB agents. Resistance to isoniazid was caused by mutations in the *katG* gene. Based on the literature analysis and our own observations, we emphasize the importance of developing simple molecular drug susceptibility tests capable of detecting simultaneous resistance to rifampicin and isoniazid and the necessity of their translation into clinical practice.

Keywords: *M. tuberculosis*, isoniazid resistance, drug susceptibility, molecular diagnostics, single nucleotide polymorphism, tuberculosis

Funding: this study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and carried out under the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020, Project № 05.586.21.0065 (Project ID RFMEFI58619X0065).

Author contribution: Ergeshov A, Chernousova LN — study design; Larionova EE, Andrievskaya IYu — data acquisition; Smirnova TG — data analysis; Andreevskaya SN — manuscript preparation, literature analysis. All authors have equally contributed to the discussion of the obtained results.

Compliance with ethical standards: we retrospectively analyzed the results of routine laboratory tests performed on the patients undergoing treatment for tuberculosis at the Central Tuberculosis Research Institute. All patients gave informed consent.

✉ Correspondence should be addressed: Sofia N. Andreevskaya
Yauzskaya alley, 2, Moscow, 107564; andsofia@mail.ru

Received: 11.12.2019 Accepted: 07.01.2020 Published online: 12.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.001

Лекарственно-устойчивый туберкулез (ТБ) представляет собой серьезную проблему для здравоохранения. Основное внимание в настоящее время сосредоточено на борьбе с

туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ), т. е. туберкулезом такой формы, при которой возбудитель устойчив одновременно к двум наиболее

эффективным противотуберкулезным препаратам (ПТП) — изониазиду и рифампицину [1]. Россия занимает третье место в мире по распространенности МЛУ ТБ [2]. В 2018 г. показатели заболеваемости и распространенности МЛУ ТБ в РФ стабилизировались и составили соответственно 5,6 и 23,6 на 100 000 человек населения. При этом доля пациентов с МЛУ ТБ среди бактериовыделителей увеличилась (с 27,4% в 2017 г. до 29,3% в 2018 г. среди новых случаев ТБ и с 54,0% в 2017 г. до 55,3% в 2018 г. среди всех пациентов с ТБ органов дыхания, выделяющих микобактерии туберкулеза) [3].

На этом фоне другим формам резистентности уделяют недостаточное внимание. Одной из таких форм, выделяемых ВОЗ в отдельную группу, является туберкулез, резистентный к изониазиду (Hr-TB, ИР-ТБ), который характеризуется устойчивостью возбудителя к изониазиду и чувствительностью к рифампицину [4]. Изониазид — ПТП 1-го ряда, высокоэффективный для лечения активного туберкулеза, оказывающий бактерицидное воздействие на *M. tuberculosis*. Фенотипическая резистентность к изониазиду ассоциирована с мутациями в ряде генов (*katG*, *inhA*, *ahpC* и др.), продукты которых вовлечены в фармакокинетику и фармакодинамику изониазида в бактериальной клетке [5, 6].

Неадекватная терапия ИР-ТБ создает высокие риски для формирования приобретенной лекарственной устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам, в том числе к рифампицину, приводя к развитию МЛУ [7]. По данным ВОЗ, распространенность ИР-ТБ составляет 5–11% в зависимости от региона [8]. Сведений о распространенности ИР-ТБ в России недостаточно.

Цель исследования: охарактеризовать частоту встречаемости ИР *M. tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом легких из клинических отделений ФГБНУ «ЦНИИТ» за период 2011–2018 гг., дать расширенную характеристику фенотипической чувствительности и описать генетические детерминанты устойчивости к изониазиду этой группы *M. tuberculosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследовали клинические изоляты *M. tuberculosis* и/или ДНК *M. tuberculosis*, выделенные из диагностического материала, полученного от каждого пациента, поступившего в консультационное и клинические отделения ФГБНУ «ЦНИИТ» (за период 2011–2018 гг.). Все виды микробиологических исследований проводили из одной порции диагностического материала.

Культуральная диагностика

Выявление *M. tuberculosis* проводили на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT 960 (BD; USA) согласно стандартному протоколу изготовителя [9]. Фенотипическую лекарственную чувствительность определяли модифицированным методом пропорций в системе BACTEC MGIT 960 (BD; США) к восьми противотуберкулезным препаратам в критических концентрациях: изониазид (H, 0,1 мкг/мл), рифампицин (R, 1,0 мкг/мл), этамбутол (E, 5,0 мкг/мл), пиразинамид (Z, 100,0 мкг/мл), этионамид (Et, 5,0 мкг/мл), амикацин (Am, 1,0 мкг/мл), капреомидин (Cm 2,5 мкг/мл) и левофлоксацин (Lfx 1,0 мкг/мл) согласно стандартным процедурам [9, 10].

Выделение ДНК

ДНК выделяли из диагностического материала набором реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 1 («Синтол»; Россия), согласно инструкции производителя.

ДНК *M. tuberculosis* определяли с использованием набора реагентов «Амплитуб-РВ» для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в реальном времени, комплект № 2 («Синтол»; Россия), согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили в термоблокере с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad; США).

Определение генотипической ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам проводили или с использованием микрочиповой технологии с наборами «ТБ-БИОЧИП-1» и «ТБ-БИОЧИП-2» («БИОЧИП-ИМБ»; Россия), или с использованием наборов «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ» («Синтол»; Россия). Процедуры осуществляли согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка результатов

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику: количество наблюдений, частота, доля (в %), 95%-й доверительный интервал (95% ДИ). Весь анализ проводили с использованием MS Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были проведены культуральные и молекулярно-генетические исследования диагностического материала от 4056 больных туберкулезом легких. В 71 случае ни ДНК *M. tuberculosis*, ни культура *M. tuberculosis* не были выделены; эти случаи были исключены из исследования. Из оставшихся 3985 образцов диагностического материала были выделены ДНК и/или культуры *M. tuberculosis* и определена фенотипическая/генотипическая чувствительность к ПТП. При получении результатов для клинических изолятов *M. tuberculosis* и культуральным, и молекулярно-генетическим методом (МГМ), в случае их несовпадения, приоритет отдавался данным, полученным культурально (табл. 1). Так, 38 штаммов, для которых при исследовании культуральным методом была определена устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину, но не были определены мутации в *groV*, обуславливающим устойчивость к рифампицину, были отнесены к категории МЛУ, так как использованные нами тесты для молекулярно-генетического определения ЛУ фиксируют только ограниченное число мутаций, поэтому генетические детерминанты устойчивости к рифампицину в этих случаях могли быть не выявлены. И наоборот, 29 штаммов с выявленными мутациями в *groV*, которые не имели фенотипического проявления в виде формирования устойчивости к рифампицину, были отнесены к категории ИР.

Среди устойчивых штаммов доминировали штаммы с МЛУ (см. табл. 1), однако штаммы с устойчивостью к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину также были достаточно широко представлены (502/3985; 12,60%).

Исследование динамики выявления *M. tuberculosis* с ИР за период 2011–2018 гг. показало, что в 2011–2012 и 2017–2018 гг. частота выявления ИР-ТБ среди всех исследованных за год случаев туберкулеза составила около 14%. В 2013–2016 гг. частота выявления этой формы ТБ была ниже (на уровне 10–11%). Линейный тренд показателя с достаточной степенью надежности описать не удалось (табл. 2).

Так как культуральные методы диагностики туберкулеза обладают меньшей чувствительностью, чем молекулярно-генетические, часть образцов не дали рост культуры *M. tuberculosis* на питательных средах. Поэтому фенотипическая чувствительность к ПТП была определена только для 260 изолятов *M. tuberculosis* с ИР (табл. 3). При классификации по характеру лекарственной резистентности изолятов *M. tuberculosis* с ИР опирались на следующие определения [1]: монорезистентность — устойчивость микобактерий туберкулеза только к одному из ПТП; полирезистентность — устойчивость микобактерий туберкулеза к двум и более противотуберкулезным препаратам, но не к сочетанию изониазида и рифампицина.

Изоляты с моноустойчивостью к изониазиду выделяли в 117/260 (45%) случаев. Остальные 143 (55%) образца относились к полирезистентным и были устойчивы к 2–6 препаратам. Среди полирезистентных изолятов приблизительно в равных долях обнаружены *M. tuberculosis* с устойчивостью к изониазиду в комбинации только с ПТП 1-го ряда (42/143; 29,37%) и в комбинации только с ПТП 2-го ряда (38/143; 26,57%), причем во втором случае почти всегда регистрировали устойчивость к этионамиду (31/38; 81,58%). Наибольшее число полирезистентных изолятов было устойчиво одновременно к препаратам 1-го и 2-го рядов (63/143; 44,06%). Из них устойчивость

одновременно к изониазиду, этамбутолу и этионамиду (HEEto), в том числе в сочетании с другими ПТП 2-го ряда, была выявлена в 20/63 (31,75%) случаев; устойчивость к изониазиду, пиразинамиду и этионамиду (HZEto), в том числе в сочетании с другими ПТП 2-го ряда, встречалась реже — в 9/63 (14,29%) случаев; и устойчивость к HEZEto — в 15/63 (23,81%) случаев. У 19/63 (30,16%) изолятов в спектрах резистентности были представлены другие сочетания препаратов (12 спектров резистентности, включающих от 3 до 5 ПТП).

Данные о мутациях в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, были получены для 451 изолята *M. tuberculosis* с ИР (табл. 4). Чаще всего выявляли единичные однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) в одном из генов, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, — в 386/451 (85,59%) случаев; реже ОНП обнаруживали в двух генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, — в 65/451 (14,41%) случаев. Доминировали мутации в 315-м кодоне *katG* — 413/451 (91,57%), причем только в этом гене — в 348/413 (84,26%) случаев, реже в сочетании с ОНП в *inhA* — в 62/413 (15,01%) случаев, в единичных образцах — в сочетании с ОНП в *ahpC*.

Достаточно часто (94/451; 20,84%) регистрировали замену *inhA15_C->T*, которая в виде единичной мутации встречалась в 33/94 (35,11%) образцов, в остальных случаях эта мутация была сочетанной с ОНП в 315 кодоне *katG*.

Для 209 изолятов *M. tuberculosis* с ИР, устойчивость которых к изониазиду была подтверждена фенотипически, получили подобное распределение мутантных вариантов: 152/209 (72,73%) имели единичную мутацию *katG315_Ser->Thr(1)*; 32/209 (15,31%) — сочетанные мутации

Таблица 1. Исследованные изоляты *M. tuberculosis* и методы установления лекарственной чувствительности

Характер лекарственной устойчивости	Число изолятов, для которых получены данные о лекарственной чувствительности методами (абс.)			Суммарное число изолятов <i>M. tuberculosis</i> , отнесенное к каждой категории на основании МГМ и культуральных методов	
	МГМ и культуральным	Только культуральным	Только МГМ	абс.	% (95% ДИ)
Чувствительные	478	207	673 ¹⁾	1358	34,08 (32,62–35,56)
МЛУ	1179 ²⁾	256	613	2048	51,39 (49,84–52,94)
ИР	209 ³⁾	51	242	502	12,60 (11,60–13,66)
Другие варианты ⁴⁾	42	23	12	77	1,93 (1,55–2,41)
Всего	1908	537	1540	3985	100

Примечание: ¹ — включены случаи, для которых не выявлены мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам; ² — включая 38 изолятов *M. tuberculosis*, для которых не были выявлены мутации в *rpoB* (см. текст); ³ — включая 29 изолятов *M. tuberculosis*, имеющих мутации в *rpoB* без фенотипического проявления в виде формирования устойчивости; ⁴ — моноустойчивость к противотуберкулезным препаратам, кроме изониазида, или полирезистентность к противотуберкулезным препаратам, не включающая изониазид.

Таблица 2. Частота выявления *M. tuberculosis* с ИР за период 2011–2018 г.

Год	Число изолятов <i>M. tuberculosis</i>		
	Всего исследовано за год (абс.)	с ИР	
		абс.	% (95% ДИ)
2011	458	67	14,63 (11,69–18,16)
2012	355	52	14,65 (11,35–18,70)
2013	530	54	10,19 (7,89–13,06)
2014	554	65	11,73 (9,31–14,68)
2015	569	65	11,42 (9,06–14,30)
2016	502	56	11,16 (8,69–14,21)
2017	557	76	13,64 (11,04–16,75)
2018	460	67	14,57 (11,64–18,08)

katG315_Ser->Thr(1) + inhA15_C->T; 17/209 (8,13%) — единичную *inhA15_C->T*. Оставшиеся 8 (3,83%) изолятов с подтвержденной фенотипической ИР несли мутации в других регионах генов, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду (единичные в *ahpC10_C->T*, *katG315_Ser->Asn*; сочетанные *katG315_Ser->Gly + inhA15_C->T*, *katG315_Ser->Thr(1) + inhA8_T->G*; *katG315_Ser->Thr(1) + ahpC10_C->T*).

Таким образом, среди *M. tuberculosis* с ИР доминирующей мутацией была единичная мутация *katG315_Ser->Thr(1)*, которая соответствует нуклеотидной замене AGC->ACC (333/451; 73,84%), далее по убыванию выявлены сочетанные мутации *katG315_Ser->Thr(1) + inhA15_C->T* (60/451; 13,30%) и единичная мутация *inhA15_C->T* (33/451; 7,32%). В целом, на долю этих трех мутантных вариантов приходилось 426/451 (94,46%) *M. tuberculosis* с ИР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучена частота встречаемости устойчивости к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину у *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких из клинических отделений ФГБНУ «ЦНИИТ» за период 2011–2018 гг.

Частота встречаемости этой формы ТБ и динамика распространения популяции в разных регионах мира имеют свою специфику. Так, при анализе данных по лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза, представленных в ВОЗ за период 1994–2009 гг. из 131-го противотуберкулезного учреждения со всего мира, наибольшая частота встречаемости ИР-ТБ была зарегистрирована в Восточной Европе (15%), меньше — в Западной и Центральной Европе (11%), а в остальных регионах ВОЗ не превышала 8% [11]. Для ряда регионов этими авторами была показана тенденция к снижению распространенности данной формы туберкулеза, для других, напротив, повышение, но в большинстве регионов не было установлено четкой линейной динамики показателя. Описанная нами частота встречаемости ИР *M. tuberculosis* (12%) сходна с показателями, характерными для Восточной Европы, а динамика показателя, также как в большинстве регионов, была нелинейной.

В систематическом обзоре, посвященном связи первичной резистентности к изониазиду с приобретением резистентности к другим ПТП [12], было сделано заключение, что приобретенная устойчивость к любому ПТП (не только переход в МЛУ) у моноустойчивых к изониазиду штаммов возникает в 5,1 раз чаще по сравнению с лекарственно-чувствительными штаммами. Показанная в нашем исследовании высокая частота встречаемости полирезистентных штаммов (55% от всех ИР), устойчивых кроме изониазида дополнительно к 1–5 ПТП, подтверждает возможность амплификации лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis* с ИР.

Так как стандартный курс химиотерапии по I режиму, часто назначаемый эмпирически при новых случаях туберкулеза, включает в себя ПТП 1-го ряда — этамбутол и пиразинамид, логично было ожидать выявление высокой доли устойчивости *M. tuberculosis* с ИР именно к этим препаратам. Действительно, устойчивость к этамбутолу была выявлена почти у половины полирезистентных *M. tuberculosis* (70/143, 48,95%; 95% ДИ: 40,89–57,06%) и чуть реже регистрировали устойчивость к пиразинамиду (57/143, 39,86%; 95% ДИ: 32,20–48,05%).

Однако еще чаще у полирезистентных *M. tuberculosis* определяли устойчивость к препарату 2-го ряда этионамиду (80/143, 55,94%; 95% ДИ: 47,76–63,82%). Полученный результат можно объяснить тем, что этионамид является структурным аналогом изониазида и также угнетает синтез миколовых кислот, нарушая построение клеточной стенки микобактерий, поэтому эти два препарата могут иметь общие мишени и генетические детерминанты устойчивости [5, 13].

Таблица 3. Спектры резистентности штаммов *M. tuberculosis*, принадлежащих к категории ИР

Спектр резистентности	Число штаммов <i>M. tuberculosis</i>	
	абс.	% (95% ДИ)
Монорезистентность (Н)	117	45,00 (39,07–51,08)
Полирезистентность (Н + другие ПТП, кроме R):	143	55,00 (48,95–61,05)
К двум ПТП:	71	27,31 (22,25–33,02)
HE	17	
HZ	16	
H Eto	31	
H Am	3	
H Cp	1	
H Lfx	3	
К трем ПТП:	36	13,85 (10,17–18,57)
HEZ	9	
HE Eto	13	
HE Lfx	1	
HZ Cp	1	
HZ Eto	7	
H AmCp	2	
H EtoAm	3	
К четырем ПТП:	21	8,08 (5,34–12,03)
HEZ Eto	6	
HEZ Am	1	
HEZ Lfx	3	
HE AmCp	2	
HE EtoAm	4	
HE EtoLfx	2	
HZ EtoCp	1	
H EtoAmCp	1	
H AmCpLfx	1	
К пяти ПТП:	12	4,62 (2,66–7,89)
HEZ EtoAm	2	
HEZ EtoLfx	4	
HEZ AmCp	2	
HE EtoAmLfx	1	
HZ AmCpLfx	1	
HZ EtoAmLfx	1	
H EtoAmCpLfx	1	
К шести ПТП:	3	1,15 (0,39–3,34)
HEZ EtoAmCp	2	
HEZ EtoAmLfx	1	
Всего	260	100

Примечание: при перечислении препаратов в спектрах резистентности препараты 1-го и 2-го рядов разделены пробелом.

Таблица 4. Изоляты *M. tuberculosis* с ИР с различными сочетаниями мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду

Мутации в <i>katG</i>			Не выявлены	В 315-м кодоне с заменой Ser на					Всего
Мутации в <i>ahpC</i> и <i>inhA</i>				Arg	Asn	Gly	Thr(1)*	Thr(2)*	
Не выявлены мутации в <i>ahpC</i> и <i>inhA</i>			–	4 (0,89; 0,35–2,26)	7 (1,55; 0,75–3,17)	3 (0,67; 0,23–1,94)	333 (73,84; 69,59–77,68)	1 (0,22; 0,04–	348 (77,16; 73,07–80,80)
В <i>ahpC</i> с заменой нуклеотида в позиции	6	G→A	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
	10	C→A	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
		C→T	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	2 (0,44; 0,12–1,60)
	12	C→T	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
В <i>inhA</i> с заменой нуклеотида в позиции	8	T→A	2 (0,44; 0,12–1,60)	–	–	–	–	–	2 (0,44; 0,12–1,60)
		T→G	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
	15	C→G	1 (0,22; 0,04–1,25)	–	–	–	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)
		C→T	33 (7,32; 5,26–10,10)	–	–	1 (0,22; 0,04–1,25)	60 (13,30; 10,48–16,75)	–	94 (20,84; 17,35–24,83)
Всего			38 (8,43; 6,20–11,35)	4 (0,89; 0,35–2,26)	7 (1,55; 0,75–3,17)	4 (0,89; 0,35–2,26)	397 (88,03; 84,70–90,71)	1 (0,22; 0,04–1,25)	451 (100)

Примечание: серым цветом выделены ячейки с ОНП только в одном гене, ассоциированном с устойчивостью к изониазиду, в других ячейках — сочетанные мутации. * Thr(1) соответствует замене AGC→ACC, Ser→Thr(2) соответствует замене AGC→ACA.

В целом, терапия ИР форм ТБ препаратами 1-го ряда по стандартной схеме приводит к неоптимальным результатам терапии (неэффективное лечение, рецидивы, приобретенная МЛУ). Кроме того, стандартизованное эмпирическое лечение ИР-ТБ может в значительной степени способствовать развитию эпидемии ТБ с МЛУ, особенно в тех регионах, где часто встречается ИР-ТБ [7]. В то же время своевременная коррекция терапии при получении данных о наличии устойчивости к изониазиду и применение модифицированных схем гарантировали успех лечения и не приводили к рецидивам [14–16].

В связи с этим следует упомянуть два клинических исследования, задачей которых было установить зависимость от мутаций в геноме возбудителя эффективности терапии высокими дозами изониазида ИР формы ТБ [17, 18]. Известно, что мутации в *katG* (доминировали в нашем исследовании) приводят к высокому уровню резистентности к изониазиду, а мутации только в *inhA* — к низкому уровню резистентности [5]. По итогам клинических исследований, терапия изониазидом была эффективна в том случае, если у возбудителя выявляли мутации на уровне *inhA*, а неблагоприятные исходы лечения были при мутациях на уровне *katG* [17, 18].

Все вышесказанное свидетельствует о том, что необходима отработка эффективных схем терапии ИР-ТБ [8, 19]. Кроме того, важно уделять внимание ускоренной диагностике ЛУ к изониазиду. Быструю специфичную и чувствительную диагностику ЛУ *M. tuberculosis* могут обеспечить только молекулярно-генетические методы (1–2 дня по сравнению с несколькими неделями культуральной диагностики), которые также дают возможность получить информацию о мутации и об уровне резистентности к изониазиду возбудителя [1]. Это делает МГМ наиболее востребованными в диагностике туберкулеза и определении лекарственной устойчивости возбудителя. Применяемые в крупных диагностических центрах фтизиатрического профиля тесты, основанные на аллель-специфичной ПЦР, биочипах или ДНК-стрипах,

позволяют провести диагностику в кратчайшие сроки, но предъявляют высокие требования к квалификации персонала и инфраструктуре лабораторий.

В настоящее время единственным молекулярным тестом, который можно применять в лабораториях всех уровней, является Xpert MTB/RIF на платформе GeneXpert [20]. Но так как диагностика сегодня сосредоточена на выявлении МЛУ, маркером которой служит устойчивость к рифампицину, этот тест диагностирует только генотипическую устойчивость к рифампицину. Следовательно, устойчивость только к изониазиду без устойчивости к рифампицину (12% в нашем случае) не будет определена с использованием этого метода диагностики, а при невозможности применения дополнительных диагностических тестов никогда не будет установлена и, следовательно, из-за неадекватной химиотерапии может способствовать появлению новых случаев МЛУ. Поэтому актуальна разработка простого молекулярно-генетического теста, который может быть внедрен повсеместно и по удобству использования будет подобен Xpert MTB/RIF.

Выводы

Туберкулез с ИР возбудителя можно рассматривать как потенциального предшественника туберкулеза с МЛУ. Поэтому важно контролировать распространение первичной устойчивости к изониазиду и предотвращать амплификацию устойчивости. Анализ частоты встречаемости устойчивости к изониазиду с сохраненной чувствительностью к рифампицину у *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких, показал достаточно высокий уровень встречаемости ИР-ТБ (более 12% от всех проанализированных случаев) — как правило с мутациями, приводящими к высокому уровню резистентности к изониазиду. Полученные данные подчеркивают важность ускоренного определения молекулярно-генетическими методами лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* одновременно к рифампицину и изониазиду в лабораториях

всех уровней. Для обеспечения этой возможности необходима разработка новых простых тестов в формате

point-of-care, не предъявляющих высоких требований к инфраструктуре лаборатории.

Литература

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 декабря 2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. (WHO/CDS/TB/2018.20).
3. Нечаева О. Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (8): 15–24.
4. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/CDS/TB/2019.33).
5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; (13): 1320–30.
6. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med. 2009; 6 (2): e2.
7. Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (2): 223–34.
8. World Health Organization. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.7).
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006.
10. Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г., Ларионова Е. Е., и др. Стандартные операционные процедуры. Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием системы BACTEC MGIT 960/320. Москва, 2015.
11. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the Burden and Trends of Isoniazid Resistant Tuberculosis, 1994–2009. PLoS ONE. 2011; 6 (7): e22927.
12. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S, Pai M, et al. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2009; 6 (9): e1000146.
13. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008; (46): 42–9.
14. Bang D, Andersen PH, Andersen AB, Thomsen VØ. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome. J Infect. 2010; 60 (6): 452–7.
15. Salindri AD, Sales RF, DiMiceli L, Schechter MC, Kempker RR, Magee MJ. Isoniazid monoresistance and rate of culture conversion among patients in the state of Georgia with confirmed tuberculosis, 2009–2014. Ann Am Thorac Soc. 2018; 15 (3): 331–40.
16. Cattamanchi A, Dantes RB, Metcalfe JZ, Jarlsberg LG, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-mono-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis. 2009; 48 (2): 179–85.
17. Tolani MP, D'souza DT, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. BMC Infect Dis. 2012; (12): 9.
18. Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (8): 3620–7.
19. Stagg HR, Harris RJ, Hatherell HA, Obach D, Zhao H, Tsuchiya N, et al. What are the most efficacious treatment regimens for isoniazid-resistant tuberculosis? A systematic review and network meta-analysis. Thorax. 2016; 71 (10): 940–9.
20. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: World Health Organization; 2017. WHO/HTM/TB/2017.04. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>. Accessed: 18 May 2019.

References

1. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 9 December 2014 «Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendatsiy po sovershenstvovaniyu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dykhaniya». Russian.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. (WHO/CDS/TB/2018.20).
3. Nechaeva OB. TB situation Russia. Tuberculosis and Lung Diseases. 2018; 96 (8): 15–24. Russian.
4. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/CDS/TB/2019.33).
5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009; (13): 1320–30.
6. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PLoS Med. 2009; 6 (2): e2.
7. Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (2): 223–34.
8. World Health Organization. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.7).
9. Siddiqi SH, Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006.
10. Chernousova LN, Smirnova TG, Larionova EE, i dr. Standartnyye operatsionnyye protsedury. Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikobakteriy tuberkuleza k protivotuberkuleznym preparatam vtorogo ryada s ispol'zovaniyem sistemy BACTEC MGIT 960/320. Moscow, 2015. Russian.
11. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the Burden and Trends of Isoniazid Resistant Tuberculosis, 1994–2009. PLoS ONE. 2011; 6 (7): e22927.
12. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S, Pai M, et al. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2009; 6 (9): e1000146.
13. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008; (46): 42–9.
14. Bang D, Andersen PH, Andersen AB, Thomsen VØ. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome. J Infect. 2010; 60 (6): 452–7.
15. Salindri AD, Sales RF, DiMiceli L, Schechter MC, Kempker RR, Magee MJ. Isoniazid monoresistance and rate of culture

- conversion among patients in the state of Georgia with confirmed tuberculosis, 2009–2014. *Ann Am Thorac Soc*. 2018; 15 (3): 331–40.
16. Cattamanchi A, Dantes RB, Metcalfe JZ, Jarlsberg LG, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-monoresistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2009; 48 (2): 179–85.
 17. Tolani MP, D'souza DT, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. *BMC Infect Dis*. 2012; (12): 9.
 18. Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (8): 3620–7.
 19. Stagg HR, Harris RJ, Hatherell HA, Obach D, Zhao H, Tsuchiya N, et al. What are the most efficacious treatment regimens for isoniazid-resistant tuberculosis? A systematic review and network meta-analysis. *Thorax*. 2016; 71 (10): 940–9.
 20. World Health Organization. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. Geneva: World Health Organization; 2017. WHO/HTM/TB/2017.04. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2017/XpertUltra/en/>. Accessed: 18 May 2019.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ МИОМЫ МАТКИ: ПОИСК МАРКЕРНЫХ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

К. А. Свирепова¹✉, М. В. Кузнецова¹, Н. С. Согоян¹, Д. В. Зеленский², Е. А. Лоломадзе¹, Г. В. Михайловская¹, Н. Д. Мишина¹, А. Е. Донников¹, Д. Ю. Трофимов¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Валу́йская центральная районная больница, Валу́йки, Россия

Миома матки является одной из важнейших социально значимых проблем женского репродуктивного здоровья. Целью исследования было найти маркерные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), ассоциированные с развитием миомы матки. Для проверки гипотезы о том, что наследственность играет важную роль в патогенезе миом, группу из 100 пациенток с подтвержденным диагнозом миомы матки разделили на две подгруппы: подгруппу 1a с отягощенным семейным анамнезом, подгруппу 1b с неотягощенным семейным анамнезом по миоме матки. Группа сравнения была сформирована из 30 пациенток (женщины в постменопаузе, не имевшие в анамнезе миому матки, отрицавшие наличие миом у ближайших родственников). Первичную нуклеотидную последовательность определяли с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Были выявлены статистически значимые ($p < 0,05$) различия между исследованными группами по частотам генотипов по rs12637801 и rs12457644. Впервые обнаружены «протективные» SNP, редкие аллели которых могут служить маркерами пониженного риска развития лейомиом матки.

Ключевые слова: миома матки, соматические мутации, однонуклеотидные полиморфизмы

Финансирование: работа выполнена в рамках госзадания 2019 г. «Совершенствование тактики ведения больных доброкачественными заболеваниями органов репродуктивной системы с использованием высокотехнологических методов функциональной визуальной диагностики и панели молекулярно-биологических маркеров прогрессирования и рецидива заболеваний».

Вклад авторов: К. А. Свирепова — анализ литературы, проведение исследования, написание текста статьи; М. В. Кузнецова — проведение исследования, написание текста статьи; Н. С. Согоян — сбор материала и ведение коллекции в биобанке; Д. В. Зеленский — сбор и предоставление материала для исследования; Е. А. Лоломадзе, Г. В. Михайловская — помощь в проведении лабораторной части исследования; Н. Д. Мишина — статистическая обработка результатов; А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов — общее руководство и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ксения Александровна Свирепова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; kseswi@yandex.ru

Статья получена: 05.02.2020 **Статья принята к печати:** 19.02.2020 **Опубликована онлайн:** 28.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.011

HEREDITARY RISK FACTORS FOR UTERINE LEIOMYOMA: A SEARCH FOR MARKER SNPS

Svirepova KA¹✉, Kuznetsova MV¹, Sogoyan NS¹, Zelensky DV², Lolomadze EA¹, Mikhailovskaya GV¹, Mishina ND¹, Donnikov AE¹, Trofimov DY¹

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Valuyki Central Hospital, Valuyki, Russia

Uterine leiomyomas are a worrying reproductive health issue that has serious social implications. The aim of this study was to conduct a search for marker single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with uterine leiomyoma. To test the hypothesis about the contribution of genetic predisposition to the pathogenesis of myomas, the initial group of 100 patients with a verified diagnosis of uterine leiomyoma was divided into 2 subgroups: subgroup 1a (women with a family history of the disease) and subgroup 1b (women with no family history of the disease). The control group consisted of 30 postmenopausal patients who did not have a medical history of uterine fibroids and denied uterine fibroids in their close female relatives. DNA sequences were read using Sanger sequencing. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were discovered between the analyzed groups in terms of genotype frequencies for rs12637801 and rs12457644. Also, previously unknown protective SNPs were identified whose rare alleles could predict the reduced risk of uterine leiomyomas.

Keywords: leiomyoma, somatic mutation, single nucleotide polymorphism

Funding: this study was part of the State Assignment (2019) on the Improved management of patients with benign reproductive system neoplasms with hi-tech diagnostic imaging techniques and molecular panels for predicting the progression and relapse of the disease.

Author contribution: Svirepova KA analyzed the literature, carried out the research and wrote the manuscript with input from all authors; Kuznetsova MV carried out the research and wrote the manuscript with input from all authors; Sogoyan NS collected tissue samples and documented them in the biobank's register; Zelensky DV collected tissue samples for research; Lolomadze EA, Mikhailovskaya GV helped with the laboratory part of the research; Mishina ND performed statistical analysis; Donnikov AE, Trofimov DY supervised the study and revised the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. Informed consent was obtained from all participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ksenia A. Svirepova
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; kseswi@yandex.ru

Received: 05.02.2020 **Accepted:** 19.02.2020 **Published online:** 28.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.011

Лейомиома матки — одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской половой системы [1]. Среди женщин репродуктивного возраста частота ее встречаемости составляет 40–50%, у одной трети пациенток развитие таких опухолей сопровождается серьезными симптомами [1–4].

Миома матки зачастую протекает бессимптомно, особенно в начале развития заболевания, при небольших размерах узлов, их небольшом количестве. Однако существуют тревожные симптомы, которые могут стать причиной значительного снижения качества жизни у большей части женского населения. Основные жалобы

пациенток связаны с болевым синдромом при растущей миоме; утомляемостью, слабостью, рассеянностью, появляющимися на фоне менометроррагии и хронической анемии; диспареунией, психологическим стрессом, связанным с вышеуказанными проблемами и страхом перед возможными медицинскими вмешательствами или перед нарушениями репродуктивной функции [5–8].

Важную роль данной гинекологической патологии отводят и в качестве причины женского бесплодия. При обследовании по поводу как первичного, так и вторичного бесплодия миому матки обнаруживают в 23,5% случаев [9]. В мире лейомиома ассоциирована с 10% случаев бесплодия у женщин и является единственной причиной бесплодия у 1–3% пациенток. Влияние миомы матки на бесплодие в значительной степени зависит от локализации миоматозных узлов [10].

Социальная значимость данного заболевания также высока по ряду причин. Современная женщина ведет активный образ жизни, и симптомы, связанные с ростом миомы, могут существенно ухудшать качество жизни женщины, снижать ее работоспособность, увеличивать частоту госпитализаций в гинекологические стационары, в связи с этим увеличиваются затраты государства на лечение таких пациенток.

Научная литература содержит большой объем информации, посвященной поискам факторов, вызывающих развитие миомы матки, среди которых генетические, гормональные и ряд других. Однако однозначных причинно-следственных отношений между этими факторами и патогенезом миом пока не установлено. Согласно популяционным исследованиям распространенности заболевания, важнейшую роль в развитии миом играет генетическая предрасположенность — примерно у 5–10% женщин наблюдается «семейная форма» миомы матки [1]. Опубликован также ряд исследований, показывающих, что для женщин афро-американского происхождения характерен повышенный риск развития лейомиомы, что демонстрирует генетические различия между расами в отношении рисков развития заболевания. Согласно современным данным, в возрасте 50 лет примерно у 70–80% женщин обнаруживают хотя бы один миоматозный узел, а развитие тяжелых осложнений возможно почти у 15–30% больных [11–14].

Уже более 20 лет активно идут поиски генетических маркеров развития лейомиом. Так как миомы являются моноклональными опухолями, т. е. развиваются из одной клетки-предшественницы, то с появлением NGS-методов соматические изменения генома миом стали изучать довольно интенсивно. Было установлено, что наиболее частым вариантом соматических изменений генома в лейомиомах становятся мутации в гене *MED12*, большая часть из которых представляет собой однонуклеотидные замены в кодонах 43 и 44 экзона 2 [15]. Данный вид соматических мутаций выявлен в 70% случаев. Это стало наиболее значимым открытием, связанным с патогенезом миом, поскольку в миомах с мутацией в *MED12* не обнаружили больше никаких соматических изменений генома. Кроме того, было показано, что в миомах с мутацией в *MED12* возрастает экспрессия гена *RAD51B*, что также может способствовать клеточной пролиферации и росту опухоли [16–17]. Ген *MED12* расположен на X-хромосоме и кодирует белок массой 250 кДа, представляющий собой субъединицу большого медиаторного комплекса и участвующего в регуляции транскрипции комплекса РНК-полимеразы II.

При дальнейшем изучении было установлено, что в гене *MED12* наиболее распространена соматическая мутация 131G>A. Всего в экзоне 2 гена *MED12* удалось выявить шесть вариантов однонуклеотидных замен в трех позициях: 130G>A, 130G>C, 130G>T, 131G>T, 130G>T, 131G>C (расположены по увеличению частоты встречаемости) [18].

Несмотря на высокую распространенность мутаций *MED12* в лейомиомах матки человека, причины их возникновения и механизм действия до сих пор неизвестны. В опубликованном нашей группой в 2016 г. исследовании было выявлено, что соматические мутации в экзоне 2 гена *MED12* обнаруживали в 50% образцов миоматозных узлов среди исследованной выборки российских женщин [19–20]. Перспективным представляется дальнейший поиск генетических маркеров, ассоциированных с риском развития заболеваний. Такой подход уже используют при изучении целого ряда онкологических заболеваний. Так, для эндометриоза уже выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), наличие патогенных аллелей которых повышает риск развития этого заболевания [21].

Поиск генетических маркеров развития лейомиомы идет во все мире. В метаанализе, проведенном в 2020 г. [22], продемонстрирована прямая связь девяти SNP с риском развития миомы матки на уровне значимости всего генома ($p < 6,6 \cdot 10^{-9}$): rs3820282 (1p36.12), rs124793436 (2p25.1), rs2251795 (3q26.2), rs2242652 (5p15.33), rs75228775 (10q24.33), rs2280543 (11p15.5), rs17033114 (12q23.2), rs7989971 (13q14.11) и rs12484776 (22q13.1) в популяции японских женщин. При этом rs2251795, rs2242652, rs75228775, rs2280543 и rs7989971 показали статистически значимые эффекты у пациенток с множественными миоматозными узлами по сравнению с пациентками с одиночным миоматозным узлом. Два SNP (rs2251795 и rs75228775) были ассоциированы с субмукозной лейомиомой, а rs2280543 на 11p15.5 был связан с интрамуральной лейомиомой матки. Данные ассоциации подчеркивают важность дальнейших исследований в этой области с целью выявить влияние вариантов аллелей различных генов на патогенез столь распространенного и до конца непонятого заболевания, как лейомиома матки.

Цель исследования заключалась в поиске маркерных SNP развития лейомиомы матки.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Отбор пациентов для проведения исследования осуществляли в отделении оперативной гинекологии Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова и в гинекологическом отделении Валуйской центральной районной больницы в период с 2018–2019 гг. В исследование были включены 100 пациенток с диагнозом миомы матки. Критерии включения пациенток в исследование: репродуктивный возраст; наличие миомы матки, подтвержденной клинически и функциональными методами исследования (для основной группы); показания к оперативному лечению. Критерии исключения пациенток: острые инфекционные заболевания; аденомиоз III, IV степени; злокачественные заболевания органов малого таза; противопоказания к оперативному вмешательству. Для проверки гипотезы о том, что наследственность играет важную роль в патогенезе миом, основную группу, состоящую из 100 пациенток с подтвержденным диагнозом миомы матки, разделили на две подгруппы: в подгруппу Ia

вошли 53 пациентки в возрасте 20–46 лет с отягощенным анамнезом, у которых миома была диагностирована у ближайших родственниц по материнской линии (мамы, бабушки, сестры, тети) с единичными или множественными миоматозными узлами; в подгруппу 1б вошло 47 пациенток в возрасте 19–42 лет с неотягощенным анамнезом по миоме матки с единичными или множественными миоматозными узлами. Выделение данных подгрупп проводили на стадии опроса и сбора анамнеза пациенток. Группа сравнения была сформирована из 30 пациенток (женщины в постменопаузе, не имевшие в анамнезе миому матки, отрицавшие наличие миом у ближайших родственниц).

Отбор образцов

Сбор образцов тканей миом производили непосредственно во время операций миомэктомии или гистерэктомии (объем операций зависел от размера и количества узлов). Фрагменты тканей помещали в физиологический раствор, отправляли в биобанк и замораживали при -70°C для последующего хранения в коллекции. Образцы каждого узла подвергали гистологическому исследованию с целью подтверждения наличия исключительно ткани миоматозного узла в образце и отсутствия в нем ткани капсулы или миометрия.

Выделение ДНК

ДНК выделяли с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen; США) согласно протоколу производителя.

Постановка ПЦР-реакции

ПЦР-реакции проводили в термоциклере S1000tm (BioRad; США) при следующих температурных режимах: начальная денатурация в течение 2 мин при 94°C , далее 35 циклов с последовательной сменой температур: денатурация при 94°C в течение 60 с, отжиг праймера при 64°C — 60 с, элонгация при 72°C — 1,5 мин, конечная стадия 72°C — 10 мин (табл. 1). Эффективность амплификации определяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле. Гели окрашивали бромистым этидием. Для визуализации и документирования результатов электрофореза применяли систему гель-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad ChemiDoc XRS Gel Photo Documentation System) (Bio-Rad; США).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для секвенирования участков генома, в которых локализованы исследуемые полиморфизмы

ID	Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
rs12637801	KCNMB2	s3: p-5'-CCA Tgg gCT ACA gTT TAC CA-3'
		a4: p-5'-gTC CCT gTA AgA ATg CTT ggA C-3'
rs2861221	CELF4	s1: 5'-gCC CTC TgT gCT Cgg gAA -3'
		a2: 5'-Tgg CCC AgC AgT gAT AAA gT -3'
rs3020434	ESR1	s1: 5'-TTg CgC TTT gCT gTT AAT gAA g -3'
		a2: 5'-TgA CCC TAA TAC ACC TAg gAA AgT g -3'
rs11742635	FBN2	s1: 5'-ATC CAA ATA gTg AAA ACT Cag Tag gTA C -3'
		a2: 5'-gTg gAg CAT CAg TTA TAg gAA ggC -3'
rs12457644	CELF4	s3: p-5'-TAC ggg CAg ACA ACg ggT-3'
		a4: p-5'-AAG CCC TTg gTA TTC TAg CCT TAC-3'

Постановка сиквенсной реакции

Первичную нуклеотидную последовательность определяли секвенированием по методу Сэнгера. ПЦР-реакцию для секвенирования проводили с помощью набора Big Dye X-terminator v. 1.1 (Applied Biosystems; США). Полученные ПЦР-продукты анализировали на приборе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; США). Последовательности ампликонов сопоставляли с соответствующими референсными последовательностями по каждому rs. При анализе последовательностей использовали программный пакет BioEdit (Tom Hall; США).

Метод прямого переосаждения ДНК в мягких условиях

Очищенный ПЦР-продукт получали методом прямого осаждения ДНК в мягких условиях для очистки смеси от праймеров и других компонентов ПЦР-реакции, без использования коммерческих продуктов. Применяли смесь NH_4Ac + EtOH (конечная концентрация ацетата аммония — 0,125 М, этанола — 70%). В каждую из пробирок с ПЦР-продуктом (10 мкл ПЦР-смеси) добавляли 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом, перемешивали на вортексе или переворачиванием. Высаживание проводили при комнатной температуре в течение 20 мин, затем центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 15 мин, удаляли супернатант, осадок промывали 100 мкл 70%-го этанола комнатной температуры, центрифугировали еще 15 мин при 13 000 об./мин, удаляли супернатант и высушивали в термостате или вакуумной центрифуге, после этого добавляли в каждую пробирку по 20 мкл формамида.

Обработка полученных результатов в редакторе BioEdit

На основании полученных сиквенсных хроматограмм были определены генотипы пяти исследуемых полиморфизмов для изучаемых образцов в редакторе выравнивания биологических последовательностей BioEdit (Tom Hall; США).

Статистическая обработка данных

Для проведения статистического анализа данных использовали следующие программные продукты: Microsoft Excel 2013 (Microsoft; США), библиотеки SciPy (SciPy 1.4.1, Python Software Foundation; США), Pandas для

языка программирования Python 2.7 (pandas 1.0.1., Wes McKinney; США). Для оценки характера распределения количественных данных предварительно проводили тест с *W*-критерием Шапиро–Уилка. Поскольку в большинстве случаев распределение данных было отлично от нормального, использовали методы непараметрической статистики. В качестве меры центральной тенденции количественных признаков была выбрана медиана (Me), а в качестве интервальной оценки — верхний (H) и нижний квартили (L). Результаты представляли в виде Me (L–H). Для оценки значимости межгрупповых различий применяли *U*-критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей. Достоверность различий в частоте встречаемости качественных признаков определяли по критерию χ^2 с поправкой на правдоподобие. Оценку соответствия выявленных частот генотипов закону Харди–Вайнберга проводили по критерию χ^2 в сравнении с ожидаемыми частотами генотипов равновесного распределения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95%-й уровень значимости). Отношение шансов (ОШ) представлено с 95%-м доверительным интервалом (ДИ). При оценке ассоциации аллеля с фенотипическим признаком (наличие миомы матки и наследственная отягощенность анамнеза по этому заболеванию) сравнивали генотипические частоты анализируемого аллеля в группах пациенток, имеющих и не имеющих данный признак. При наличии статистически значимых различий в распределении аллелей сравнивали распределение генотипов в данных группах. При этом проверяли гипотезы об аутосомно-доминантном и аутосомно-рецессивном типе наследования анализируемого признака методом построения соответствующих модели четырехпольных таблиц. Для каждой таблицы рассчитывали двухсторонний критерий Фишера (*F*) при количестве наблюдений в одной из ячеек менее пяти или критерий χ^2 . Также рассчитывали отношение шансов (ОШ) проявления признака при соответствующем генотипе (гомозиготы при аутосомно-рецессивном типе наследования и гетеро- и гомозиготы для аутосомно-доминантного). ОШ приведено с 95%-м доверительным интервалом (ДИ). 95%-е доверительные интервалы рассчитывали на основании распределения χ^2 , как описано в Statistical Methods for Rates and Proportions [23]. Заключение о наиболее вероятном типе наследования делали по результатам сравнения моделей: наилучшей признавали модель с максимальной статистической значимостью различий в распределении генотипов.

Таблица 2. «Кандидатные» полиморфизмы и гены и места их локализации

ID	Ген	Мутации/замены	Название последовательности	Координаты в геноме (g.) согласно базе HGVS
rs12637801	<i>KCNMB2</i>	C>A	GRCh37.p13 chr 3 GRCh38.p12 chr 3	NC_000003.11:g.178379500C>A NC_000003.12:g.178661712C>A
rs2861221	<i>CELF4</i>	C>G	GRCh37.p13 chr 18 GRCh38.p12 chr 18	NC_000018.9:g.34940179 C>G NC_000018.10:g.37360216 C>G
rs3020434	<i>ESR1</i>	C>T	GRCh37.p13 chr 6 GRCh38.p12 chr 6	NC_000006.11:g.152358940C>T NC_000006.12:g.152037805C>T
rs11742635	<i>FBN2</i>	G>T	GRCh37.p13 chr 5 GRCh38.p12 chr 5	NC_000005.9:g.127788794G>T NC_000005.10:g.128453101G>T
rs12457644	<i>CELF4</i>	G>A	RCh37.p13 chr 18 GRCh38.p12 chr 18	NC_000018.9:g.34944976 G>A NC_000018.10:g.37365013G>A

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генотипирование образцов проводили по следующим локусам: *KCNMB2* — rs12637801, *CELF4* — rs2861221, *ESR1* — rs3020434, *FBN2* — rs11742635, *CELF4* — rs12457644. Данные SNP были выбраны на основании пилотного исследования, проведенного с помощью микроматричного анализа на чипах SNP 6.0 (ThermoFisher; США) для 20 пациенток с отягощенным семейным анамнезом по миоме матки и наличием соматических мутаций в гене *MED12* и 14 пациенток контрольной группы (женщины в постменопаузе, не имевшие в анамнезе миому матки). С помощью статистического анализа было проведено сопоставление частот 906 600 SNP между группами, после чего шесть кандидатных SNP, для которых выявили различия в распределении аллелей и генотипов, были выбраны для генотипирования на более широкой выборке из 100 пациенток с миомами (табл. 2).

Был проведен анализ ассоциации между наличием заболевания/наследственной отягощенностью анамнеза и распределением аллелей исследуемого полиморфизма. Распределение частот генотипов для всех исследованных полиморфизмов соответствовало закону Харди–Вайнберга. Для оценки ассоциации генотипа пациентки с миомой матки были проанализированы распределения генотипов исследуемых полиморфизмов среди трех групп пациенток (табл. 3, 4).

При сопоставлении группы сравнения (данная группа представлена меньшей выборкой по сравнению с основной группой женщин, имеющих миому матки) с подгруппой Ia (пациенток с отягощенным анамнезом по миоме матки), была обнаружена статистически значимая разница в частоте выявления «протективных» вариантов полиморфизмов и аллелей рисков развития миомы матки, что указывает на возможность использовать данные полиморфизмы в качестве маркеров для прогнозирования вероятности развития миомы. Увеличение частот минорных аллелей в группе сравнения в сопоставлении с группой женщин с миомами гораздо достовернее выявлено в подгруппе больных с отягощенным семейным анамнезом, что свидетельствует о роли генетической компоненты в развитии наследственных, «семейных» форм лейомиоматоза.

Статистический анализ результатов, приведенных в табл. 4, показал, что частота распространенного аллеля G однонуклеотидного полиморфизма rs11742635 достоверно

выше в подгруппе с неотягощенным анамнезом, что делает его фактором риска развития миомы матки, но не связывает с наследственной предрасположенностью. Возможно, данный аллель больше ассоциирован с другими факторами развития данной патологии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время ученые ведут поиск генетических маркеров развития различных социально значимых гинекологических заболеваний для создания генетических панелей ранней диагностики, прогнозирования рецидивирования, оптимизации тактики ведения и создания новых препаратов для лечения данных заболеваний.

Факторы, вызывающие развитие миомы матки, не установлены, хотя научная литература содержит большой объем информации, имеющий отношение к эпидемиологии, генетике, гормональным аспектам и молекулярной биологии этой опухоли. Перечисленные выше факты определяют актуальность изучения данного заболевания.

Впервые «семейные случаи» миомы матки, а также зависимость частоты и тяжести течения данного заболевания от этнического происхождения женщин были показаны в исследованиях американских генетиков [24–25]. Ученым удалось обнаружить геномные ассоциации с развитием миомы матки при генотипировании 261 женщины европеоидной расы, являющихся членами одной

Таблица 3. Распределение аллелей исследованных полиморфизмов в группе сравнения, в подгруппе Ia (среди женщин с отягощенным анамнезом по данному заболеванию) и в основной группе с миомой матки

ID	Вариант аллеля	Частота встречаемости, %			Критерий Фишера		OR	
		Группа сравнения, n = 30	Подгруппа Ia с отягощенным анамнезом, n = 53	Основная группа пациенток с миомами, n = 100	Подгруппа Ia с отягощенным анамнезом	Основная группа с миомами	Подгруппа Ia с отягощенным анамнезом	Основная группа с миомами
<i>KCNMB2</i> rs12637801	AA	0,00	0,02	0,02	0,04	0,09	2,63	2,01
	AC	0,47	0,23	0,28				
	CC	0,53	0,75	0,70				
<i>CELF4</i> rs2861221	CC	0,60	0,71	0,66	0,30	0,32	1,64	0,48
	CG	0,30	0,23	0,29				
	GG	0,10	0,06	0,05				
<i>ESR1</i> rs3020434	CC	0,43	0,61	0,58	0,11	0,17	2,09	1,77
	CT	0,50	0,33	0,35				
	TT	0,07	0,06	0,07				
<i>FBN2</i> rs11742635	GG	0,57	0,67	0,73	0,27	0,09	0,27	2,04
	GT	0,37	0,31	0,25				
	TT	0,06	0,02	0,02				
<i>CELF4</i> rs12457644	AA	0,13	0,06	0,05	0,04	0,09	2,63	2,01
	AG	0,33	0,19	0,25				
	GG	0,53	0,75	0,70				

Таблица 4. Распределение аллелей исследованных полиморфизмов в группе сравнения и подгруппе Ib (среди женщин с неотягощенным анамнезом по данному заболеванию) и в основной группе с миомой матки

ID	Вариант аллеля	Частота встречаемости, %			Критерий Фишера		OR	
		Группа сравнения, n = 30	Подгруппа Ib с неотягощенным анамнезом, n = 47	Основная группа пациенток с миомами, n = 100	Подгруппа Ib с неотягощенным анамнезом	Основная группа с миомами	Подгруппа Ib с неотягощенным анамнезом	Основная группа с миомами
<i>KCNMB2</i> rs12637801	AA	0,00	0,02	0,02	0,35	0,09	1,54	2,01
	AC	0,47	0,34	0,28				
	CC	0,53	0,64	0,70				
<i>CELF4</i> rs2861221	CC	0,60	0,60	0,66	0,30	0,32	1,64	0,48
	CG	0,30	0,36	0,29				
	GG	0,10	0,04	0,05				
<i>ESR1</i> rs3020434	CC	0,43	0,53	0,58	0,40	0,17	2,83	1,77
	CT	0,50	0,38	0,35				
	TT	0,07	0,09	0,07				
<i>FBN2</i> rs11742635	GG	0,57	0,79	0,73	0,04	0,09	2,83	2,04
	GT	0,37	0,19	0,25				
	TT	0,06	0,02	0,02				
<i>CELF4</i> rs12457644	AA	0,13	0,79	0,05	0,15	0,09	0,29	2,01
	AG	0,33	0,19	0,25				
	GG	0,53	0,02	0,70				

семьи (первая линия родства). Иммуногистохимическое и генетическое исследования данной группы пациенток выявили аллель риска развития миомы матки — ген *FASN*, кодирующий синтазу жирных кислот, локализованный в участке 17q25.3 [24–25].

В полногеномном исследовании было проанализировано 457 044 SNP у 1607 женщин с клинически диагностированной миомой матки и 1428 женщин группы контроля [26]. SNP с высокой ассоциацией ($p < 5 \cdot 10^{-5}$) были дополнительно генотипированы у 3466 пациенток с миомой матки и 3245 из группы контроля без миомы матки в истории болезни. Значимые ассоциации с миомой матки для всего генома были выявлены на трех локусах хромосом 10q24.33, 22q13.1 и 11p15.5. Наиболее значимыми при комбинированном анализе в каждом из этих локусов оказались rs7913069 ($p = 8,65 \cdot 10^{-14}$, отношение шансов (OR) = 1,47), rs12484776 ($p = 2,79 \cdot 10^{-12}$, OR = 1,23) и rs2280543 ($p = 3,82 \cdot 10^{-12}$, OR = 1,39) соответственно, дальнейшее изучение которых, по мнению авторов, может способствовать выявлению причин развития миомы матки.

В 2017–2018 гг. в пилотном исследовании с целью поиска генетических маркеров развития миомы было проведено генотипирование образцов по 906 600 SNP пациенток с миомой матки, с выявленной в анамнезе отягощенностью по данному заболеванию (миома матки у родственниц первой линии родства по материнской линии) и контрольной группы, в которую вошли женщины без миомы матки в анамнезе [27]. В результате генотипирования удалось выявить шесть полиморфизмов (rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs17677069) генов *ESR1*, *FBN2*, *CELF4*, *KCWMB2*, частоты которых статистически различались в обеих исследуемых группах по сравнению с остальными SNP, при этом были больше в группе женщин с отягощенным анамнезом по сравнению с группой контроля. Дальнейшее исследование рассматривало только указанные выше шесть полиморфизмов, которые, вероятно, связаны с развитием миомы матки. В этой работе не было обнаружено редких аллелей полиморфизмов генов rs3020434, rs11742635,

rs2861221, и rs17677069 в группах с отягощенным анамнезом [27].

В нашем исследовании проведено генотипирование образцов по 5 SNP (rs12637801, rs2861221, rs3020434, rs11742635, rs124577644) пациенток с отягощенным анамнезом, у которых миома была диагностирована у ближайших родственниц по материнской линии (мама, бабушка, сестра, тетя) — подгруппа Ia, пациенток без отягощенного анамнеза — подгруппа Ib и пациенток группы сравнения без миомы матки в анамнезе. Согласно полученным данным, генотипическая частота встречаемости аллеля С однонуклеотидного полиморфизма в гене *KCWMB2* (rs12637801) статистически значимо выше в подгруппе пациенток с отягощенным анамнезом по сравнению с группой сравнения (87% против 77%; $p = 0,04$; OR = 2,63) и генотипическая частота встречаемости аллеля G однонуклеотидного полиморфизма в гене *CELF4* (rs124577644) статистически значимо выше в подгруппе пациенток с отягощенным анамнезом по сравнению с группой сравнения (85% против 0,70%; $p = 0,04$; OR = 2,63) соответственно. Наличие данных аллелей может быть связано с повышенным риском развития миомы матки и являться наследственной предрасположенностью к развитию данного заболевания.

ВЫВОДЫ

В данной работе была выявлена ассоциация полиморфизмов генов rs12637801, rs2861221, rs3020434, rs11742635, rs124577644 с отягощенностью анамнеза пациенток по миоме матки и оценена зависимость риска развития данного заболевания от генотипа по исследованным генетическим локусам. Возможно, наша тактика исследования полиморфизмов генов сможет объяснить механизмы формирования «семейных случаев» миомы матки и поможет создать генетическую диагностическую панель для оценки степени риска развития лейомиомы. Направлением дальнейших исследований является генотипирование родственниц пациенток, имеющих семейный анамнез для подтверждения связи заболевания с выявленными генетическими маркерами.

Литература

- Адамян Л. В., Андреева Е. Н., Артымук Н. В., Белоцерковцева Л. Д., Беженарь В. Ф., Геворкян М. А. и др. Миома матки: диагностика, лечение и реабилитация. 2015; 101.
- Адамян Л. В., Спицын В. А., Андреева Е. Н. Генетические аспекты гинекологических заболеваний. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008; 215.
- Согоян Н. С., Кузнецова М. В., Асатурова А. В., Адамян Л. В., Трофимов Д. Ю. Соматические мутации в экзоне 2 гена MED12 у женщин с одиночной и множественной миомой матки. Акушерство и гинекология. 2018; (12): 63–70.
- Согоян Н. С., Адамян Л. В. Генетические механизмы развития миомы матки. Проблемы репродукции. 2016; 22 (1): 28–34.
- Кудрина Е. А., Бабуринов Д. В. Миома матки: современные аспекты патогенеза и лечения (клиническая лекция). Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. 2016; 3 (1): 4–10.
- Кузнецова М. В., Трофимов Д. Ю., Тихончук Е. Ю., Согоян Н. С., Адамян Л. В., Сухих Г. Т. Молекулярные механизмы патогенеза миомы матки: анализ мутаций гена MED12 в Российской популяции. Акушерство и гинекология. 2016; (10): 85–90.
- Сидорова И. С. Миома матки: возможности лечения и профилактики. Русский медицинский журнал. (Спец. номер: Мать и дитя.) 2002; 10 (7): 336–9.
- Barjon K, Mikhail LN. Uterine Leiomyomata (Fibroids). StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) StatPearls. 2019; 15.
- Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman, JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. American journal of obstetrics and gynecology. 2003; 188 (1): 100–107.
- Gracia M, Carmona F. Uterine myomas: clinical impact and pathophysiological bases. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. 2020; (1): 1–5.
- Тихомиров А. Л. Патогенетическое обоснование ранней диагностики, лечения и профилактики миомы матки [диссертация]. М., 1998.
- Тихомиров А. Л. Миома, патогенетическое обоснование органосохраняющего лечения. М.: Медицина, 2013; 319.
- Brouwer MW, Tebbe-Gholami M, Starink MV. Hereditary leiomyomatosis: a woman with red-brown nodules. Nederlands tijdschrift voor geneeskunde. 2015; (159): A8867–A8867.
- Bulun SE. Uterine fibroids. New England Journal of Medicine. 2013; 369 (14): 1344–55.
- Mäkinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ,

- et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science*. 2011; 334 (6053): 252–5.
16. Mittal P, Shin YH, Yatsenko SA, Castro CA, Surti U, Rajkovic A. MED12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. *The Journal of clinical investigation*. 2015; 125 (8): 3280–4.
 17. Akbari M, Do AA, Yassaee F, Mirfakhraie R. MED12 Exon 1 Mutational Screening in Iranian Patients with Uterine Leiomyoma. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2019; 8 (1): 1–21.
 18. Markowski DN, Bartnitzke S, Löning T, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J. MED12 mutations in uterine fibroids—their relationship to cytogenetic subgroups. *International journal of cancer*. 2012; 131 (7): 1528–36.
 19. Савицкий Г. А., Савицкий А. Г. Миома матки (проблемы патогенеза и патогенетической терапии). Новое в акушерстве и гинекологии. Санкт-Петербург: ЭЛБИ, 2000; 236.
 20. Самойлова Т. Е. Возможности и перспективы медикаментозного лечения миомы матки. *Медицинский совет*. 2013; (3): 106–9.
 21. Пшеничнюк Е. Ю., Кузнецова М. В., Бурменская О. В., Кочеткова Т. О., Непша О. С., Трофимов Д. Ю. и др. Ассоциация между частотами встречаемости одонуклеотидных полиморфизмов в генах ZNF366 и VEZT и риском развития наружного генитального эндометриоза: данные по российской популяции. *Акушерство и гинекология*. 2017; (6): 64–73.
 22. Sakai K, Tanikawa C, Hirasawa A, Chiyoda T, Yamagami W, Kataoka F. Identification of a novel uterine leiomyoma GWAS locus in a Japanese population. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–8.
 23. LaFleur B. Book Review: Statistical methods for rates and proportions. *Clinical Trials*. 2004; 1 (6): 567–8.
 24. Gallagher CS, Makinen N, Harris HR, Uimari O, Cook JP, Shiges N, et al. Genome-wide association analysis identifies 27 novel loci associated with uterine leiomyomata revealing common genetic origins with endometriosis. *Biorxiv*. 2018; 1–26.
 25. Gallagher CS, Mäkinen N, Harris HR, Rahmioglu N, Uimari O, Cook JP, et al. Genome-wide association and epidemiological analyses reveal common genetic origins between uterine leiomyomata and endometriosis. *Nature communications*. 2019; 10 (1): 1–11.
 26. Cha PC, Takahashi A, Hosono N, Low SK, Kamatani N, Kubo M, et al. A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nature genetics*. 2011; 43 (5): 447.
 27. Согоян Н. С., Кузнецова М. В., Лоломадзе Е. А., Михайловская Г. В., Мишина Н. Д., Трофимов Д. Ю., и др. Исследование полиморфизмов rs3020434, rs11742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, rs17677069 у женщин с миомой матки и отягощенным анамнезом. *Акушерство и гинекология*. 2019; (10): 115–28.

References

1. Adamyan LV, Andreeva EN, Artymuk NV, Belocerkovceva LD, Bezhenar VF, Gevorkyan MA, i dr. Mioma матки: diagnostika, lechenie i reabilitacija. 2015; 101. Russian.
2. Adamyan LV, Spicyn VA, Andreeva EN. Geneticheskie aspekty ginekologicheskikh zabolevanij. M., GJeOTAR-Media, 2008; 215. Russian.
3. Sogoyan NS, Kuznetsova MV, Asaturova AV, Adamyan LV, Trofimov DYU. Somaticheskie mutacii v jekzone 2 gena MED12 u zhenshhin s odinochnoj i mnozhestvennoj miomoy матки. *Akusherstvo i ginekologija*. 2018; (12): 63–70. Russian.
4. Sogoyan NS, Adamyan LV. Geneticheskie mehanizmy razvitiya miomy матки. *Problemy reprodukcii*. 2016; 22 (1): 28–34. Russian.
5. Kudrina EA, Baburin DV. Mioma матки: sovremennye aspekty patogeneza i lechenija (klinicheskaja lekcija). *Arhiv akusherstva i ginekologii im. VF Snegireva*. 2016; 3 (1): 4–10. Russian.
6. Kuznetsova MV, Trofimov DYU, Tihonchuk EYu, Sogoyan NS, Adamyan LV, Suhij GT. Molekuljarnye mehanizmy patogeneza miomy матки: analiz mutacij gena MED12 v Rossijskoj populjacii. *Akusherstvo i ginekologija*. 2016; (10): 85–90. Russian.
7. Sidorova IS. Mioma матки: vozmozhnosti lechenija i profilaktiki. *Russkij medicinskij zhurnal. (Spec. nomer: Mat' i ditja)* 2002; 10 (7): 336–9. Russian.
8. Barjon K, Mikhail LN. Uterine Leiomyomata (Fibroids). *StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) StatPearls*. 2019; 15.
9. Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman, JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003; 188 (1): 100–107.
10. Gracia M, Carmona F. Uterine myomas: clinical impact and pathophysiological bases. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2020; (1): 1–5.
11. Tihomirov AL. Patogeneticheskoe obosnovanie rannej diagnostiki, lechenija i profilaktiki miomy матки [dissertacija]. M., 1998. Russian.
12. Tihomirov AL. Mioma, patogeneticheskoe obosnovanie organosohranjajushhego lechenija. M.: Medicina, 2013; 319. Russian.
13. Brouwer MW, Tebbe-Gholami M, Starink MV. Hereditary leiomyomatosis: a woman with red-brown nodules. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2015; (159): A8867–A8867.
14. Bulun SE. Uterine fibroids. *New England Journal of Medicine*. 2013; 369 (14): 1344–55.
15. Mäkinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ, et al. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science*. 2011; 334 (6053): 252–5.
16. Mittal P, Shin YH, Yatsenko SA, Castro CA, Surti U, Rajkovic A. MED12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. *The Journal of clinical investigation*. 2015; 125 (8): 3280–4.
17. Akbari M, Do AA, Yassaee F, Mirfakhraie R. MED12 Exon 1 Mutational Screening in Iranian Patients with Uterine Leiomyoma. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2019; 8 (1): 1–21.
18. Markowski DN, Bartnitzke S, Löning T, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J. MED12 mutations in uterine fibroids — their relationship to cytogenetic subgroups. *International journal of cancer*. 2012; 131 (7): 1528–36.
19. Savickij GA, Savickij AG. Mioma матки (problemy patogeneza i patogeneticheskoy terapii). *Novoe v akusherstve i ginekologii*. Sankt-Peterburg: JeLBI, 2000; 236. Russian.
20. Samojlova TE. Vozmozhnosti i perspektivy medikamentoznogo lechenija miomy матки. *Medicinskij sovet*. 2013; (3): 106–9. Russian.
21. Pshenichnjuk EYu, Kuznecova MV, Burmenskaja OV, Kochetkova TO, Nepsha OS, Trofimov DYU, i dr. Associacija mezhdu chastotami vstrechaemosti odonukleotidnyh polimorfizmov v genah ZNF366 i VEZT i riskom razvitiya naruzhnogo genital'nogo jendometrioza: dannye po rossijskoj populjacii. *Akusherstvo i ginekologija*. 2017; (6): 64–73. Russian.
22. Sakai K, Tanikawa C, Hirasawa A, Chiyoda T, Yamagami W, Kataoka F. Identification of a novel uterine leiomyoma GWAS locus in a Japanese population. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–8.
23. LaFleur B. Book Review: Statistical methods for rates and proportions. *Clinical Trials*. 2004; 1 (6): 567–8.
24. Gallagher CS, Makinen N, Harris HR, Uimari O, Cook JP, Shiges N, et al. Genome-wide association analysis identifies 27 novel loci associated with uterine leiomyomata revealing common genetic origins with endometriosis. *Biorxiv*. 2018; 1–26.
25. Gallagher CS, Mäkinen N, Harris HR, Rahmioglu N, Uimari O, Cook JP, et al. Genome-wide association and epidemiological analyses reveal common genetic origins between uterine leiomyomata and endometriosis. *Nature communications*. 2019; 10 (1): 1–11.
26. Cha PC, Takahashi A, Hosono N, Low SK, Kamatani N, Kubo M, et al. A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nature genetics*. 2011; 43 (5): 447.
27. Sogoyan NS, Kuznetsova MV, Lolomadze EA, Mikhailovskaya GV, Mishina ND, Trofimov DYU, et al. A study of polymorphisms rs3020434, rs 1742635, rs124577644, rs12637801, rs2861221, and rs 17677069 in women with uterine leiomyomas and a family history of the disease. *Obstetrics and Gynecology*. 2019; (10): 115–28.

ЗНАЧЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ В РАЗВИТИИ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Т. А. Самгина ✉, П. М. Назаренко, А. В. Полоников, В. А. Лазаренко

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Генетически детерминированные особенности функционирования системы биотрансформации ксенобиотиков играют важную роль в развитии острого панкреатита (ОП) и его осложнений. Целью работы было определить вклад однонуклеотидных полиморфизмов генов *CYP1A1* -462 T>C rs1048943, *CYP2E1* -1293 G>C rs3813867 и *ABCB1* -3435 G>A rs1045642 в развитие ОП и его осложнений. Образцы ДНК получали от 547 неродственных больных ОП (154 женщины и 393 мужчины; средний возраст составил $48,9 \pm 13,1$), находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях города Курска и 573 неродственных индивидов без заболеваний ЖКТ (161 женщина и 412 мужчин; средний возраст — $47,8 \pm 12,1$). Генотипирование полиморфизма изучаемых генов выполняли методом ПЦР путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов. У 97 пациентов развился инфицированный панкреонекроз (ИП), у 101 — псевдокиста (ПК), у 111 — гнойно-некротический перипанкреатит (ГНП). Установлено, что у носителей аллеля А гена *ABCB1* G>A (rs1045642) чаще развивался ОП ($p = 0,0008$), у носителей генотипа G/G редко развивался как ОП ($p = 5 \cdot 10^{-4}$), так и его осложнения: ИП ($p = 0,03^{\text{ns}}$), ГНП ($p = 0,036^{\text{ns}}$), ПК ($p = 0,04^{\text{ns}}$). Отсутствие длительного злоупотребления алкогольными напитками у носителей генотипов G/C–C/C *CYP2E1* G>C (rs3813867) редко приводило к развитию ОП ($p = 0,03$), у носителей генотипа G/C *CYP2E1* (rs3813867) ($p = 0,050^{\text{ns}}$) чаще возникала псевдокиста. У носителей генотипа C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) ОП чаще осложнялся ИП ($p = 0,009^{\text{ns}}$), ГНП ($p = 0,003^{\text{ns}}$), ПК ($p = 0,003^{\text{ns}}$). В целом, для носителей генотипов G/G *ABCB1* G>A (rs1045642) было характерно более легкое течение ОП, тяжелое течение было характерно для носителей C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943).

Ключевые слова: острый панкреатит, гены ферментов биотрансформации ксенобиотиков, генетический полиморфизм, rs1045642, rs1048943, rs3813867

Вклад авторов: Т. А. Самгина — написание статьи, разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, реализация клинических и молекулярно-генетических методов исследования, статистическая обработка данных; П. М. Назаренко — руководство хирургической частью исследования, лечение и подбор больных в ОБУЗ ГКБ № 4; А. В. Полоников — руководство генетической частью исследования; В. А. Лазаренко — руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного университета (протокол № 3 от 11 марта 2013 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Александровна Самгина
ул. К. Маркса, д. 3, 305000; г. Курск; tass@list.ru

Статья получена: 05.01.2020 **Статья принята к печати:** 08.02.2020 **Опубликована онлайн:** 15.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.008

THE ROLE OF SOME XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION GENES SNP IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE PANCREATITIS

Samgina TA ✉, Nazarenko PM, Polonikov AV, Lazarenko VA

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Genetically determined features of the xenobiotic biotransformation system play an important role in the development of acute pancreatitis (AP) and its complications. The aim of this study was to assess the contribution of 3 SNPs (*CYP1A1* -462 T>C rs1048943, *CYP2E1* -1293 G>C rs3813867 and *ABCB1* -3435 G>A rs1045642) to the development of AP and its complications. DNA samples were collected from 547 unrelated patients with AP (154 women and 393 men; mean age 48.9 ± 13.1 years) undergoing therapy at surgery departments of Kursk and 573 unrelated individuals without gastrointestinal diseases (161 women and 412 men; mean age 47.8 ± 12.1 years). The polymorphisms were genotyped by PCR using TaqMan probes for allele discrimination. Infected pancreatic necrosis (IPN) was observed in 97 patients; 101 patients developed a pseudocyst (PC); 111 patients had a peripancreatic necrosis (PN). AP was the most common in the carriers of the A allele in *ABCB1* G>A (rs1045642) ($p = 0.0008$). The carriers of the G/G genotype rarely developed both AP ($p = 5 \cdot 10^{-4}$) and its complications: IPN ($p = 0.03^{\text{ns}}$), PN ($p = 0.036^{\text{ns}}$), PC ($p = 0.04^{\text{ns}}$). The carriers of the G/C–C/C *CYP2E1* G>C (rs3813867) genotypes who had no long-term history of alcohol abuse rarely developed AP ($p = 0.03$). The carriers of the G/C *CYP2E1* (rs3813867) genotype tended to develop pseudocysts ($p = 0.050^{\text{ns}}$). AP was more frequently complicated by IPN ($p = 0.009^{\text{ns}}$), PN ($p = 0.003^{\text{ns}}$) and PC ($p = 0.003^{\text{ns}}$) in the carriers of the C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) genotype. A milder course of AP was typical for the carriers of the G/G *ABCB1* G>A (rs1045642) genotype; a more severe course was characteristic of the carriers of the C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) genotype.

Keywords: acute pancreatitis, xenobiotic biotransformation enzyme genes, genetic polymorphism, rs1045642, rs1048943, rs3813867

Author contribution: Samgina TA conceived and designed the study, conducted clinical and molecular-genetic tests, analyzed and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript; Nazarenko PM supervised surgical treatment and postoperative care at Kursk City Clinical Hospital № 4 and recruited patients for the study; Polonikov AV supervised genetic testing; Lazarenko VA supervised the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kursk State Medical University (Protocol № 3 dated March 11, 2013). The patients gave informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Samgina
K. Marksa, 3, 305000; Kursk, tass@list.ru

Received: 05.01.2020 **Accepted:** 08.02.2020 **Published online:** 15.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.008

В последние годы проводят активные исследования действия химических токсинов из окружающей среды и нарушения регуляции процессов про- и антиоксидантной защиты в развитии острого панкреатита (ОП). Так, была

выявлена ассоциация острого небилиарного панкреатита с курением [1], а у курящих и злоупотребляющих алкогольными напитками пациентов с ОП отмечен повышенный риск развития панкреонекроза [2]. Несмотря

на многочисленные исследования, генетические механизмы реализации предрасположенности к ОП и его осложнениям пока изучены недостаточно, но очевидно, что генетически детерминированные особенности функционирования системы биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной системы играют в этом важную роль.

Трансмембранный белок *ABCB1* — член надсемейства АТФ-зависимых транспортеров лекарственных средств и ксенобиотиков с широкой субстратной специфичностью, отвечает за снижение накопления наркотиков в клетках с множественной лекарственной устойчивостью, часто опосредует развитие резистентности к противоопухолевым препаратам. Гены *ABC* делят на семь различных подсемейств. *ABCB1* является членом подсемейства *MDR/TAP*, локализован на 7q21.12. Ген экспрессируется в большей степени в яйцках, мышцах, желудке и поджелудочной железе. Была изучена роль гена *ABCB1* в развитии колоректального рака [3, 4], однако статистически значимых ассоциаций выявлено не было. Роль гена при ОП ранее не изучали.

На сегодняшний день наиболее изучена система оксидазы цитохрома P450, включающая *CYP1*, *CYP2* и *CYP3*, которые в целом отвечают за расщепление чужеродных соединений у млекопитающих.

Обнаружено увеличение активности ферментов фазы активации у больных с нарушенной функцией поджелудочной железы за счет полиморфизма генов цитохрома *P450*, *CYP1A1*, *CYP2E1* [5]. По мнению авторов, основную причастность к развитию панкреатита имеет *CYP1A1*, который запускает каскад протеинкиназы с увеличением репликации ДНК и тканевой пролиферации, генерирует радикалы кислорода, образует реактивные промежуточные продукты метаболизма ксенобиотиков и способен активировать многие канцерогены.

Известно, что *CYP1A1* (ароматическая соединительно-индуцируемая арилгидрокарбонгидроксилаза) в первой фазе биотрансформации ксенобиотиков превращает полициклические ароматические углеводороды в высокоактивные мутагенные метаболиты. Ген, кодирующий ключевой фермент, локализован на 15q24.1. Известно 19 вариантов полиморфизма гена, играющих определенную роль в развитии онкологических и профессиональных заболеваний [6].

CYP2E1 (цитохром P450 2E1) кодирует белки цитохрома P450 (монооксигеназы), которые катализируют многие реакции, связанные с метаболизмом лекарственных средств и синтезом холестерина, стероидов и других липидов. Этот белок локализован в эндоплазматическом ретикулуме, его индуцируют действие этанола, диабетическое состояние и голодание. Фермент участвует в метаболизме этанола, ацетона, бензола, этиленгликоля, а также премутагенов, обнаруженных в сигаретном дыме [7]. Ген локализован на 10q26.3, экспрессируется в большей степени в жировой ткани, слизистой оболочке пищевода, периферической крови.

При сравнении частоты генотипов и аллелей *ADH2*, *ADH3*, *ALDH2*, *CYP2E1*, *IL1*, *IL6*, *IL8* и *TNF* у пациентов с хроническим панкреатитом, алкогольным циррозом печени и у здоровых индивидов было обнаружено, что частота *CYP2E1* и *ALDH2* была значительно ниже, чем в контроле [8]. В то же время не обнаружена связь между полиморфизмом *CYP2E1* и алкогольным панкреатитом в азиатской популяции [9, 10]. Носители генотипа *m2/m2 CYP1A1* могут быть более склонны к развитию

алкогольного цирроза и алкогольного панкреатита [11]. Установлена связь полиморфизма *P450 CYP1A1 Ile105Val* с повышенным риском развития хронического панкреатита [12]. В результате транзиции А→G, приводящей к замене изолейцина на валин в кодоне 462 молекулы цитохрома (*Ile462Val*), активность продуцируемого фермента увеличивается в два раза по сравнению с исходным белком, что может привести к увеличению концентрации недоокисленных промежуточных токсичных метаболитов и накоплению свободных радикалов [13–15].

Таким образом, полиморфные варианты генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков могут иметь отношение к развитию ОП. Целью работы было определить связь ОНП генов *CYP1A1* -462 T>C rs1048943, *CYP2E1* -1293 G>C rs3813867 и *ABCB1* -3435 G>A rs1045642 с развитием ОП и его осложнений.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК для исследования получали от 547 неродственных больных ОП (154 женщины и 393 мужчины), находившихся на стационарном лечении в хирургических отделениях города Курска в период 2012–2015 гг., и 573 неродственных индивида без заболеваний ЖКТ (161 женщина и 412 мужчин). Средний возраст больных составил $48,9 \pm 13,1$, здоровых лиц — $47,8 \pm 12,1$. Критерии включения пациентов в основную группу: 1) установленный диагноз острого панкреатита; 2) возраст 18–80 лет; 3) отсутствие патологии органов билиарной системы: желчно-каменной болезни, пороков развития ПЖ (*pancreas divisum*), травм поджелудочной железы, в том числе операционной или после эндоскопических манипуляций; 4) отсутствие в анамнезе приема панкреатотоксичных лекарственных препаратов (гипотиазида, НПВС, стероидных противовоспалительных средств), аутоиммунных, инфекционных, аллергических заболеваний (лаки, краски), дисгормональных процессов при беременности и менопаузе, заболеваний близлежащих органов ЖКТ; 5) отсутствие наследственной отягощенности по ОП. Критерии исключения: несоответствие критериям включения.

Диагноз ОП устанавливали с использованием современной классификации ОП, разработанной Российским обществом хирургов в 2014 г. с учетом классификации Атланта-92 и ее модификаций, предложенных в г. Кочин в 2011 г. Международной ассоциацией панкреатологов и Международной рабочей группой по классификации острого панкреатита [16, 17] с использованием общеклинических, лабораторных (общий и биохимический анализ крови) и инструментальных методов исследования (УЗИ и МРТ поджелудочной железы, эзофагогастродуоденоскопии).

При анкетировании участников исследования у всех пациентов учитывали наличие вредных привычек — курения и злоупотребления алкоголем как основных факторов риска развития ОП [18, 19].

В зависимости от количества потребляемого алкоголя в неделю участников исследования подразделили на две группы: 1) лица, употреблявшие алкоголь менее 200 г в перерасчете на этанол в неделю; 2) лица, употреблявшие алкоголь более 200 г в перерасчете на этанол в неделю. Данное значение выбрали в качестве порогового, так как оно представляет собой медиану (в граммах чистого этанола) среди максимальных уровней «безопасного потребления алкоголя» (safe alcohol intake) в неделю,

одобренного во многих странах в соответствии с национальными рекомендациями по уровню потребления спиртных напитков [20]. По частоте употребления алкоголя участники исследования были разделены на две группы: 1) лица, употребляющие алкоголь 1–2 дня в месяц или реже; 2) лица, употребляющие алкоголь 1 день или более в неделю. Согласно стажу употребления алкоголя все пациенты были разделены на две группы: 1) лица с продолжительностью употребления алкоголя до 10 лет; 2) лица, употребляющие алкоголь в течение 10 лет или более.

У пациентов проводили забор цельной венозной крови объемом 5–10 мл в пластиковые пробирки с 0,5 М ЭДТА. Затем кровь замораживали и хранили в морозильных камерах при температуре -20°C до выделения геномной ДНК. Выделение ДНК проводили стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции и преципитации этанолом. Сначала проводили лизис лейкоцитов. Для этого лейкоцитарную массу, осажденную дважды центрифугированием с Na-фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,8$), подвергали лизису в растворе, содержащем ТЕ-буфер, протеиназу К и 0,4% додецилсульфат натрия (SDS) в течение 12 ч при температуре 42°C . Затем из полученного клеточного лизата выделяли геномную ДНК: сначала с помощью фенола и 10 мМ Трис-НСI ($\text{pH} = 8,0$), затем фенола и хлороформа (в соотношении 1 : 1) и на заключительном этапе — хлороформа. Геномную ДНК преципитировали ледяным 96%-м этанолом, высушивали на воздухе, растворяли в ТЕ-буфере, измеряли концентрацию ДНК, замораживали при температуре -20°C до выполнения генотипирования ДНК-полиморфизмов.

Генотипирование *CYP1A1* -462 T>C rs1048943, *CYP2E1* -1293 G>C rs3813867 и *ABCB1* -3435 G>A rs1045642 проводили методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США) с использованием коммерческих наборов реактивов TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems; США). Повторное генотипирование 10% исследованных образцов, отобранных по случайному принципу и при отсутствии информации о статусе болезни, показало 100%-ю воспроизводимость оригинальных результатов. Для сравнения категориальных переменных между группами использовали критерий χ^2 Пирсона, для сравнения

количественных переменных — критерии Стьюдента (для нормально распределенных признаков) и Манна-Уитни (для признаков, отличных от нормальных). Для анализа соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга (PXB) и сравнения частот аллелей и генотипов между группами использовали критерий χ^2 Пирсона. Ассоциации аллелей и генотипов с риском развития панкреатита оценивали по величине отношения шансов (OR). Статистический анализ осуществляли с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ассоциации изучаемых полиморфизмов генов *CYP1A1* T>C и *CYP2E1* G>C с риском развития ОП не были обнаружены (табл. 1).

Носители аллеля А гена *ABCB1* G>A (rs1045642) обладали повышенным риском развития ОП, а носители генотипа G/G, напротив, пониженным.

При отсутствии длительного злоупотребления алкогольными напитками носители генотипов G/C–C/C *CYP2E1* G>C (rs3813867) редко страдали ОП (табл. 2).

Носители генотипов C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) чаще страдали инфицированным панкреонекрозом, в отличие от носителей генотипов G/G *ABCB1* G>A (rs1045642) (табл. 3).

У носителей генотипов C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) и G/C *CYP2E1* (rs3813867) чаще развивалась ПК, а G/G *ABCB1* G>A rs1045642 — реже (табл. 4).

Наиболее часто ОП осложняло развитие ГНП у носителей генотипа C/C *CYP1A1* T>C (rs1048943) и редко у носителей генотипа G/G *ABCB1* G>A (rs1045642) (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процесс биотрансформации, включающий ферментативное превращение чужеродных включений, или ксенобиотиков, и состоящий из трех фаз: активации, собственно детоксикации и выведения, вовлечено множество ферментов [21, 22]. Роль генов ФБК (*CYP2E1* и *CYP1A1*) в развитии алкогольного панкреатита и цирроза печени изучали у употребляющих алкогольные напитки бразильцев; ассоциации с панкреатитом установлено не было [11].

Известно, что цитохромы P450 осуществляют биоактивацию полициклических ароматических

Таблица 1. Анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной системы с риском развития ОП (кодоминантная модель)

Ген (SNP ID)	Генотип, аллель	n (%)		p	OR (95%CI)
		Здоровые (n = 573)	Больные (n = 547)		
<i>CYP1A1</i> -462 T>C (rs1048943)	T/T	507 (91,0)	489 (90,2)	0,07	1,00
	T/C	49 (8,8)	46 (8,5)		0,97 (0,64–1,48)
	C/C	1 (0,2)	7 (1,3)		7,26 (0,89–59,21)
	C	0,05	0,06	0,3	1,22 (0,83–1,79)
<i>CYP2E1</i> -1293 G>C (rs3813867)	G/G	532 (95,0)	513 (94,0)	0,46	1,00
	G/C	22 (3,9)	29 (5,3)		1,37 (0,78–2,41)
	C/C	6 (1,1)	4 (0,7)		0,69 (0,19–2,46)
	C	0,03	0,034	0,64	1,12 (0,70–1,80)
<i>ABCB1</i> -3435 G>A (rs1045642)	A/A	158 (28,3)	183 (33,5)	$5 \cdot 10^{-4}$	1,00
	G/A	269 (48,2)	284 (52,0)		0,91 (0,70–1,19)
	G/G	131 (23,5)	79 (14,5)		0,52 (0,37–0,74)
	A	0,52	0,6	0,0008	1,33 (1,13–1,58)

углеводородов. Установлено, что *CYP1A1* отсутствует в нормальной ткани, а экспрессируется лишь под действием ксенобиотиков. Обнаруженная нами ассоциация генотипа *C/C CYP1A1* T>C (rs1048943) с повышенным риском развития ОП, возможно, свидетельствует об изменении активности фермента и увеличении концентрации недоокисленных токсичных метаболитов, агрессивно влияющих на ткань поджелудочной железы.

Роль полиморфизмов гена *CYP2E1* в развитии острого панкреатита до настоящего времени не изучали, но опубликованы данные о том, что минорный аллель *CYP2E1* может обладать протективным эффектом при отравлении метанолом [23]. В нашем исследовании носители генотипов *G/C CYP2E1* (rs3813867) чаще страдали ОП, однако при отсутствии воздействия фактора риска злоупотребления алкогольными напитками более 10 лет носители генотипов *G/C–C/C CYP2E1* G>C (rs3813867) были устойчивее к воздействию алкоголя и редко страдали ОП.

Ген *ABCB1* кодирует Р-гликопротеин, который является эффлюксным транспортером и участвует в выведении ксенобиотиков, препятствуя их накоплению в органах

и тканях [24]. Изучение вклада полиморфного варианта rs1045642 гена *ABCB1* в развитие артериальной гипертензии и оценка результатов лечения амлодипином в различных популяциях [25–27] показали высокий антигипертензивный эффект в группе ТТ, который авторы объяснили снижением экспрессии *ABCB1*. Те же авторы обнаружили связь генотипа ТТ с более высоким риском геморрагических осложнений при приеме дабигатрана после артропластики коленного сустава. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение экспрессии *ABCB1* негативно отражается на способности к детоксикации алкоголя и у носителей аллеля А повышает риск развития ОП.

В целом, более легкое течение ОП было характерно для носителей генотипов *G/G ABCB1* G>A (rs1045642), тяжелое — для носителей *C/C CYP1A1* T>C (rs1048943).

ВЫВОДЫ

Проведенное нами изучение вклада ОНП генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков в развитие ОП у жителей Курской области позволило не только выявить

Таблица 2. Анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной системы с риском развития ОП (кодминантная модель)

Генотипы	Отсутствие фактора риска (f-)			Наличие фактора риска (f+) ³		
	Здоровые	Больные	OR (95%CI) _{inter} P 1	Здоровые	Больные	OR (95%CI) _{inter} P 1
CYP2E1 (rs3813867)						
G/G	119 (90,8)	173 (96,6)	0,34 (0,13–0,94) 0,03	98 (96,1)	116 (95,1)	1,27 (0,35–4,62) 0,72 ³
G/C–C/C	12 (9,2)	6 (3,4)		4 (3,9)	6 (4,9)	

Примечание: _{inter}P — уровень значимости, достигнутый при анализе взаимодействия SNP и фактора риска; наличие фактора риска (f+)³ — длительность употребления алкоголя более 10 лет.

Таблица 3. Анализ ассоциации генотипов полиморфных вариантов изучаемых генов с риском развития инфицированного панкреонекроза (наиболее значимые модели)

Ген (SNP ID)	Генотип, аллель	n (%)		p ¹	cor OR (95%CI) ²
		Контрольная группа (n = 573)	Больные с инфицированным панкреонекрозом (n = 97)		
<i>CYP1A1</i> -462 T>C rs1048943	T/T–T/C	556 (99,8%)	93 (96,9%)	0,0095^R	1,00
	C/C	1 (0,2%)	3 (3,1%)		15,65 (1,61–152,54)
<i>ABCB1</i> -3435 G>A rs1045642	A/A–G/A	427 (76,5%)	82 (85,4%)	0,036^R	1,00
	G/G	131 (23,5%)	14 (14,6%)		0,54 (0,30–0,99)

Таблица 4. Анализ ассоциации генотипов полиморфных вариантов изучаемых генов с риском развития псевдокисты при ОП (наиболее значимая модель)

Ген (SNP ID)	Генотип, аллель	n (%)		p ¹	cor OR (95%CI)
		Контрольная группа (n = 573)	Больные с наличием ПК (n = 101)		
<i>CYP1A1</i> -462 T>C rs1048943	T/T–T/C	556 (99,8%)	97 (96%)	0,003^D	1,00
	C/C	1 (0,2%)	4 (4%)		18,36 (2,03–166,52)
<i>CYP2E1</i> -1293 G>C rs3813867	G/G–C/C	538 (96,1%)	92 (91,1%)	0,05^{OD}	1,00
	G/C	22 (3,9%)	9 (8,9%)		2,43 (1,07–5,56)
<i>ABCB1</i> -3435 G>A rs1045642	A/A–G/A	427 (76,5%)	86 (85,2%)	0,04^R	1,00
	G/G	131 (23,5%)	15 (14,8%)		0,55 (0,30–0,99)

Таблица 5. Анализ ассоциации генотипов полиморфных вариантов изучаемых генов с риском развития ГНП (наиболее значимые модели)

Ген (SNP ID)	Генотип, аллель	n (%)		p ¹	cor OR (95%CI)
		Контрольная группа (n = 573)	Больные с ГНП (n = 111)		
<i>CYP1A1</i> -462 T>C rs1048943	T/T–T/C	556 (99,8%)	106 (96,4%)	0,003^R	1,00
	C/C	1 (0,2%)	4 (3,6%)		18,00 (1,99–163,22)
<i>ABCB1</i> -3435 G>A (rs1045642)	A/A–G/A	427 (76,5%)	94 (85,5%)	0,03^R	1,00
	G/G	131 (23,5%)	16 (14,6%)		0,56 (0,31–0,98)

ассоциации генотипов с развитием ОП и его осложнений, но и установить триггерное влияние факторов риска на развитие заболевания у носителей определенных генотипов.

Основываясь на анализе генетических факторов, таких как полиморфные варианты генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, можно осуществлять прогнозирование вероятности развития ОП и особенностей

его клинического течения, что открывает возможности ранней диагностики болезни и проведения необходимых профилактических мероприятий по ее предупреждению. Исследование генетических полиморфизмов может оказаться полезным для прогнозирования исходов заболевания и разработки персонализированных подходов к лечению и профилактике.

Литература

- Setiawan VW, Pandol SJ, Porcel J, Wilkens LR, Le Marchand L, Pike MC, et al. Prospective Study of Alcohol Drinking, Smoking, and Pancreatitis: The Multiethnic Cohort. *Pancreas*. 2016; 45 (6): 819–25.
- Ali UA, Issa Y, Hagenaars JC, Bakker OJ, van Goor H, Nieuwenhuijs VB, Schaapherder AF. Risk of recurrent pancreatitis and progression to chronic pancreatitis after a first episode of acute pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2016; 14 (5): 738–46.
- Mrozikiewicz-Rakowska B, Malinowski M, Nehring P, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Żurawińska-Grzelka E, et al. The MDR1/ABCB1 gene rs 1045642 polymorphism in colorectal cancer. *Archives of Medical Science*. 2017; 13 (1).
- Zhao L, Li K, Li W, Yang Z. Association between the C3435T polymorphism of ABCB1/MDR1 gene (rs1045642) and colorectal cancer susceptibility. *Tumor Biology*. 2013; 34 (3): 1949–57.
- Винник Ю. С., Черданцев Д. В., Маркова Е. В., Коноваленко А. Н., Первова О. В., Миллер М. С. Генетические аспекты панкреатита. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2004; 43 (2).
- Hosagrahara VP, Rettie AE, Hassett C, Omiecinski CJ. Functional analysis of human microsomal epoxide hydrolase genetic variants. *Chem Biol Interact*. 2004; (150): 149–59.
- Wang X, Cheung CM, Lee WY, Or PM, Yeung JH. Major tanshinones of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) exhibit different modes of inhibition on human CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 activities in vitro. *Phytomedicine*. 2010; 17 (11): 868–75.
- Kim MS, Lee DH, Kang HS, Park HS, Jung S, Lee JW, et al. Genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and cytokines in patients with alcohol induced pancreatitis and alcoholic liver cirrhosis. *Korean J Gastroenterol*. 2004; (43): 355–63.
- Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, et al. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; (17): 177–82.
- Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN. Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol*. 2001; (23): 91–7.
- Burim RV, Canalle R, Martinelli Ade L, Takahashi C. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*. 2004; (19): 291–8.
- Ната́льский А. А., Богомолов А. Ю., Андрианова К. В. Полиморфизм генов у больных хроническим панкреатитом. В сборнике: Теория и практика современной хирургии: Материалы X Всероссийской конференции общих хирургов; Рязань, 2018; с. 219–220.
- Smithies AM, Sargen K, Demaine AG, Kingsnorth AN. Investigations of the interleukin 1 gene cluster and its association with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000; 20 (3): 234–40.
- Teich N, Bauer N, Mössner J, Keim V. Mutational screening of patients with nonalcoholic chronic pancreatitis: identification of further trypsinogen variants. *The American journal of gastroenterology*. 2002; 97 (2): 341–6.
- Ulrich AB, Standop J, Schmied BM, Schneider MB, Lawson TA, Pour PM. Species differences in the distribution of drug-metabolizing enzymes in the pancreas. *Toxicologic pathology*. 2002; 30 (2): 247–53.
- Dellinger EP, Forsmark CE, Laver P, Levy P, Maravi-Poma E, Petrov MS, et al. Determinant-based classification of acute pancreatitis severity: an international multidisciplinary consultation. *Ann Surg*. 2012; 256 (6): 875–80.
- Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013; 62 (1): 102–11.
- Кляритская И. Л., Работягова Ю. С. Новые факторы риска развития хронического панкреатита. *Крымский терапевтический журнал*. 2012; (2): 63–69.
- Лазаренко В. А., Антонов А. Е. Современное состояние проблемы вредных привычек как фактора риска развития панкреатита. *Социальные аспекты здоровья населения*. 2017; 55 (3).
- Furtwängler NA, de Visser RO. Lack of international consensus in low-risk drinking guidelines. *Drug and alcohol review*. 2013; 32 (1): 11–18.
- Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э., Асеев М. В. Геном человека и гены «предрасположенности»: введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000; 271 с.
- Спицын В. А., Макаров С. В., Пай Г. В., Бычкова Л. С. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков. *Вестник ВОГиС*. 2006; 10 (1): 97–105.
- Hubacek JA, Zakharov S. Response to 'CYP2E1 Polymorphism and Better Outcome After Methanol Poisoning'. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. 2015; 117 (1): 3–4.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2004; 75 (1): 13–33.
- Guo HQ, Zhang GN, Wang YJ, Zhang YK, Sodani K, Talele T, Chen ZS. β -Elemene, a compound derived from *Rhizoma zedoariae*, reverses multidrug resistance mediated by the ABCB1 transporter. *Oncology reports*. 2014; 31 (2): 858–66.
- Sychev DA, Levanov AN, Shelekhova TV, Bochkov PO, Denisenko NP, Ryzhikova KA, Kozlov AV. The impact of ABCB1 (rs1045642 and rs4148738) and CES1 (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2018; (11): 127.
- Sychev D, Shikh N, Morozova T, Grishina E, Ryzhikova K, Malova E. Effects of ABCB1 rs1045642 polymorphisms on the efficacy and safety of amlodipine therapy in Caucasian patients with stage I–II hypertension. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2018; (11): 157.

References

- Setiawan VW, Pandol SJ, Porcel J, Wilkens LR, Le Marchand L, Pike MC, et al. Prospective Study of Alcohol Drinking, Smoking, and Pancreatitis: The Multiethnic Cohort. *Pancreas*. 2016; 45 (6): 819–25.
- Ali UA, Issa Y, Hagenaars JC, Bakker OJ, van Goor H, Nieuwenhuijs VB, Schaapherder AF. Risk of recurrent pancreatitis and progression to chronic pancreatitis after a first episode of acute pancreatitis. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2016; 14 (5): 738–46.
- Mrozikiewicz-Rakowska B, Malinowski M, Nehring P, Bartkowiak-Wieczorek J, Bogacz A, Żurawińska-Grzelka E, et al. The MDR1/ABCB1 gene rs 1045642 polymorphism in colorectal cancer. *Archives of Medical Science*. 2017; 13 (1).
- Zhao L, Li K, Li W, Yang Z. Association between the C3435T polymorphism of ABCB1/MDR1 gene (rs1045642) and colorectal cancer susceptibility. *Tumor Biology*. 2013; 34 (3): 1949–57.
- Vinnik YuS, Cherdancev DV, Markova EV, Konovalenko AN, Pervova OV, Miller MS. Geneticheskie aspekty pankreatita. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk)*. 2004; 43 (2). Russian.
- Hosagrahara VP, Rettie AE, Hassett C, Omiecinski CJ. Functional analysis of human microsomal epoxide hydrolase genetic variants. *Chem Biol Interact*. 2004; (150): 149–59.
- Wang X, Cheung CM, Lee WY, Or PM, Yeung JH. Major tanshinones of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) exhibit different modes of inhibition on human CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 activities in vitro. *Phytomedicine*. 2010; 17 (11): 868–75.
- Kim MS, Lee DH, Kang HS, Park HS, Jung S, Lee JW, et al. Genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and cytokines in patients with alcohol induced pancreatitis and alcoholic liver cirrhosis. *Korean J Gastroenterol*. 2004; (43): 355–63.
- Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, et al. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002; (17): 177–82.
- Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN. Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol*. 2001; (23): 91–7.
- Burim RV, Canalle R, Martinelli Ade L, Takahashi C. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*. 2004; (19): 291–8.
- Natalskij AA, Bogomolov AY, Andrianova KV. Polimorfizm genov u bol'nyh hronicheskim pankreatitom. V sbornike: Teorija i praktika sovremennoj hirurgii: Materialy X Vserossijskoj konferencii obshhij hirurgov; Rjazan', 2018; s. 219–220. Russian.
- Smithies AM, Sargen K, Demaine AG, Kingsnorth AN. Investigations of the interleukin 1 gene cluster and its association with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000; 20 (3): 234–40.
- Teich N, Bauer N, Mössner J, Keim V. Mutational screening of patients with nonalcoholic chronic pancreatitis: identification of further trypsinogen variants. *The American journal of gastroenterology*. 2002; 97 (2): 341–6.
- Ulrich AB, Standop J, Schmied BM, Schneider MB, Lawson TA, Pour PM. Species differences in the distribution of drug-metabolizing enzymes in the pancreas. *Toxicologic pathology*. 2002; 30 (2): 247–53.
- Dellinger EP, Forsmark CE, Lacer P, Levy P, Maravi-Poma E, Petrov MS, et al. Determinant-based classification of acute pancreatitis severity: an international multidisciplinary consultation. *Ann Surg*. 2012; 256 (6): 875–80.
- Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013; 62 (1): 102–11.
- Klyaritskaya IL, Rabotyagova YuS. Novye faktory riska razvitiya hronicheskogo pankreatita. *Krymskij terapevicheskij zhurnal*. 2012; (2): 63–69. Russian.
- Lazarenko VA, Antonov AE. Sovremennoe sostojanie problemy vrednyh privyчек kak faktora riska razvitiya pankreatita. *Social'nye aspekty zdorov'ja naselenija*. 2017; 55 (3). Russian.
- Furtwaengler NA, de Visser RO. Lack of international consensus in low-risk drinking guidelines. *Drug and alcohol review*. 2013; 32 (1): 11–18.
- Baranov VS, Baranova EV, Ivashchenko TYe, Aseev MV. Genom cheloveka i geny «predraspolozhennosti»: vvedenie v prediktivnuju medicinu. SPb.: Intermedika, 2000; 271 s. Russian.
- Spicyn VA, Makarov SV, Paj GV, Bychkovskaja LS. Polimorfizm v genah cheloveka, asociirujushhihsja s biotransformaciej ksenobiotikov. *Vestnik VOGiS*. 2006; 10 (1): 97–105. Russian.
- Hubacek JA, Zakharov S. Response to 'CYP2E1 Polymorphism and Better Outcome After Methanol Poisoning'. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. 2015; 117 (1): 3–4.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2004; 75 (1): 13–33.
- Guo HQ, Zhang GN, Wang YJ, Zhang YK, Sodani K, Talele T, Chen ZS. β -Elemene, a compound derived from *Rhizoma zedoariae*, reverses multidrug resistance mediated by the ABCB1 transporter. *Oncology reports*. 2014; 31 (2): 858–66.
- Sychev DA, Levanov AN, Shelekhova TV, Bochkov PO, Denisenko NP, Ryzhikova KA, Kozlov AV. The impact of ABCB1 (rs1045642 and rs4148738) and CES1 (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2018; (11): 127.
- Sychev D, Shikh N, Morozova T, Grishina E, Ryzhikova K, Malova E. Effects of ABCB1 rs1045642 polymorphisms on the efficacy and safety of amlodipine therapy in Caucasian patients with stage I–II hypertension. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. 2018; (11): 157.

АКТИВАЦИЯ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЗАДАЧИ СТЕРНБЕРГА НА ВЕРБАЛЬНУЮ РАБОЧУЮ ПАМЯТЬ

И. С. Бакулин¹✉, А. Х. Забиров¹, П. Н. Копнин¹, Д. О. Синицын¹, А. Г. Пойдашева¹, М. В. Федоров², Е. В. Гнедовская^{1,2}, Н. А. Супонева¹, М. А. Пирадов¹

¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Несмотря на интенсивное изучение, данные о функциональном значении отдельных областей головного мозга для процессов рабочей памяти (РП) остаются противоречивыми. Целью данного исследования было определить активацию участков коры на разных этапах выполнения задачи на РП (запечатление, удержание и извлечение информации). На 19 здоровых добровольцах была использована функциональная магнитная резонансная томография (фМРТ) с модифицированной задачей Стернберга. Суть задачи — в запоминании и удержании в памяти последовательности из семи букв с последующим сравнением с ней одной буквы. Проанализирована активация в трех периодах задачи по сравнению с периодом покоя, а также динамика изменения интенсивности BOLD-сигнала в зависимости от времени в трех областях: левой дорсолатеральной префронтальной коре (ДЛПФК), левой задней теменной коре и левой затылочной коре. По результатам анализа, на протяжении всех периодов задачи наблюдали статистически значимую активацию участков ПФК и задней теменной коры ($p < 0,05$), но с изменением их локализации и латерализации. При этом паттерн активации в периоде удержания соответствовал компонентам лобно-теменной сети контроля. По результатам анализа изменения интенсивности BOLD-сигнала наиболее выраженную активацию ДЛПФК и теменной коры наблюдали в конце периода запечатления, периоде удержания и начале периода извлечения, что подтверждает роль данных областей в процессах РП. Пик активации затылочной коры соответствовал периоду запечатления. Данное исследование подтверждает функциональное значение ДЛПФК и задней теменной коры для процессов РП на всех этапах выполнения задачи Стернберга.

Ключевые слова: рабочая память, функциональная магнитно-резонансная томография, задача Стернберга, задача с отсроченным воспроизведением, префронтальная кора, лобно-теменная сеть контроля

Вклад авторов: И. С. Бакулин, М. В. Федоров, Е. В. Гнедовская, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов — планирование и дизайн исследования; И. С. Бакулин, А. Х. Забиров — анализ литературы; И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева — сбор данных; А. Х. Забиров, П. Н. Копнин, Д. О. Синицын — анализ данных; И. С. Бакулин, А. Х. Забиров, Д. О. Синицын, М. В. Федоров, Е. В. Гнедовская, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов — интерпретация данных; И. С. Бакулин, А. Х. Забиров — подготовка черновика рукописи статьи; П. Н. Копнин, Д. О. Синицын, А. Г. Пойдашева, М. В. Федоров, Е. В. Гнедовская, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов — внесение правок в черновик рукописи статьи; все авторы — подготовка финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 9-3/17 от 30 августа 2017 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Илья Сергеевич Бакулин
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; bakulin@neurology.ru

Статья получена: 22.01.2020 Статья принята к печати: 22.02.2020 Опубликована онлайн: 29.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.013

CEREBRAL CORTEX ACTIVATION DURING THE STERNBERG VERBAL WORKING MEMORY TASK

Bakulin IS¹✉, Zabirowa AH¹, Kopnin PN¹, Sinitsyn DO¹, Poydasheva AG¹, Fedorov MV², Gnedovskaya EV^{1,2}, Suponeva NA¹, Piradov MA¹

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

Despite intensive study, the data regarding functional role of specific brain regions in the working memory processes still remain controversial. The study was aimed to determine the activation of cerebral cortex regions at different stages of the working memory task (information encoding, maintenance and retrieval). Functional magnetic resonance imaging (fMRI) with the modified Sternberg task was applied to 19 healthy volunteers. The objective of the task was to memorize and retain in memory the sequence of 7 letters with the subsequent comparison of one letter with the sequence. Activation was analyzed during three periods of the task compared to the rest period, as well as temporal dynamics of changes in BOLD signal intensity in three regions: left dorsolateral prefrontal, left posterior parietal and left occipital cortex. According to the results, significant activation of the regions in prefrontal and posterior parietal cortex was observed during all periods of the task ($p < 0.05$), but there were changes in its localization and lateralization. The activation pattern during the maintenance period corresponded to the fronto-parietal control network components. According to the analysis of temporal dynamics of changes in BOLD signal intensity, the most prominent activation of the dorsolateral prefrontal cortex and parietal cortex was observed in the end of the encoding period, during the maintenance period and in the beginning of the retrieval period, which confirmed the role of those areas in the working memory processes. The maximum of occipital cortex activation was observed during encoding period. The study confirmed the functional role of the dorsolateral prefrontal cortex and posterior parietal cortex in the working memory mechanisms during all stages of the Sternberg task.

Keywords: working memory, functional magnetic resonance imaging, the Sternberg task, delayed-response task, prefrontal cortex, fronto-parietal control network

Author contribution: Bakulin IS, Fedorov MV, Gnedovskaya EV, Suponeva NA, Piradov MA — study planning and design; Bakulin IS, Zabirowa AH — literature analysis; Bakulin IS, Poydasheva AG — data acquisition; Zabirowa AH, Kopnin PN, Sinitsyn DO — data analysis; Bakulin IS, Zabirowa AH, Sinitsyn DO, Fedorov MV, Gnedovskaya EV, Suponeva NA, Piradov MA — data interpretation; Bakulin IS, Zabirowa AH — manuscript draft preparation; Kopnin PN, Sinitsyn DO, Poydasheva AG, Fedorov MV, Gnedovskaya EV, Suponeva NA, Piradov MA — manuscript draft editing; all the authors — final version of the article preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Research Center of Neurology (protocol № 9-3/17 dated August 30, 2017). All volunteers submitted the informed consent to participation in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Ilya S. Bakulin
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; bakulin@neurology.ru

Received: 22.01.2020 Accepted: 22.02.2020 Published online: 29.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.013

Под рабочей памятью (РП) понимают способность к кратковременному хранению и обработке ограниченного объема информации для ее использования при решении текущей когнитивной задачи. Ухудшение РП можно наблюдать при нормальном старении [1] и ряде неврологических и психиатрических заболеваний [2], что определяет актуальность ее изучения.

Данные исследований относительно механизмов РП остаются противоречивыми [3]. Одной из наиболее изученных в контексте РП областей головного мозга является дорсолатеральная префронтальная кора (ДЛПФК). У нейронов ПФК приматов впервые была обнаружена устойчивая активность в течение периода удержания задачи на РП [4]. Впоследствии способность к подобной активности показали для других областей, однако ряд исследований подтверждает ключевое значение активности ПФК. Так, несмотря на одновременную активацию ПФК и височной коры при выполнении задачи, инактивация ПФК приводит к исчезновению устойчивой нейронной активности в височной коре приматов, в то время как инактивация височной коры не влияет на ПФК [5]. Временная инактивация ПФК приводит к более выраженному ухудшению показателей РП, чем инактивация задней теменной коры [6].

Участие ДЛПФК в процессах РП у человека подтверждено с помощью фМРТ с задачами (n-back, задачей с отсроченным сопоставлением, задачей Стернберга и др.) [7–9] и транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС) [10]. Однако во время решения задач на РП активируется множество участков коры: теменная доля (области вокруг интрапариетальной борозды, верхней теменной доли), островок, передние поясные извилины [7, 11, 12], зрительная кора [13]. В то же время остается открытым вопрос о связи активации непосредственно с процессами РП (удержание и обработка информации), поскольку она может отражать дополнительные когнитивные процессы, вовлеченные в решение задачи на РП, например восприятие стимула [13]. Использование задач с отсроченным воспроизведением, в частности задачи Стернберга [14], позволяет разделить некоторые процессы РП по времени за счет анализа отдельных этапов выполнения задачи: запечатление, или кодирование (encoding), удержание (maintenance) и извлечение (retrieval).

Исследование динамики активации в зависимости от времени облегчает и сопоставление результатов фМРТ с исследованиями, проведенными с помощью каузальных методов, например ТМС, с оценкой их онлайн-эффектов на разных этапах задачи. Учитывая возрастающий интерес к применению неинвазивной стимуляции головного мозга для улучшения когнитивной функции [15, 16], данный вопрос актуален и для клинической неврологии. Результаты фМРТ могут помочь в определении мишени ТМС, что может повысить эффективность стимуляции [17], а данные о динамике активности коры потенциально можно использовать для комбинации протоколов ТМС с когнитивной нагрузкой.

Несмотря на частое использование задачи Стернберга в нейровизуализационных исследованиях для изучения зрительно-вербальной РП [11], анализ зависимости интенсивности активации отдельных областей от времени проводили в относительно небольшом количестве исследований [9, 18–20]. Учитывая ограничения, связанные с временным разрешением фМРТ, важной проблемой остается воспроизводимость результатов подобных исследований, необходимая для подтверждения

возможности использования фМРТ для изучения отдельных процессов РП.

Целью нашего исследования было определить активацию участков коры на разных этапах модифицированной задачи Стернберга на зрительно-вербальную РП и оценить динамику активации отдельных областей с помощью анализа колебаний BOLD-сигнала в зависимости от времени. В качестве зон интереса были выбраны участки коры с предполагаемым функциональным значением в задаче Стернберга, включая участие в процессах собственно РП: левая дорсолатеральная ПФК [9, 10], левая задняя теменная кора [7, 11, 21] и левая затылочная кора [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

Исследование было проведено на базе Научного центра неврологии в 2017–2019 гг.

Критерии включения пациентов в исследование: возраст 18–55 лет; доминирующая правая рука (по данным Эдинбургского опросника [22]); нормальная (скорректированная до нормальной) острота зрения. Критерии исключения: наличие противопоказаний к проведению МРТ [23]; наличие неврологических или психиатрических заболеваний; прием препаратов, влияющих на работу ЦНС, на момент исследования; тяжелые хронические соматические заболевания.

В соответствии с критериями в исследование были включены 19 здоровых добровольцев в возрасте 22–31 года (6 мужчин), все правши. Исследование выполнено в рамках проекта «Влияние высокочастотной ритмической транскраниальной магнитной стимуляции левой дорсолатеральной префронтальной коры на показатели рабочей памяти у здоровых добровольцев».

фМРТ с задачей Стернберга

В исследовании использовали фМРТ с модифицированной задачей Стернберга на вербальную РП [9, 14]. Перед выполнением задания в томографе испытуемых инструктировали обо всех этапах. Во время исследования участники находились в наушниках для уменьшения влияния шума томографа. На восьмиканальной головной катушке было установлено зеркало, через которое доброволец мог видеть экран с заданием, расположенный в зале, где установлен томограф. В руках у испытуемого находились пульта с кнопками, которые он нажимал согласно инструкции.

Использованная фМРТ с задачей имела блочный дизайн и состояла из 24 предъявлений задания (рис. 1). Каждое предъявление включало период активации (выполнение задачи Стернберга) и период покоя. Период активации был разделен на три блока (периода): запечатление, удержание и извлечение. В периоде запечатления (1–3 с с начала выполнения задания) испытуемому на экране предъявляли стимул — 7 согласных латинских букв, выбранных в случайном порядке с помощью алгоритма, созданного в системе MATLAB R2017a (Mathworks, Natick, MA; США). Угловой размер букв — 1,5. Во время периода удержания (4–12-я с) испытуемый удерживал в памяти стимулы, при этом экран оставался пустым (без точки фиксации). В периоде извлечения (13–15-я с) на экране появилась одна буква. Испытуемый был проинструктирован нажимать

кнопку пульта в правой руке, если предъявленная в периоде извлечения буква уже встречалась в последовательности, и кнопку пульта в левой руке, если такая буква в последовательности отсутствовала. Совпадающие и несовпадающие стимулы предъявляли в случайном порядке, по 12 предъявлений каждого типа стимулов. Длительность периода активации, как и периода покоя без предъявления стимула (черный экран), составляла 15 с. Испытуемые были проинструктированы сохранять глаза открытыми в течение всех периодов. Продолжительность эксперимента — 12 мин.

Получение изображений и предобработка

Исследование проводили с использованием томографа Magnetom Verio (Siemens; Германия) с индукцией магнитного поля 3 Тл. Анатомические данные получены с помощью МРТ в режиме 3D-T1-градиентное эхо (T1-MPR) в виде 176 сагиттальных срезов с параметрами: TR — 1900 мс, TE — 2,47 мс, толщина среза — 1,0 мм, расстояние между срезами — 50%; размер вокселя — $1,0 \cdot 1,0 \cdot 1,0 \text{ мм}^3$, поле обзора — 250 мм. Функциональные данные оценивали по данным об изменениях BOLD-сигнала, полученных с помощью режима МРТ T2*-градиентное эхо с параметрами: TR — 3000 мс, TE — 30 мс, толщина среза — 3 мм, фактор расстояния — 25%, размер вокселя — $3,0 \cdot 3,0 \cdot 3,0 \text{ мм}^3$, поле обзора — 192 мм, 36 аксиальных срезов. Для достижения динамического равновесия намагниченности первые пять функциональных изображений были исключены из анализа. Предобработку и статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения SPM12 (Institute of Neurology, London; Великобритания) на базе MATLAB R2017a (Mathworks, Natick, MA; США).

Предобработка изображений включала следующие этапы: 1) выравнивание изображений для коррекции артефактов от движения с помощью преобразований сдвига и поворота; 2) корегистрация анатомических и функциональных данных; 3) сегментация полученных структурных изображений и пространственная нормализация для преобразования индивидуальных изображений в соответствии с координатами MNI (Montreal Neurological Institute); 4) пространственное сглаживание с гауссовым ядром шириной 8 мм для снижения влияния индивидуальной вариативности анатомии.

Для предотвращения эффектов низкочастотного дрейфа к функциональным данным применяли фильтр высоких частот (константа времени 128 с).

Статистический анализ

Статистическое параметрическое картирование производили с помощью общих линейных моделей, оцененных отдельно для сигнала по каждому вокселю. При анализе первого уровня были получены индивидуальные данные активации отдельно для периодов запечатления, удержания и извлечения. В качестве контрольного состояния, относительно которого рассчитывали уровень активации, использовали последние 9 с периода покоя (22–30-я с). В качестве дополнительных регрессоров были включены параметры движения головы. В групповом анализе (отдельно для каждого периода) учитывали данные 19 испытуемых. Оценку активации проводили на пиковом и кластерном уровнях. Порог для включения отдельных вокселей в кластеры был установлен на уровне $p < 0,0001$. Для анализа выбрали кластеры в сером веществе полушарий большого мозга и мозжечка с уровнем значимости $p < 0,05$ с коррекцией на множественные сравнения, контролирующей групповую вероятность ошибки первого рода (family-wise error, FWE).

Для зон статистически значимой активации в периоде удержания дополнительно проводили сравнение с активацией лобно-теменной сети контроля (frontoparietal control network, FPCN) по данным фМРТ покоя [24]. Визуализацию результатов осуществляли с помощью расширения xjView [25] путем наложения сети FPCN из атласа, описанного ранее [24], на карту активации периода удержания.

Анализировали динамику изменения интенсивности BOLD-сигнала от времени в трех зонах интереса: левой ДЛПФК, левой задней теменной коре и левой затылочной коре. Для определения конкретных регионов, активных при выполнении задачи, в рамках указанных зон интереса в качестве контраста использовали разницу между интенсивностью сигнала в периоде удержания и периоде покоя. В зоне интереса были выбраны воксели с активацией выше порогового уровня значимости ($p < 0,0001$). На групповых данных идентифицировали кластеры активации, содержащие выбранный воксель и ограниченные сферами, центром которых был воксель с локально максимальной активацией. Радиусы подбирали вручную для получения области пересечения сферы и кластера с достаточным количеством вокселей без распространения на другие анатомические области (7 мм — для ДЛПФК, 8 мм — для задней теменной коры, 10 мм — для затылочной коры). На индивидуальном уровне из



Рис. 1. Схема парадигмы фМРТ с модифицированной задачей Стернберга на вербальную РП (отсроченное распознавание объектов)

вокселей, принадлежащих анализируемому кластеру, извлекали BOLD-сигнал, а также сигнал с поправками на эффекты выравнивания и временной несферичности в рамках автокорреляционной модели AR(1). Извлеченный и смоделированный сигналы усредняли по вокселям кластера, а затем по всем испытуемым. После этого сигнал подвергали усреднению по 24 предъявлениям задания и интерполировали с периодическими граничными условиями методами быстрого преобразования Фурье с шагом $TR/10$, равным 0,3 с. При интерпретации данных из времени от начала задачи вычитали 5 с для коррекции задержки гемодинамического ответа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зоны активации участков коры в разные периоды выполнения модифицированной задачи Стернберга показаны на рис. 2.

Статистически значимая активация в периоде запечатления обнаружена в кластерах, расположенных в правой и левой теменных долях (супрамаргинальная и постцентральная извилины, верхняя теменная доля), а также билатерально в коре мозжечка и затылочной доле (клин). Отмечена активация в средней и верхней лобных извилинах справа и нижних отделах средней лобной извилины с распространением на нижнюю лобную извилину слева. Кластер активации выявлен также в роландическом оперкуле слева (табл. 1, рис. 2А).

В течение периода удержания обнаружена статистически значимая активация в медиальных отделах лобных долей билатерально, участках ПФК (средней лобной извилине справа, средней и нижней лобных извилинах слева), теменной доле (супрамаргинальной извилине и верхней теменной доле билатерально, угловой извилине справа). Кроме того, выявлена активация в передних отделах островка билатерально и в ПФК слева (средняя лобная извилина) (табл. 2, рис. 2Б).

При сопоставлении карты активации в периоде удержания с сетью FPCN отмечено частичное перекрытие зон активации в теменной и лобной долях, а также в медиальных отделах лобных долей и островках билатерально (рис. 3).

В периоде извлечения области статистически значимой активации обнаружены в правой медиальной орбитальной и передней орбитальной извилинах, правой средней височной извилине, билатерально в полушариях мозжечка (слева с распространением на фузиформную извилину). Кластер активации обнаружен также в переднем островке и области оперкула справа. В теменной доле кластеры активации выявлены в правой супрамаргинальной извилине и в левой постцентральной и супрамаргинальной извилинах. Кроме того, определен кластер активации в правой средней лобной извилине. Область активации выявлена в черве мозжечка с распространением на язычные извилины билатерально (табл. 3, рис. 2В).

В качестве зоны интереса, для которой проанализировано изменение интенсивности BOLD-сигнала в зависимости от времени, выбран кластер активации в левой средней лобной извилине на пересечении со сферой радиусом 7 мм с центром в точке максимума активации $[-36; 47; 5]$ в соответствии с координатами MNI, содержащий 21 воксель. По результатам анализа нарастание интенсивности сигнала в левой средней лобной извилине начинается с началом выполнения задачи. Кривая содержит два пика: через 6 и 15 с от начала блока, затем интенсивность сигнала постепенно снижается и достигает относительного плато (рис. 4).

Проанализировано изменение интенсивности BOLD-сигнала в зависимости от времени для кластера активации в области левой нижней теменной доли, на пересечении со сферой радиусом 8 мм с центром в точке максимума активации $[-42; -49; 54]$ в соответствии с координатами MNI, содержащего 23 вокселя. Временной паттерн изменения BOLD-сигнала в данной области сходен с

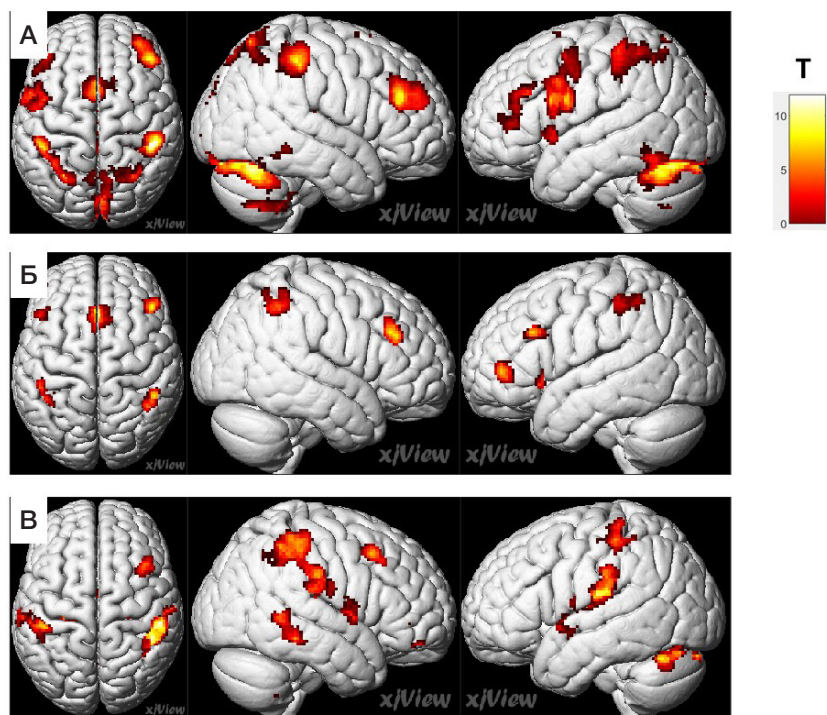


Рис. 2. Графическое изображение зон статистически значимой активации во время трех периодов выполнения задачи по сравнению с покоем на конвексительной поверхности коры полушарий большого мозга (показаны кластеры объемом более 100 вокселей). **А** — период запечатления, **Б** — период удержания, **В** — период извлечения. Слева направо: вид сверху, вид справа, вид слева. Цветовая шкала отображает уровень T-статистики

кривой, полученной для ДЛПФК, и содержит два пика — через 6 и 18 с от начала блока. В промежутке между ними отмечено снижение активности с локальным минимумом через 13 с от начала блока. Как и в случае с левой ДЛПФК, увеличение интенсивности сигнала начинается с началом блока, а минимум обнаруживается через 24–29 с от начала блока (рис. 4).

В левой средней затылочной извилине для анализа выбран кластер активации радиусом 10 мм с центром $[-24; -82; 1]$, содержащий 33 вокселя. В данной зоне интереса нарастание интенсивности BOLD-сигнала начинается с началом выполнения задания, а пик наблюдается через 5–6 с от начала блока, после чего уровень сигнала снижается. Минимум сигнала отмечен через 11 с от начала, далее следует небольшое нарастание интенсивности сигнала с последующим снижением активации (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании была проанализирована активация участков коры на разных этапах выполнения модифицированной задачи Стернберга на вербальную РП по данным фМРТ у 19 здоровых добровольцев, а также временной паттерн изменения активации в области левой ДЛПФК, левой задней теменной коры и левой затылочной коры. В периоде запечатления и извлечения обнаружена активация ПФК (билатерально и справа соответственно), а также теменной коры, полушарий мозжечка и затылочной коры билатерально. В периоде удержания основные области активации локализованы в компонентах FPCN: симметричных участках префронтальной и задней теменной коры, островков и в медиальных отделах верхней лобной извилины. Максимальная активация левой ПФК и левой теменной коры наблюдается в периоде запечатления и в конце периода удержания, между которыми она остается относительно постоянной, в то время как для затылочной коры пик активации приходится на период запечатления. Таким образом, по результатам анализа фМРТ подтверждается активация ПФК и задней теменной коры, входящих в состав FPCN, при удержании вербальной информации в РП.

Полученные нами результаты об областях активации в целом, согласуются с данными исследователей,

использовавших похожую модификацию задачи Стернберга на вербальную РП [9]. В периоде запечатления наблюдается активация верхних и нижних отделов ПФК слева, билатеральных участков теменной коры, участка затылочной коры. Однако в нашем исследовании в периоде запечатления дополнительно была обнаружена активация правой ПФК и полушарий мозжечка билатерально. Кроме того, более выражена активация теменной коры, а зона активации зрительной коры ограничивается относительно небольшим участком. В периоде удержания полученные нами зоны активации в области теменной коры и ПФК располагаются билатерально, в то время как в указанном исследовании активация локализуется преимущественно слева. В периоде извлечения зоны активации совпадают в теменной коре слева и билатеральных участках оперкулума. По сравнению с работой [9], в периоде извлечения отмечаются дополнительные области активации в правой теменной коре и височной доле, но отсутствует активация левой ПФК. Различия могут быть связаны с разной сложностью задачи (в исследовании [9] использованы последовательности из 4–6 букв, в отличие от 7 букв в нашем исследовании) или разной длительностью периодов запечатления, удержания и извлечения (2,16; 6,48 и 2,16 с соответственно [9]). В основе различий могут также лежать разные стратегии выполнения задач: паттерн активации периода удержания в нашем эксперименте сходен с активацией, описанной при выполнении задачи на РП с подавлением артикуляции [26], что может свидетельствовать об использовании неартикуляторных механизмов удержания участниками.

Активацию кластеров в функционально различных областях в периоде запечатления и удержания можно объяснить сочетанием нескольких видов активности: обработки зрительной информации, речи, выбора стратегии запоминания последовательности, а также поддержания внимания и моторной активности. Так, в периоде запечатления можно наблюдать статистически значимую активацию участков затылочной коры, отражающей обработку зрительной информации [9]. Обнаруженная в периоде запечатления активация участка левой нижней лобной извилины может отражать запоминание вербальной информации [12]. Билатеральная активация теменной коры одновременно с активацией

Таблица 1. Области статистически значимой активации во время периода запечатления при выполнении модифицированной задачи Стернберга на вербальную РП

Регион	Кластерный уровень		Пиковый уровень		MNI координаты пика зоны [x; y; z]
	Объем зоны, воксели	pFWE	T	pFWE	
Супрамаргинальная извилина, D	3587	<0,001	14,56	<0,001	[50; -32; 46]
Полушарие мозжечка, D	8293	<0,001	12,55	0,001	[28; -58; -46]
Супрамаргинальная извилина, S	1502	<0,001	11,34	0,002	[-42; -34; 42]
Верхняя теменная доля, S			11,28	0,002	[-28; -60; 46]
Постцентральная извилина, S			9,43	0,019	[-44; -36; 60]
Средняя лобная извилина, D	935	<0,001	10,49	0,005	[36; 34; 26]
Клин, билатерально	569	<0,001	9,99	0,009	[2; -84; 34]
Полушарие мозжечка, S	75	0,008	7,55	0,131	[-36; -46; -46]
Средняя лобная извилина, S	362	<0,001	8,58	0,038	[2; -22; 16]
Нижняя лобная извилина (pars triangularis), S					
Роландический оперкулум, S	128	0,001	7,45	0,046	[34; -32; 6]
Средняя и верхняя лобные извилины, D	48	0,037	6,15	0,516	[28; 8; 54]
Полушарие мозжечка, S	152	<0,001	5,97	0,597	[-30; -62; -46]

Примечание: MNI — Montreal Neurological Institute, FWE — family-wise error, T — T-статистика, D (dexter) — правый, S (sinister) — левый.

Таблица 2. Области статистически значимой активации во время периода удержания при выполнении модифицированной задачи Стернберга на вербальную РП

Регион	Кластерный уровень		Пиковый уровень		MNI координаты пика зоны [x; y; z]
	Объем зоны, воксели	pFWE	T	pFWE	
Медиальные отделы верхней лобной извилины, билатерально	420	<0,001	14,12	<0,001	[0; 26; 44]
Дополнительная моторная область, билатерально			10,37	0,006	[2; 20; 52]
Полушарие мозжечка, D	78	0,009	8,87	0,030	[24; -64; -50]
Средняя лобная извилина, S Нижняя лобная извилина (pars triangularis), S	207	<0,001	8,26	0,057	[-40; 44; 2]
Средняя лобная извилина, D	261	<0,001	8,1	0,067	[42; 30; 32]
Супрамаргинальная извилина, D	276	<0,001	7,86	0,086	[48; -42; 50]
Угловая извилина, D			7,1	0,192	[46; -50; 46]
Верхняя теменная доля, D			7	0,213	[40; -46; 42]
Верхняя теменная доля, S	317	<0,001	6,96	0,223	[-36; -48; 46]
Супрамаргинальная извилина, S			6,19	0,47	[-46; -38; 48]
Передний островок, S	126	0,001	6,93	0,229	[-32; 20; -4]
Передний островок, D	96	0,004	6,89	0,238	[34; 22; -2]
Средняя лобная извилина, S	149	<0,001	6,86	0,245	[-44; 24; 30]

Примечание: MNI — Montreal Neurological Institute, FWE — family-wise error, T — T-статистика, D (dexter) — правый, S (sinister) — левый.

нижней лобной извилины согласуется с данными о преимущественной активации дорсальной сети внимания (dorsal attention network, DAN) в периоде запечатления [27, 28]. Активация в области полушарий мозжечка совпадает с результатами метаанализа и согласуется с гипотезой об участии его правого полушария в реализации вербальной РП [11].

В периоде удержания выявлена активация компонентов FPCN [24], что соответствует данным метаанализа, показавшего постепенное увеличение активности FPCN и снижение активности DAN от периода запечатления к периоду удержания в задачах с отсроченным ответом [27]. В то же время уменьшение общего количества зон активации в периоде удержания по сравнению с запечатлением и извлечением может быть связано с меньшим количеством видов активности, вовлеченных в данный период (только удержание информации).

В периоде извлечения выявлена активация в теменных долях билатерально с преобладанием справа, что может быть связано с процессами внимания [13, 29]. Активация правой средней височной извилины может быть обусловлена переключением внимания [29]. Как и в периоде запечатления, активация затылочной коры может отражать зрительное восприятие. Определение

активации передних отделов островка согласуется с данными об их контрольной функции [28]. В отличие от результатов метаанализа [27], в нашем исследовании для периода извлечения подтверждена активация компонентов как FPCN, так и DAN. Активация ПФК справа в периоде извлечения при предъявлении вербального стимула подчеркивает неоднозначность представлений о зависящей от типа стимула латерализации функционально значимых для РП зон.

По результатам анализа изменений BOLD-сигнала с учетом задержки гемодинамического ответа активация левой ДЛПФК достигает максимума в середине периода запечатления, далее в течение периода удержания испытывает небольшое снижение, оставаясь относительно высокой, затем несколько возрастает в конце периода удержания и снижается в периоде извлечения (нейронные события в промежутке от 12 до 15 с от начала пробы), что, в целом, согласуется с данными литературы [9, 18, 20] и гипотезой о важности устойчивой нейронной активности для процессов РП [4]. По сравнению с ДЛПФК, активация теменной коры более выражено снижается в середине периода удержания, а затем испытывает небольшой подъем с максимумом в начале периода извлечения, что совпадает с результатами другого исследования и

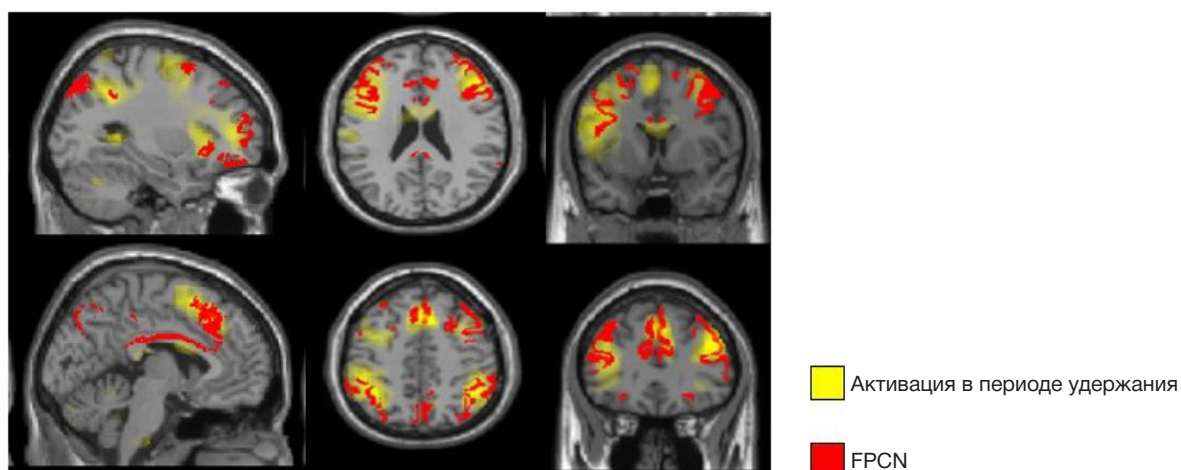


Рис. 3. Сопоставление карты активации в периоде удержания с сетью FPCN. FPCN — лобно-теменная сеть контроля (по данным [24])

Таблица 3. Области статистически значимой активации во время периода извлечения при выполнении модифицированной задачи Стернберга на вербальную РГ

Регион	Кластерный уровень		Пиковый уровень		MNI координаты пика зоны [x; y; z]
	Объем зоны, воксели	pFWE	T	pFWE	
Передняя и медиальная орбитальная извилина, D	1074	<0,001	11,36	0,002	[26; 44; -18]
Средняя височная извилина, D	309	<0,001	9,24	0,018	[50; -40; -8]
Полушарие мозжечка, D	206	<0,001	9	0,023	[24; -52; -48]
Полушарие мозжечка, S	294	<0,001	8,76	0,029	[-48; -70; -30]
Фузиформная извилина, S			6,87	0,212	[-36; -72; -22]
Передний островок, D	171	<0,001	8,03	0,062	[42; 4; 6]
Оперкулум, D			5,68	0,64	[46; -2; 18]
Супрамаргинальная извилина, D	1465	<0,001	8,02	0,063	[56; -32; 52]
Постцентральная извилина, S	263	<0,001	7,97	0,067	[-42; -34; 66]
Супрамаргинальная извилина, S			6,04	0,482	[-48; -40; 54]
Средняя лобная извилина, D	201	<0,001	7,95	0,068	[38; 18; 48]
Супрамаргинальная извилина, S	588	<0,001	7,56	0,103	[-48; -28; 28]
Постцентральная извилина, S					
Оперкулум, S					
Червь мозжечка	259	<0,001	6,86	0,214	[8; -60; -8]
Язычная извилина, билатерально					
Полушарие мозжечка, S	97	0,006	6,60	0,282	[-2; -42; 0]

Примечание: MNI — Montreal Neurological Institute, FWE — family-wise error, T — T-статистика, D (dexter) — правый, S (sinister) — левый.

особенно характерно для задачи Стернберга высокой сложности (6–9 букв) [18]. В отличие от этого, активация затылочной коры достигает пика в периоде запечатления и далее снижается, что позволяет предположить ее роль в процессах восприятия зрительного стимула, но не собственно РГ [9, 13, 18].

При интерпретации результатов исследования необходимо учитывать ограниченные возможности использованной

методики для определения этапов задания, во время которых активна каждая область мозга. Поскольку этапы следуют друг за другом в фиксированном порядке, невозможно полное разделение эффектов каждого состояния на BOLD-сигнал с помощью модели, основанной на «канонической» функции гемодинамического ответа, в отсутствие детальной информации об этой функции для каждого испытуемого и области мозга. В литературе

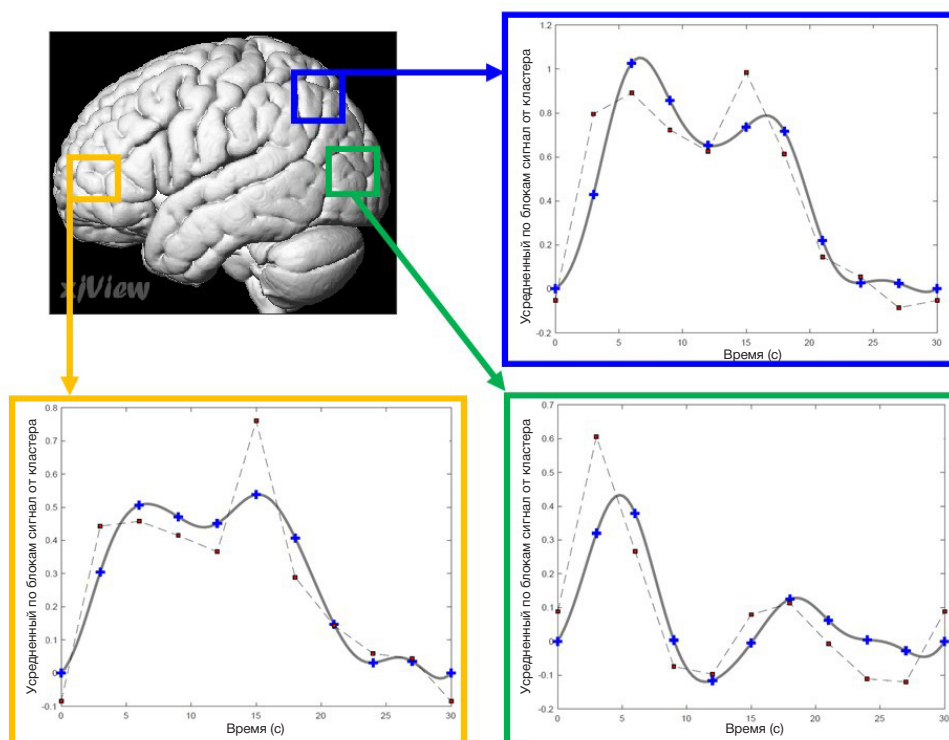


Рис. 4. Зависимость интенсивности BOLD-сигнала от времени в кластерах активации в левой средней лобной извилине, левой нижней теменной долике и левой средней затылочной извилине, усредненная по всем испытуемым и блокам задания. Все зоны показаны на поверхности левого полушария. Сплошная линия — периодически интерполированный смоделированный сигнал, пунктирная линия — фильтрованный измеренный сигнал с поправками на несферичность и движения головы. Прирост BOLD-сигнала представлен в условных единицах. Начало координат соответствует состоянию покоя в начале блока задания. При интерпретации данных из времени от начала задачи вычитали 5 с для коррекции задержки гемодинамического ответа

предложен ряд подходов, направленных на снижение влияния данной проблемы, однако не решающих ее полностью [20, 30]. К другим ограничениям можно отнести разные индивидуальные стратегии решения задачи, что могло повлиять на групповой анализ. Следует также отметить малую длительность периодов запечатления и извлечения по сравнению с периодом покоя.

Выводы

В проведенном исследовании выявлена активация ПФК и задней теменной коры, входящих в состав сети FCPCN,

при выполнении задачи с отсроченным распознаванием на вербальную РП у здоровых добровольцев. Полученные результаты соответствуют представлениям о ключевой роли ПФК в процессах удержания информации в РП, в то время как в периоде запечатления и извлечения преобладает активация теменной коры. Несмотря на ограничения метода, результаты исследования согласуются с данными литературы по использованию задачи Стернберга для исследования зрительно-вербальной РП с помощью фМРТ, что говорит в пользу их воспроизводимости и возможности использования для изучения отдельных процессов РП.

Литература

1. Archer JA, Lee A, Qiu A, Chen SA. Working memory, age and education: A lifespan fMRI study. *PLoS One*. 2018; 13 (3): e0194878.
2. Chai WJ, Abd Hamid AI, Abdullah JM. Working Memory From the Psychological and Neurosciences Perspectives: A Review. *Front Psychol*. 2018; 9: 401.
3. D'Esposito M, Postle BR. The cognitive neuroscience of working memory. *Annu Rev Psychol*. 2015; 66: 115–42.
4. Fuster JM. Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *J Neurophysiol*. 1973; 36 (1): 61–78.
5. Fuster JM, Bauer RH, Jervey JP. Functional interactions between inferotemporal and prefrontal cortex in a cognitive task. *Brain Res*. 1985; 330 (2): 299–307.
6. Riley MR, Constantinidis C. Role of Prefrontal Persistent Activity in Working Memory. *Front Syst Neurosci*. 2016; 9: 181.
7. Egli T, Coynel D, Spalek K, Fastenrath M, Freytag V, Heck A et al. Identification of Two Distinct Working Memory-Related Brain Networks in Healthy Young Adults. *eNeuro*. 2018; 5 (1): pii: ENEURO.0222-17.2018.
8. Cohen JR, Sreenivasan KK, D'Esposito M. Correspondence between stimulus encoding- and maintenance-related neural processes underlies successful working memory. *Cereb Cortex*. 2014; 24 (3): 593–9.
9. Narayanan NS, Prabhakaran V, Bunge SA, Christoff K, Fine EM, Gabrieli JD. The role of the prefrontal cortex in the maintenance of verbal working memory: an event-related fMRI analysis. *Neuropsychology*. 2005; 19 (2): 223–32.
10. Beynel L, Davis SW, Crowell CA, Hilbig SA, Lim W, Nguyen D, et al. Online repetitive transcranial magnetic stimulation during working memory in younger and older adults: A randomized within-subject comparison. *PLoS One*. 2019; 14 (3): e0213707.
11. Emch M, von Bastian CC, Koch K. Neural correlates of verbal working memory: An fMRI meta-analysis. *Front Hum Neurosci*. 2019; 13: 180.
12. Rottschy C, Langner R, Dogan I, Reetz K, Laird AR, Schulz JB, et al. Modelling neural correlates of working memory: a coordinate-based meta-analysis. *Neuroimage*. 2012; 60 (1): 830–46.
13. Xu Y. Reevaluating the Sensory Account of Visual Working Memory Storage. *Trends Cogn Sci*. 2017; 21 (10): 794–815.
14. Sternberg, S. High-speed scanning in human memory. *Science*. 1966; 153 (3736): 652–4.
15. Brunoni AR, Vanderhasselt MA. Working memory improvement with non-invasive brain stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex: a systematic review and meta-analysis. *Brain Cogn*. 2014; 86: 1–9.
16. Jiang Y, Guo Z, Xing G, He L, Peng H, Du F, et al. Effects of High-Frequency Transcranial Magnetic Stimulation for Cognitive Deficit in Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Front Psychiatry*. 2019; 10: 135.
17. Sack AT, Kadosh RC, Schuhmann T, Moerel M, Walsh V, Goebel R. Optimizing functional accuracy of TMS in cognitive studies: A comparison of methods. *J Cogn Neurosci*. 2009; 21 (2): 207–21.
18. Wen X, Wang H, Liu Z, Liu C, Li K, Ding M, et al. Dynamic Top-down Configuration by the Core Control System During Working Memory. *Neuroscience*. 2018; 391: 13–24.
19. Woodward TS, Feredoes E, Metzak PD, Takane Y, Manoach DS. Epoch-specific functional networks involved in working memory. *Neuroimage*. 2013; 65: 529–39.
20. Motes MA, Rypma B. Working memory component processes: Isolating BOLD signal changes. *Neuroimage*. 2010; 49 (2): 1933–41.
21. Hamidi M, Tononi G, Postle BR. Evaluating the role of prefrontal and parietal cortices in memory-guided response with repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neuropsychologia*. 2009; 47 (2): 295–302.
22. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971; 9 (1): 97–113.
23. Kanal E, Barkovich AJ, Bell C, Borgstede JP, Bradley Jr. WG, Froelich JW, et al. ACR guidance document on MR safe practices: 2013. *J Magn Reson Imaging*. 2013; 37 (3): 501–30.
24. Yeo BT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol*. 2011; 106 (3): 1125–65. Available from: http://www.freesurfer.net/fswiki/CorticalParcellation_Yeo2011.
25. xjView. Version 9.6 [software]. Available from: <http://www.alivelearn.net/xjview>.
26. Trapp S, Mueller K, Lepsien J, Kraemer B, Gruber O. Different neural capacity limitations for articulatory and non-articulatory maintenance of verbal information. *Exp Brain Res*. 2014; 232 (2): 619–28.
27. Kim H. Neural activity during working memory encoding, maintenance, and retrieval: A network-based model and meta-analysis. *Hum Brain Mapp*. 2019; 40 (17): 4912–33.
28. Soreq E, Leech R, Hampshire A. Dynamic network coding of working-memory domains and working-memory processes. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 936.
29. Nee DE, Brown JW, Askren MK, Berman MG, Demiralp E, Krawitz A, et al. A meta-analysis of executive components of working memory. *Cereb Cortex*. 2013; 23 (2): 264–82.
30. Розовская Р. И., Печенкова Е. В., Мершина Е. А., Мачинская Р. И. фМРТ-исследование удержания в рабочей памяти изображений различной эмоциональной валентности. *Психология. Журнал высшей школы экономики*. 2014; 11 (1): 27–48.

References

1. Archer JA, Lee A, Qiu A, Chen SA. Working memory, age and education: A lifespan fMRI study. *PLoS One*. 2018; 13 (3): e0194878.
2. Chai WJ, Abd Hamid AI, Abdullah JM. Working Memory From the Psychological and Neurosciences Perspectives: A Review. *Front Psychol*. 2018; 9: 401.
3. D'Esposito M, Postle BR. The cognitive neuroscience of working

- memory. *Annu Rev Psychol.* 2015; 66: 115–42.
4. Fuster JM. Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *J Neurophysiol.* 1973; 36 (1): 61–78.
5. Fuster JM, Bauer RH, Jervey JP. Functional interactions between inferotemporal and prefrontal cortex in a cognitive task. *Brain Res.* 1985; 330 (2): 299–307.
6. Riley MR, Constantinidis C. Role of Prefrontal Persistent Activity in Working Memory. *Front Syst Neurosci.* 2016; 9: 181.
7. Egli T, Coynel D, Spalek K, Fastenrath M, Freytag V, Heck A et al. Identification of Two Distinct Working Memory-Related Brain Networks in Healthy Young Adults. *eNeuro.* 2018; 5 (1): pii: ENEURO.0222-17.2018.
8. Cohen JR, Sreenivasan KK, D'Esposito M. Correspondence between stimulus encoding- and maintenance-related neural processes underlies successful working memory. *Cereb Cortex.* 2014; 24 (3): 593–9.
9. Narayanan NS, Prabhakaran V, Bunge SA, Christoff K, Fine EM, Gabrieli JD. The role of the prefrontal cortex in the maintenance of verbal working memory: an event-related fMRI analysis. *Neuropsychology.* 2005; 19 (2): 223–32.
10. Beynel L, Davis SW, Crowell CA, Hilbig SA, Lim W, Nguyen D, et al. Online repetitive transcranial magnetic stimulation during working memory in younger and older adults: A randomized within-subject comparison. *PLoS One.* 2019; 14 (3): e0213707.
11. Emch M, von Bastian CC, Koch K. Neural correlates of verbal working memory: An fMRI meta-analysis. *Front Hum Neurosci.* 2019; 13: 180.
12. Rottschy C, Langner R, Dogan I, Reetz K, Laird AR, Schulz JB, et al. Modelling neural correlates of working memory: a coordinate-based meta-analysis. *Neuroimage.* 2012; 60 (1): 830–46.
13. Xu Y. Reevaluating the Sensory Account of Visual Working Memory Storage. *Trends Cogn Sci.* 2017; 21 (10): 794–815.
14. Sternberg, S. High-speed scanning in human memory. *Science.* 1966; 153 (3736): 652–4.
15. Brunoni AR, Vanderhasselt MA. Working memory improvement with non-invasive brain stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex: a systematic review and meta-analysis. *Brain Cogn.* 2014; 86: 1–9.
16. Jiang Y, Guo Z, Xing G, He L, Peng H, Du F, et al. Effects of High-Frequency Transcranial Magnetic Stimulation for Cognitive Deficit in Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Front Psychiatry.* 2019; 10: 135.
17. Sack AT, Kadosh RC, Schuhmann T, Moerel M, Walsh V, Goebel R. Optimizing functional accuracy of TMS in cognitive studies: A comparison of methods. *J Cogn Neurosci.* 2009; 21 (2): 207–21.
18. Wen X, Wang H, Liu Z, Liu C, Li K, Ding M, et al. Dynamic Top-down Configuration by the Core Control System During Working Memory. *Neuroscience.* 2018; 391: 13–24.
19. Woodward TS, Feredoes E, Metzack PD, Takane Y, Manoach DS. Epoch-specific functional networks involved in working memory. *Neuroimage.* 2013; 65: 529–39.
20. Motes MA, Rypma B. Working memory component processes: Isolating BOLD signal changes. *Neuroimage.* 2010; 49 (2): 1933–41.
21. Hamidi M, Tononi G, Postle BR. Evaluating the role of prefrontal and parietal cortices in memory-guided response with repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neuropsychologia.* 2009; 47 (2): 295–302.
22. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory. *Neuropsychologia.* 1971; 9 (1): 97–113.
23. Kanal E, Barkovich AJ, Bell C, Borgstede JP, Bradley Jr. WG, Froelich JW, et al. ACR guidance document on MR safe practices: 2013. *J Magn Reson Imaging.* 2013; 37 (3): 501–30.
24. Yeo BT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol.* 2011; 106 (3): 1125–65. Available from: http://www.freesurfer.net/fswiki/CorticalParcellation_Yeo2011.
25. xjView. Version 9.6 [software]. Available from: <http://www.alivelearn.net/xjview>.
26. Trapp S, Mueller K, Lepsien J, Kraemer B, Gruber O. Different neural capacity limitations for articulatory and non-articulatory maintenance of verbal information. *Exp Brain Res.* 2014; 232 (2): 619–28.
27. Kim H. Neural activity during working memory encoding, maintenance, and retrieval: A network-based model and meta-analysis. *Hum Brain Mapp.* 2019; 40 (17): 4912–33.
28. Soreq E, Leech R, Hampshire A. Dynamic network coding of working-memory domains and working-memory processes. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 936.
29. Nee DE, Brown JW, Askren MK, Berman MG, Demiralp E, Krawitz A, et al. A meta-analysis of executive components of working memory. *Cereb Cortex.* 2013; 23 (2): 264–82.
30. Rozovskaya RI, Pechenkova EV, Mershina EA, Machinskaya RI. fMRI Study of Retention of Images with Different Emotional Valence in the Working Memory. *Psychology. Journal of the Higher School of Economics.* 2014; 11 (1): 27–48. Russian.

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 4-ФЕНИЛПИРРОЛИДИНОНА-2 В МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА ЖИВОТНЫХ

Д. А. Борозденко[✉], Д. Н. Ляхман, Я. В. Голубев, Д. В. Тарасенко, Н. М. Киселева, Вад. В. Негребетский

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

Разработка методов медикаментозной терапии и реабилитации в разных периодах ишемического поражения головного мозга в настоящее время является актуальной проблемой. Целью исследования было изучить фармакокинетику и антиишемическое действие нового производного 4-фенилпирролидинона-2 на крысах. Для изучения фармакокинетики крысам линии *Wistar* однократно вводили вещество в дозе 250 мг/кг, затем оценивали его распределение в плазме и коре головного мозга. Установлен период полувыведения ($T_{1/2}$), 83,2 мин. Время нахождения вещества в тканях головного мозга составило 24 ч. Для оценки антиишемического действия проводили моделирование инсульта методом эндоваскулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии, препарат вводили внутривенно в течение 5 дней в двух дозах, 250 и 125 мг/кг. Затем определяли размер очага поражения (с помощью МРТ), степень неврологического дефицита, локомоторную и исследовательскую активность. Исследуемое вещество значимо снижало неврологический дефицит у модельных животных по сравнению с контрольной группой (1,72 vs 4,4; $p < 0,05$). Влияние на очаг ишемии по МРТ было незначительным, а ориентировочно-исследовательское поведение под воздействием производного 4-фенилпирролидинона-2 значимо активизировалось («норковая камера», горизонтальная активность $12,1 \pm 6,8$, $22,5 \pm 10,5$; $p < 0,05$). Полученные данные позволяют сделать вывод, что исследуемое вещество проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), накапливается в коре головного мозга, способствуя коррекции неврологического дефицита и повышая исследовательскую активность у животных в модели ишемического инсульта.

Ключевые слова: нейροпротекторная активность, фармакокинетика, инсульт, 4-фенилпирролидинон-2, модели ишемического инсульта

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова на 2018–2020 гг., № гос. регистрации НИР АААА-А18-118051590108-1.

Благодарности: А. Г. Камкин, д. м. н., заведующему кафедрой физиологии МБФ, заведующему научно-исследовательской лабораторией электрофизиологии НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова, за возможность использовать оборудование Научно-образовательного центра по исследованию молекулярных и клеточных механизмов гипоксии и ишемии; М. А. Абакумову, к. х. н., доценту кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ за помощь в моделировании и проведении МРТ-сканирования, интерпретации результатов.

Вклад авторов: Д. А. Борозденко — работа с животными, сбор, обработка и анализ первичных данных, написание статьи; Д. Н. Ляхман — работа с животными, проведение функциональных тестов; Я. В. Голубев — анализ концентраций вещества; Д. В. Тарасенко — синтез вещества; Н. М. Киселева — дизайн исследования, научное руководство, работа со статьями; Вад. В. Негребетский — дизайн исследования, научное руководство.

Соблюдение этических стандартов: все процедуры с животными рассмотрены и утверждены комиссией по уходу и использованию животных РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 48/2018 от 13.06.2018 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», утвержденным приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Андреевич Борозденко
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; borozdenko@phystech.edu

Статья получена: 28.01.2020 **Статья принята к печати:** 11.02.2020 **Опубликована онлайн:** 22.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.010

STUDY OF THE NEW 4-PHENYLPYRROLIDINONE-2 DERIVATIVE PHARMACOKINETICS AND NEUROPROTECTIVE EFFECT IN THE ISCHEMIC STROKE ANIMAL MODEL

Borozdenko DA[✉], Lyakhmun DN, Golubev YaV, Tarasenko DV, Kiseleva NM, Negrebetsky VadV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of methods of drug therapy and rehabilitation in different periods of ischemic cerebral lesion is currently an urgent problem. Our study was aimed to investigate the pharmacokinetics and anti-ischemic effect of the new 4-phenylpyrrolidone-2 derivative in rats. To study the drug pharmacokinetics, the *Wistar* rats were once administered with the substance at a dose of 250 mg/kg, then, the substance distribution in blood and cerebral cortex was evaluated. Elimination half-life value was determined, which was 83.2 min. The substance remained in the brain tissue for 24 hours. To assess the anti-ischemic effect, the stroke was modeled by endovascular middle brain artery transition occlusion, and the drug was administered intravenously for 5 days at two doses, 250 and 125 mg/kg. After that the lesion focus volume was evaluated by MRI, as well as the neurological deficit severity, locomotor and explorative behavior. The studied drug significantly decreased the neurological deficit in model animals compared to control group (1.72 vs 4.4, $p < 0.05$). According to the MRI data, the effect on the ischemic focus was negligible, while the explorative behavior significantly increased under the influence of the 4-phenylpyrrolidone-2 derivative (hole board test, horizontal activity 12.1 ± 6.8 , 22.5 ± 10.5 , $p < 0.05$). The data obtained allow us to conclude that the studied substance penetrates the blood-brain barrier (BBB), and accumulates in the brain tissue promoting the neurological deficit correction and increasing the explorative behavior in the ischemic stroke model animals.

Keywords: neuroprotective activity, pharmacokinetics, stroke, 4-phenylpyrrolidone-2, ischemic stroke models

Funding: the study was performed as a part of the 2018–2020 Pirogov Russian National Research Medical University public assignment, R&D registration № АААА-А18-118051590108-1.

Acknowledgements: to Kamkin AG PhD, head of the department of Physiology of the Faculty of Biomedicine, head of the laboratory of Electrophysiology of the Institute of Translational Medicine of Pirogov Russian National Research Medical University for the opportunity to use the equipment of the Scientific and Educational Center for the study of molecular and cellular mechanisms of hypoxia and ischemia; to Abakumov MA PhD, associate professor of the department of Medical Nanobiotechnology of the Faculty of Biomedicine, for his assistance in modelling, MRI scanning and interpretation of the results.

Author contribution: Borozdenko DA — working with animals, primary data acquisition and analysis, manuscript writing; Lyakhmun DN — working with animals, functional testing; Golubev YaV — substance concentration analysis; Tarasenko DV — synthesis of substance; Kiseleva NM — study design, study management, manuscript preparation; Negrebetsky VadV — study design, study management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Animal Care and Use Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 48/2018 dated June 13, 2018). 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:** Denis A. Borozdenko
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; borozdenko@phystech.edu

Received: 28.01.2020 **Accepted:** 11.02.2020 **Published online:** 22.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.010

Инсульт занимает второе место в структуре смертности в России, по количеству случаев следуя за инфарктом миокарда. По данным Всемирной организации здравоохранения инвалидами становятся 70–80% выживших после инсульта пациентов [1–2]. Только тромболитическая терапия имеет доказанную фармакологическую эффективность в остром периоде ишемического инсульта, но для нее существует целый спектр ограничений в применении, главным из которых является узкий временной интервал. Лишь 5% пациентов с острым ишемическим инсультом получают тромболитическую терапию [1]. Восстановительная терапия охватывает гораздо более широкий временной интервал, измеряемый неделями и месяцами, поэтому многие исследователи ведут разработку лекарственных препаратов именно в контексте восстановительной медицины.

В последние годы как в России, так и за рубежом появился ряд инновационных разработок по указанной тематике [3–5].

В отделе медицинской химии и токсикологии НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова было синтезировано новое соединение, содержащее в качестве фармакофорного фрагмента производное 4-фенилпирролидинона-2 (лабораторный шифр VRF_11) [6], которое, по данным исследований *in silico* [7], потенциально способно проявлять антиишемическую, ноотропную и цитопротекторную активность.

В ходе исследования был установлен профиль безопасности вещества. Для подтверждения данных об антиишемической активности нового соединения было необходимо установить режим дозирования и определить основные фармакокинетические параметры.

Целью настоящего исследования было изучить фармакокинетику VRF_11 и подобрать наиболее эффективный режим дозирования для коррекции неврологической симптоматики в модели фокальной церебральной ишемии головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 85 половозрелых крысах-самцах линии *Wistar* массой 220 ± 12 г на момент начала исследования. Крысы были получены из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в конвенциональном виварии РНИМУ им. Н. И. Пирогова с автоматической сменой дневного и ночного периода (08:00–20:00 — «день», 20:00–08:00 — «ночь»), как минимум 12-кратной сменой воздушного объема комнаты в течение часа, оптимальной температурой 20–24 °C и влажностью 45–65%. Для кормления животных использовали полнорацонный сухой гранулированный комбикорм «Чара» для лабораторных животных

(«Ассортимент-Агро»; Россия; ветеринарное свидетельство ф. 3 250 № 3828680, декларация соответствия № РОСС RU.ПН88.Д07428, срок действия до 27.05.2021), который давали *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Животных поили водой, очищенной в соответствии с ГОСТ 51232-98. Воду в стандартных поилках со стальными крышками-носиками давали *ad libitum*. В качестве подстила использовали обеспыленный подстилочный материал Rehofix (JRS; Германия).

Проводили две серии экспериментов.

В первой серии исследовали фармакокинетику соединения VRF_11, которое вводили в виде раствора 200 мг/мл, внутривенно, в хвостовую вену иглой 0,4 × 8 мм (27G), соблюдая правила асептики и антисептики (в дозе 250 мг/кг). Определяли концентрацию вещества в плазме крови и ткани головного мозга в разных временных точках. Забор крови осуществляли через 15, 30, 60, 120, 240 мин, 8, 12, 24 и 48 ч из хвостовой вены в объеме 100–150 мкл (в пробирки с ЭДТА). Для изучения накопления VRF_11 в головном мозге крыс подвергали эвтаназии в CO₂-боксе, после чего препарировали сердечную мышцу, вставляли канюли и промывали тушку 1 л холодного раствора NaCl (0,9%). Головной мозг извлекали, выделяли кору больших полушарий. Выделенную структуру замораживали и хранили при температуре –80 °C, плазму также замораживали и хранили при –30 °C.

В соответствии с рекомендациями по изучению фармакокинетики [8] были сформированы группы животных, по 6 особей в каждой (табл. 1).

Концентрации VRF_11 в образцах плазмы и мозга крыс определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Спектрофотометрический детектор SPD-20A (Shimadzu; Япония) использовали для определения концентраций VRF_11 в диапазоне 10 мкг/мл–1 мг/мл, а масс-спектрометрический детектор LC/MS 8030/8040 (Shimadzu; Япония) — для определения концентраций VRF_11 в диапазоне 10 нг/мл–10 мкг/мл. Калибровочные кривые с диапазоном концентраций VRF_11 от 20 до 1000 мкг и от 10 нг до 50 мкг были построены с использованием сток растворов VRF_11 и плазмы интактных животных.

Определение концентрации VRF_11 в диапазоне 10 мкг/мл – 1 мг/мл

Для определения концентрации препарата в плазме крови животных проводили следующую пробоподготовку. К 100 мкл плазмы крови животных добавляли 300 мкл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной кислоты. После перемешивания и центрифугирования на центрифуге CM-50 (ELMI; Латвия) на скорости 12499 об./мин в

Таблица 1. Дизайн эксперимента по изучению фармакокинетики VRF_11 при однократном внутривенном введении

№ группы	Отбор плазмы	Кора больших полушарий
1	15 мин; 240 мин	240 мин
2	60 мин; 24 ч	24 ч
3	30 мин; 8 ч	8 ч
4	48 ч	
5	120 мин; 12 ч	
6		30 мин
7		120 мин

Таблица 2. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, мкг/мл)

Временная точка/№	1	2	3	4	5	6	M	SD
15 мин	666,38	780,89	559,36	297,84	282,59	488,92	512,67	198,69
30 мин	567,99	787,9	418,5	202,09	500,19	700,3	529,49	208,71
60 мин	533,68	185,1	335,35	285,98	415,33	602,91	393,06	156,43
120 мин	60,59	10,43	42,91	50,26	18,39	32,52	35,84	19,14

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

течение 3 мин производили отбор надосадочной жидкости с ее последующим упариванием на вакуумном роторном испарителе SpeedVac Savant SPD 1010 (Thermo Scientific; США) при комнатной температуре в течение 2 ч. Полученный сухой остаток повторно растворяли в 200 мкл подвижной фазы. Для приготовления подвижной фазы в 850 мл деионизированной воды растворяли 1,36 г дигидроортофосфата калия (KH_2PO_4). К полученному раствору добавляли 1,625 мл диэтиламина и 150 мл ацетонитрила. Условия хроматографирования: элюирование в изократическом режиме; применение аналитической колонки NUCLEODUR C_{18} ec 250/4.6 (Macherey-Nagel; Германия) с зернением 5 мкм; температура колонки — $40^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин, объем раствора на вкол — 10 мкл; рабочая длина волны — 220 нм.

Определение концентраций VRF_11 в диапазоне 10 нг/мл – 10 мкг/мл

Для определения концентрации препарата в плазме крови животных проводили следующую пробоподготовку. К 100 мкл плазмы крови животных добавляли 300 мкл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной кислоты. После перемешивания и центрифугирования (условия центрифугирования аналогичны описанным выше) супернатант упаривали на вакуумном роторном испарителе (условия описаны выше) и повторно растворяли в 200 мкл элюента. Условия хроматографирования: аналитическая колонка Discovery® C18 HPLC Column (Supelco/Sigma-Aldrich; США) с зернением 5 мкм, $L \times I.D.$ 15 см \times 4,6 мм; температура колонки — $40^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин; объем раствора на вкол — 10 мкл. Механизм анализа — ионизация распылением в электрическом поле (ESI). Температура линии десольватации (DL) составляла 250°C , нагревательного блока — 400°C . Скорость потока распыляющего газа — 2 л/мин, осушающего газа — 15 л/мин. Напряжение на капилляре — 4,5 кВ. Давление газа для соударительной диссоциации (CID) составляло 60 кПа.

Для определения концентрации VRF_11 в ткани головного мозга к 70–100 мг мозга животных добавляли 1,5 мл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной

кислоты, и гомогенизировали в стеклянном ручном гомогенизаторе в течение 3 мин. Полученную взвесь дважды центрифугировали (условия центрифугирования аналогичны описанным выше). Затем надосадочную жидкость упаривали на вакуумном центрифужном испарителе (условия описаны выше). К сухому остатку добавляли 300 мкл смеси деионизированной воды с ацетонитрилом в соотношении 100 : 5 и интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Затем центрифугировали (условия описаны выше). Супернатант анализировали. Подвижная фаза состояла из смеси 700 мл деионизированной воды, 3,5 мл муравьиной кислоты и 300 мл ацетонитрила. Условия хроматографирования: элюирование в изократическом режиме; аналитическая колонка Discovery® C18 HPLC Column (Supelco/Sigma-Aldrich; США) с зернением 5 мкм, 150/4,6; температура колонки — $40^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин; объем раствора на вкол — 10 мкл. Метод ионизации — ионизация распылением в электрическом поле. Температура линии десольватации (DL) блока составляла 250°C , нагревательного блока — 400°C . Скорость потока распыляющего газа — 2 л/мин, осушающего газа — 15 л/мин. Напряжение на капилляре — 4,5 кВ. Давление газа для соударительной диссоциации (CID) составляло 60 кПа. Обработку и анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения LabSolution вер. 5.80 (Shimadzu; Япония) и Borgia 1.03 (Наука Плюс; Россия), а также приложений Microsoft Excel (Microsoft; США) и Statistica 12 (Statsoft; США).

Во второй серии экспериментов у крыс моделировали инфаркт мозга и исследовали влияние VRF_11 в дозах 250 и 125 мг/кг на неврологическую симптоматику и поведение.

Экспериментальный инфаркт мозга моделировали путем эндоваскулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии по модифицированному методу Коидзуми [9, 10] с последующей реперфузией. Срок окклюзии среднемозговой артерии составлял 90 мин.

Были сформированы следующие группы животных, в каждой группе было по 8 особей.

1. Контрольная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили физиологический раствор 1 раз в сутки (5 дней).

Таблица 3. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, нг/мл)

Временная точка/№	1	2	3	4	5	6	M	SD
4 ч	295,99	809,40	659,03	190,36	727,0	567,02	541,47	246,66
8 ч	85,87	58,99	41,3	65,97	48,58	51,54	58,71	15,79
12 ч	2883,98	1718,41	3074,25	1045,94	2120,61	1955,05	2133,05	753,03
24 ч	147,47	126,16	114,34	93,21	105,18	97,93	114,05	20,18
48 ч	73,37	62,76	56,88	46,37	52,32	48,72	56,74	10,04

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

2. Опытная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили VRF_11 в дозе 125 мг/кг 1 раз в сутки (5 дней).

3. Опытная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили VRF_11 в дозе 250 мг/кг 1 раз в сутки (5 дней).

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) экспериментальных животных в динамике проводили на МР-томографе ClinScan (Bruker BioSpin; Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл. Для оценки объема очага инфаркта мозга МР-исследование выполняли на 1-е, 7-е, 14-е, 28-е сутки после окклюзии. МР-протокол предполагал получение T2-взвешенных изображений с синхронизацией по дыханию (TurboSpinEcho, Turbo Factor = 10, TR/TE = 5230/46 мс, размер воксела — $0.117 \times 0.13 \times 0.7$ мм) в аксиальной проекции начиная с первых суток после моделирования инфаркта мозга. Объем очага инфаркта мозга в динамике измеряли с помощью программного пакета ImageJ (Wayne Rasband; США) по T2-взвешенным изображениям. На первом этапе измеряли площадь на каждом срезе, после чего рассчитывали общий объем очага по формуле $V = (S_1 + \dots + S_n) \cdot (h + d)$, где S_1 — площадь первого среза, S_n — площадь среза n (мм²), h — толщина среза (мм); d — межсрезовой промежуток (мм) [11].

Поведенческие изменения у крыс оценивали в течение 4 недель после моделирования инсульта. Для выявления общих неврологических нарушений применяли неврологическую шкалу mNSS [12]. Моторные нарушения оценивали с помощью функциональных тестов: установок «Норковая камера» (OpenScience; Россия) и «Открытое поле» (OpenScience; Россия). Тест «Норковая камера» проводили на 10-е и 24-е сутки после инсульта [13]. Тест «Открытое поле» проводили на 16-е сутки. В тесте также оценивали ориентировочно-двигательную активность (по тем же параметрам). Кроме того, рассчитывали общий путь и скорость перемещений [14].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 12.0 (Statsoft; США), используя непараметрический критерий Манна-Уитни, t -критерий Стьюдента для независимых выборок и описательные статистики с определением среднего арифметического, стандартного отклонения, стандартной

ошибки среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование фармакокинетики VRF_11 при его внутривенном введении в дозе 250 мг/кг

В табл. 2 и 3 приведены значения концентрации VRF_11 в крови экспериментальных животных после однократного внутривенного введения. Все значения укладываются в калибровочную кривую.

Результаты исследования по измерению содержания VRF_11 в крови экспериментальных животных приведены на рис. 1.

Данные, представленные на рис. 1, удовлетворительно аппроксимируются в рамках одночастевой модели без всасывания, которую описывает уравнение вида:

$$C = A \times \exp(-at),$$

где C — концентрация исследуемой фармацевтической субстанции в крови экспериментальных животных, t — время после введения препаратов, A , a — константы процесса, описывающего фармакокинетическое уравнение, связанные с константами, характеризующими процессы распространения тестируемого препарата в организме.

В результате аппроксимации фармакокинетических данных с помощью приложения Borgia 1.03 было получено следующее уравнение:

$$C = 580,143 \times \exp(-0,00833 \times t).$$

В табл. 4 приведены показатели основных фармакокинетических параметров: C_{\max} , T_{\max} , $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, $T_{1/2}$, Cl , V_d .

Накопление VRF_11 в коре головного мозга

В табл. 5 приведены значения концентрации VRF_11 в экстрактах гомогенатов коры головного мозга после его однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг. Все значения укладываются в калибровочную кривую.

Таким образом, препарат VRF_11 проникает через ГЭБ, достигая максимальной концентрации через 30 мин

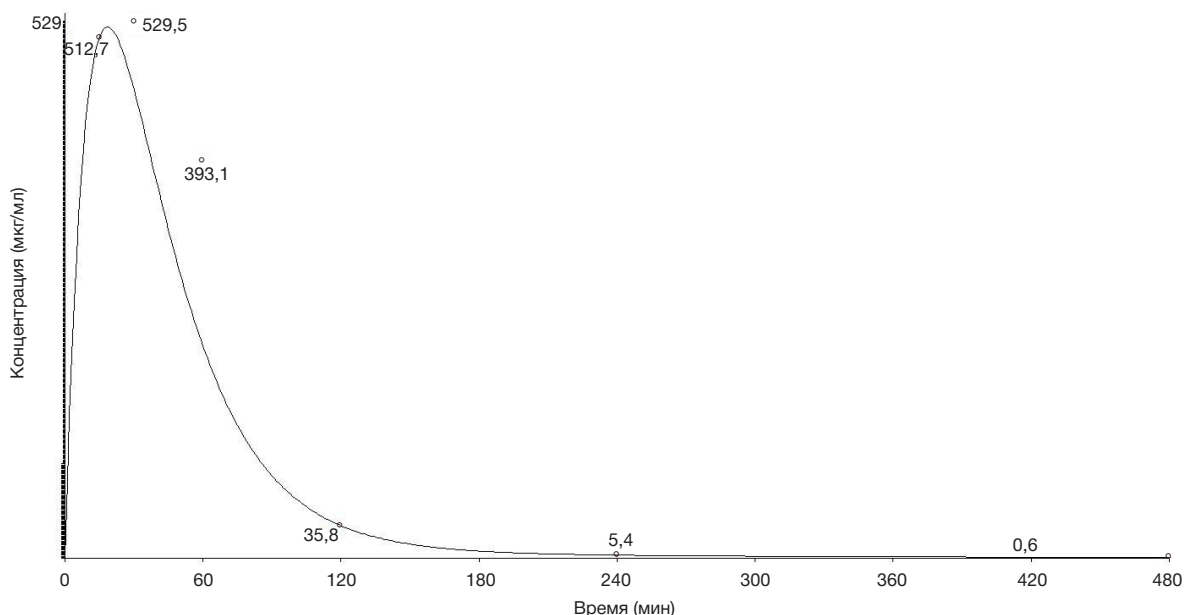


Рис. 1. Кинетика VRF_11 в плазме крови после однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг

Таблица 4. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, мг/мл)

Параметр	VRF_11
C_{max} , мг/мл	529
T_{max} , ч	0,5
$T_{1/2res}$, мин	83,2
$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, мин \times мг/мл	69645,1
Cl, мл/мин	0,004
V_d , мл	0,862

после введения. Через 24 ч после введения препарат еще обнаруживается в коре головного мозга крыс.

Контроль модели острой ишемии головного мозга, динамика объема инфаркта с течением времени

Исследование было проведено на 3 группах животных по 8 крыс в каждой. Через сутки после моделирования инфаркта мозга методом эндоваскулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии животным проводили MPT для контроля объема очага поражения. Оценка объема ишемического поражения показала, что моделирование было выполнено корректно. Две крысы с малым объемом очага были исключены из исследования (табл. 5). Крысам опытных групп после MPT-подтверждения корректности процедуры в хвостовую вену вводили исследуемое вещество в дозах 125 и 250 мг/кг. Контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора тем же методом.

Результаты MPT-сканирования в динамике на 1-е, 7-е, 14-е и 28-е сутки реперфузии показали, что изучаемое вещество в дозах 250 и 125 мг/кг не оказывало влияния на средний объем очага (в сравнении с контрольной группой, не получавшей VRF_11) (табл. 6). Объем очага инфаркта с течением времени достоверно снижался у всех групп животных к концу первого месяца относительно первых суток после ишемии.

Оценка неврологических нарушений

Оценку неврологического дефицита по шкале mNSS проводили на 1-е, 3-и и 5-е сутки реперфузии. Тестирование в первые сутки проводили до введения препаратов. Результаты оценки по неврологической шкале у животных, получивших VRF_11 в дозе 250 и 125 мг/кг, и контрольных животных значимо не отличались (табл. 6). Как видно из представленных данных (табл. 7), при сравнении неврологического дефицита на 1-е и 5-е сутки, животные из группы VRF_11 показали статистически значимые различия, тогда как у контрольных животных

таких различий не было. Следует отметить больший неврологический дефицит на первые сутки реперфузии у группы, получавшей VRF_11 в дозе 250 мг/кг, по сравнению с другими группами, тогда как MPT-сканирование не выявило различий в объеме очага ишемии у животных.

Изучение поведенческих реакций

Исследование поведения в установке «Открытое поле», которое было проведено на 16-е сутки реперфузии, показало значимые различия в показателях времени замираний и груминга, а также количества посещений центральной зоны у животных, получавших VRF_11 в дозах 125 и 250 мг/кг, по сравнению с контрольной группой (табл. 8).

В тесте «Норковая камера» через 10 дней после моделирования ишемии наблюдали значимые различия между контрольной группой и группой животных, получавших внутривенные инъекции VRF_11 (125 мг/кг и 250 мг/кг) (рис. 2). Различия присутствовали в проявлениях горизонтальной (пересечение секторов $12,1 \pm 6,8$ $22,5 \pm 10,5$ ($p < 0,05$) и $20,2 \pm 14,7$ ($p < 0,07$)) и вертикальной активности (количество выполненных стоек $2 \pm 1,6$ $7,5 \pm 4,0$ ($p < 0,05$) и $7 \pm 12,1$ ($p < 0,07$)), времени замираний ($46,6 \pm 34,4$, $1,0 \pm 1,3$ ($p < 0,01$) и $24,1 \pm 21,9$ ($p < 0,05$)) (для контрольной группы, животных, получавших VRF_11 в дозе 125 мг/кг, и животных, получавших VRF_11 в дозе 250 мг/кг, соответственно). На 24-е сутки после реперфузии в тесте «Норковая камера» опытные животные демонстрировали большую ориентировочно-исследовательскую активность по сравнению с контрольной группой. Так, статистически значимые различия ($p < 0,05$) были отмечены для пересечения секторов (у животных, получавших инъекции физ. раствора, этот показатель составил $18 \pm 7,3$, у животных, получавших VRF_11 в дозировке 125 мг/кг, он был равен $31 \pm 16,5$ ($p < 0,03$), а у крыс, получавших VRF_11 в дозировке 250 мг/кг, — $26,3 \pm 12,5$ ($p < 0,05$)) и количества выполненных норок (5 ± 3 , $10,5 \pm 2,9$ ($p < 0,01$) и $8,6 \pm 2,9$ ($p < 0,05$) соответственно). Время замираний значимо снижалось только под воздействием VRF_11 в дозе 125 мг/кг ($22,9 \pm 22,8$ и $0,6 \pm 2,3$ ($p < 0,01$)).

Таблица 5. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, мг/мл)

№	1	2	3	4	5	M	SD
Время, ч							
0,5	1813,89	1167,11	2129,94	1566,63	2058,27	1747,17	392,69
2	354,12	396,38	363,63	407,07	380,50	380,34	22,01
4	260,34	233,58	289,16	218,68	250,97	250,54	26,88
8	144,54	158,01	171,49	126,96	140,43	148,29	17,05
24	20,63	23,0	18,34	17,37	18,84	19,64	2,22

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

Таблица 6. Размер очага ишемии в головном мозге в мм³ ($M \pm m$; $n = 8$)

Сутки сканирования	Контроль (физ. раст.)		VRF_11, 125 мг/кг		VRF_11, 250 мг/кг	
	M	SD	M	SD	M	SD
1	131,14	24,60	133,25	33,16	133,66	23,72
7	111,79	24,04	107,53	33,38	115,91	20,75
14	100,43	20,63	93,64*	29,82	106,86	21,87
28	83,04*	15,63	81,6*	26,97	91,16*	20,67

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение; * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений в пределах одной группы относительно первых суток).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на широкое применение эффективных препаратов для эндоваскулярной терапии, клинические исходы после острого церебрального ишемического инсульта остаются неудовлетворительными [15]. У большинства пациентов сохраняются моторные нарушения, снижаются когнитивные способности, у многих страдает психоэмоциональная сфера. Из-за вызываемых инсультом неврологических осложнений нейропротекция и постинсультная реабилитация в последнее время становятся все более актуальной темой [16].

Кафедра химии РНИМУ им. Н. И. Пирогова имеет богатый опыт работы с ноотропными препаратами [17, 18]. В настоящем исследовании было использовано перспективное вещество, производное 4-фенилпириролидинона-2 VRF_11, обладающее, по данным компьютерного моделирования, нейропротекторными свойствами.

Проведенные исследования фармакокинетики VRF_11 (табл. 4) позволяют говорить о том, что препарат проникает через ГЭБ и в течение суток сохраняется в коре головного мозга.

По своим фармакокинетическим показателям VRF_11 несколько отличается от известных препаратов ноотропного ряда, таких как пирацетам и фенотропил. Так, для пирацетама $T_{1/2}$ составляет 4–5 ч при внутривенном введении [19], а для фенотропила — 2,77 ч [20]. Молекулярная масса пирацетама равна 142 г/моль, фенотропила — 218 г/моль. Можно проследить тенденцию к уменьшению времени полувыведения с увеличением

молекулярной массы. Так, у VRF_11 с молекулярной массой 252 г/моль $T_{1/2}$ составляет 1,26 ч.

В ткани головного мозга VRF_11 сохраняется в течение суток. Именно по этой причине мы выбрали режим дозирования раз в сутки, чтобы избежать эффекта накопления в органе-мишени. Четкого мнения о режиме дозирования в литературе по метаболитным препаратам (и по ноотропам в частности) нет. Так, согласно официальной инструкции, пирацетам принимают до 3 раз в день, фенотропил — раз в день. Именно поэтому подбор режима дозирования в экспериментальных исследованиях новых соединений — это одна из самых сложных и затратных задач. Нами был выбран следующий алгоритм: пересчет по молекулярной массе с наиболее близкого изученного аналога (фенотропила). Необходимая доза фенотропила составляет 100 мг/кг. При пересчете с учетом молекулярной массы доза исследуемого вещества составила 125 мг/кг. Для того чтобы показать возможные дозозависимые эффекты, в исследовании использовали дозу, в 2 раза превышавшую расчетную (250 мг/кг).

При коррекции ишемического поражения доза в 125 мг/кг оказалась эффективнее дозы 250 мг/кг, о чем свидетельствовало большее снижение неврологического дефицита, усиление ориентировочно-исследовательского поведения в тестах «Норковая камера» и «Открытое поле». Согласно литературным данным, эффект пирацетама, напротив, достигается только при высоких концентрациях [21]. Наши наблюдения говорят о целесообразности изучить больший диапазон доз, так

Таблица 7. Оценка неврологического дефицита по шкале mNSS ($M \pm m$; $n = 8$)

	Контроль		VRF_11 125 мг/кг		VRF_11 250 мг/кг	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
1-е сут.	5,43	3,55	6,8	3,6	9,1	2,75
3-и сут.	4,43	2,63	3,8	2,48	7,1	2,39
5-е сут.	3,71	2,81	2,4*	1,52	6,5*	2,14

Примечание: * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений в пределах одной группы относительно первых суток).

Таблица 8. Показатели активности в тесте «Открытое поле» на 16-е сутки реперфузии ($M \pm m$; $n = 8$)

	Контроль		VRF_11 125 мг/кг		VRF_11 250 мг/кг	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
Пересечение секторов	35,83	9,133	40,87	12,04	42,33*	14,95
Центр	0,16	0,4	1,13*	1,13	1,33*	1,75
Замирание, время	36,83	33,73	9,37*	6,948	21,67	23,09
Груминг, время	29,167	22,75	10,62*	13,23	17,33	14,08

Примечание: * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений относительно контрольной группы).

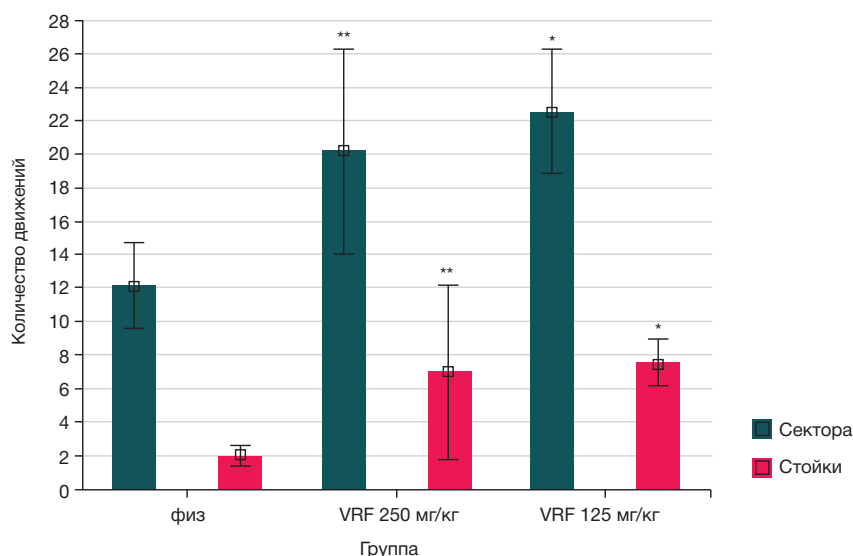


Рис. 2. * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений относительно контрольной группы); ** — $p < 0,07$ (присутствует тенденция к значимым различиям при сравнении средних значений относительно контрольной группы). Поведение животных в тесте «Норковая камера» на 10-е сутки после моделирования ишемии

как разные дозы препарата могут не только влиять на его эффективность, но и приводить к противоположным фармакологическим эффектам [20].

Согласно результатам МРТ-сканирования, соединение VRF_11 не оказывает воздействия на размер очага поражения, однако достоверно снижает неврологическую симптоматику у крыс. Такое наблюдение ограничивает оценку исследуемого соединения как нейропротектора, но говорит о перспективе его возможного применения в ряду других реабилитационных препаратов. Наблюдение интересно с точки зрения изучения возможных механизмов действия VRF_11. Безусловно, на него мы будем опираться в наших дальнейших исследованиях по поиску конкретной мишени действия препарата.

ВЫВОДЫ

Расчет основных фармакокинетических параметров нового производного 4-фенилпирролидинона-2 (лабораторный шифр VRF_11) позволил прийти к следующим выводам. 1. Препарат VRF_11 проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливается в ткани головного мозга. 2. Максимальная концентрация препарата VRF_11 в исследованном временном диапазоне достигается через 0,5 ч после введения препарата. 3. Через 24 ч препарат VRF_11 в коре головного мозга находится на грани детектирования. 4. VRF_11 в дозе 125 мг/кг значительно корректирует неврологический дефицит, возникающий в результате моделирования фокальной ишемии у крыс.

Литература

- Самородская И. В., Зайратьянц О. В., Перхов В. И., Андреев Е. М., Вайсман Д. Ш. Динамика показателей смертности населения от острого нарушения мозгового кровообращения в России и США за 15-летний период. Архив патологии. 2018; (2): 30–7.
- The top 10 causes of death. World Health Organization 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. Exp Neurol. 2017; (1): 25–37. DOI:10.1016/j.expneurol.2016.10.014.
- Cramer SC. Drugs to enhance motor recovery after stroke. Stroke. 2015; 46 (10): 2998–3005 DOI:10.1161/STROKEAHA.115.007433.
- Шакова Ф. М., Калинина Т. И., Гуляев М. В., Романова Г. А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018; 62 (2): 39–45. DOI:10.25557/0031-2991.2018.02.39-45.
- Негребецкий В. В., Крамарова Е. П., Шипов А. Г., Бауков Ю. И., Шмиголь Т. А., Киселева Н. М. Производное 4-фенилпирролидинона-2, содержащая его композиция с ноотропной активностью, способ их получения и способ лечения или профилактики нарушений нервной системы. Патентообладатель: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России. Патент РФ № 2611623. 28.02.2017.
- Filimonov DA, Druzhilovskiy DS, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Dmitriev AV, et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation. Biomed Chem Res Methods. 2018; 1 (1): 4–8. DOI:10.18097/BMCRM00004.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К, 2012; 944 с.
- Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke. 1986; (8): 1–8.
- Veinberg G, Vorona M, Zvejniece L, Viskersts R, Vavers E, Liepinsh E, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamide stereoisomers as novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor. Bioorganic Med Chem. 2013; 21 (10): 2764–71. DOI:10.1016/j.bmc.2013.03.016.
- Gubskiy IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Gubsky LV, et al. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling. Transl Stroke Res. 2018; 9 (4): 417–25.
- Lu M, Chen J, Lu D, Yi L, Mahmood A, Chopp M. Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells. J Neurosci Methods [Internet]. 2003; 128 (1–2): 183–90.
- Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Высшая школа. 1991. 32 (1): 119–22.
- Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I.

- Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013; 6 (3): 126–35. DOI:10.2478/intox-2013-0020.
15. Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016; 387 (10029): 1723–31. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
 16. Szelenberger R, Kostka J, Saluk-Bijak J, Miller E. Pharmacological Interventions and Rehabilitation Approach for Enhancing Brain Self-repair and Stroke Recovery. *Curr Neuroparmacol* [Internet]. 2020; 18 (1): 51–64. DOI:10.2174/1570159X17666190726104139.
 17. Шипов А. Г., Крамарова Е. П., Негребетский В. В., Погожих С. А., Ахалкина В. И., Бауков Ю. И. Методы синтеза, молекулярная и кристаллическая структура фенотропила. *Вестник РГМУ*. 2006; (1): 56–61.
 18. Голубицкий Г. В., Иванов В. М. Анализ сиропа Нооцетам методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Вестник Московского университета. Химия*. 2009; 50 (3): 180–84.
 19. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Пирацетам. Министерство здравоохранения РФ. Доступно по ссылке: [https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01\[2014\]_0.pdf](https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01[2014]_0.pdf)
 20. Антонова М. И., Прокопов А. А., Ахалкина В. И., Берлянд А. С. Экспериментальная фармакокинетика фенотропила у крыс. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37 (11): 6–8.
 21. Vostrikov VV. Place of piracetam in the modern practice of medicine. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther*. 2017; 15 (1): 14–25. DOI:10.17816/rcf15114-25.
- ## References
1. Samorodskaja IV, Zajratjanc OV, Perhov VI, Andreev EM, Vajsman DSh. Dinamika pokazatelej smernosti naselenija ot ostrogo narushenija mozgovogo krovoobrashhenija v Rossii i SShA za 15-letnij period. *Arhiv patologii*. 2018; 80 (2): 30–7. <https://doi.org/10.17116/patol201880230-37>
 2. The top 10 causes of death. World Health Organization 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 3. Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Exp Neurol*. 2017; (1): 25–37. DOI:10.1016/j.expneurol.2016.10.014.
 4. Cramer SC. Drugs to enhance motor recovery after stroke. *Stroke*. 2015; 46 (10): 2998–3005 DOI:10.1161/STROKEAHA.115.007433.
 5. Shakova FM, Kalinina TI, Gulyaev MV, Romanova GA. Neyroprotektivnyy i antiarnesticheskiy efekty kombinirovannoy terapii pri ishemicheskom povrezhdenii prefrontal'noy kory v eksperimente. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62 (2): 39–45. DOI:10.25557/0031-2991.2018.02.39-45.
 6. Negrebeckij VV, Kramarova EP, Shipov AG, Baukov Jul, Shmigol TA, Kiseleva NM. Proizvodnoe 4-fenilpirrolidinona-2, sodershashhaja ego kompozicija s nootropnoj aktivnost'ju, sposob ih poluchenija i sposob lechenija ili profilaktiki narushenij nervnoj sistemy. Patentobladatel': GBOU VPO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Patent RF № 2611623. 28.02.2017.
 7. Filimonov DA, Druzhilovskiy DS, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Dmitriev AV, et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation. *Biomed Chem Res Methods*. 2018; 1 (1): 4–8. DOI:10.18097/BMCRM00004.
 8. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast'1. M.: Grif i K, 2012; 944 p.
 9. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986; (8): 1–8.
 10. Veinberg G, Vorona M, Zvejniece L, Viskersts R, Vavers E, Liepinsh E, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamide stereoisomers as novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor. *Bioorganic Med Chem*. 2013; 21 (10): 2764–71. DOI:10.1016/j.bmc.2013.03.016.
 11. Gubskiy IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushchev VP, Gubsky LV, et al. MRI Guiding of the middle cerebral artery occlusion in rats aimed to improve stroke modeling. *Transl Stroke Res*. 2018; 9 (4): 417–25.
 12. Lu M, Chen J, Lu D, Yi L, Mahmood A, Chopp M. Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2003; 128 (1–2): 183–90.
 13. Buresh Ya, Bureshova O, Khyuston D P. Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya. *Vysshaya shkola*. 1991; 32 (1): 119–22.
 14. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013; 6 (3): 126–35. DOI:10.2478/intox-2013-0020.
 15. Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016; 387 (10029): 1723–31. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
 16. Szelenberger R, Kostka J, Saluk-Bijak J, Miller E. Pharmacological interventions and rehabilitation approach for enhancing brain self-repair and stroke recovery. *Curr Neuroparmacol* [Internet]. 2020; 18(1): 51–64. DOI:10.2174/1570159X17666190726104139.
 17. Shipov AG, Kramarova EP, Negrebet'skiy VV, Pogozhikh SA, Akhalkina VI, Baukov Yul. Metody sinteza, molekulyarnaya i kristallicheskaya struktura fenotropila. *Vestnik RGMU*. 2006; (1): 56–61.
 18. Golubitskiy GV, Ivanov VM. Analiz siropa Nootsetam metodom gradientnoy vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Khimiya*. 2009; 50 (3): 180–4.
 19. Instrukcija po primeneniju lekarstvennogo preparata dl medicinskogo primenenija Piracetam. Ministerstvo zdorvoohranenija RF. Available at: [https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01\[2014\]_0.pdf](https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01[2014]_0.pdf)
 20. Antonova MI, Prokopov AA, Akhalkina VI, Berlyand AS. Eksperimental'naya farmakokinetika fenotropila u krysa. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37 (11): 6–8.
 21. Vostrikov VV. Place of piracetam in the modern practice of medicine. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther*. 2017; 15 (1): 14–25. DOI:10.17816/rcf15114-25.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ БОЛЕЗНИ БЮРГЕРА

Н. С. Цимбалист¹✉, Б. А. Суфтин², А. В. Крючкова¹, Е. А. Чупятова¹, И. И. Бабиченко¹¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия² Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Балашиха, Россия

Болезнь Бюргера — это достаточно редкая патология, для которой характерно неатерогенное поражение сосудов с формированием в интима сосуда воспалительного процесса и образованием тромба. Наиболее часто в патологический процесс вовлечены артерии мелкого и среднего калибра. Оклюзия сосудов может привести к ишемии тканей, появлению трофических язв и стать причиной ампутации конечности. На сегодняшний день патогенез заболевания остается до конца неизученным. Литературные данные указывают на то, что развитие патологии может быть связано с аутоиммунными процессами. В статье представлены результаты иммуногистохимического исследования материала, полученного после ампутации нижней конечности у пациента с клиническим диагнозом болезнь Бюргера, имевшего 15-летний стаж курения. В воспалительных клеточных инфильтратах вокруг пораженных сосудов были обнаружены лимфоциты с антигенами CD4, CD8 и депозиты иммуноглобулинов IgG, которые могли служить подтверждением участия аутоиммунных механизмов в развитии заболевания. Иммуногистохимические реакции с маркерами NK-клеток CD56 и главного компонента системы комплемента C3d оказались отрицательными. Полученные результаты позволяют предположить, что основная роль в цепи патогенеза болезни Бюргера принадлежит Т-лимфоцитам-хелперам и супрессорам, а также гуморальным антителам класса IgG.

Ключевые слова: болезнь Бюргера, иммуногистохимия, CD4, CD8, IgG

Вклад авторов: И. И. Бабиченко, Б. А. Суфтин — концепция и дизайн исследования; Б. А. Суфтин, Е. А. Чупятова — сбор и обработка материала; Н. С. Цимбалист, А. В. Крючкова, И. И. Бабиченко — написание текста статьи; И. И. Бабиченко — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: пациент подписал добровольное информированное согласие на исследование и публикацию материала.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Сергеевна Цимбалист
ул. Кусковская, д. 1, кв. 77, г. Москва, 111398; n_zimb@list.ru

Статья получена: 09.12.2019 **Статья принята к печати:** 15.01.2020 **Опубликована онлайн:** 23.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.004

CASE REPORT: MORPHOLOGICAL ASPECTS OF BUERGER'S DISEASE

Tsimbalist NS¹✉, Suftin BA², Kriuchkova AV¹, Chupyatova EA¹, Babichenko II¹¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia² Central Military Clinical Hospital of the National Guard Troops of the Russian Federation, Balashikha, Russia

Buerger's disease is a rather rare pathology characterized by nonatherogenic vascular lesion associated with the inflammation in the intima of the vessel and the thrombus formation. Most often the pathological process affects small and medium caliber arteries. Vascular occlusion can lead to tissue ischemia and the trophic ulcers, and cause the extremity amputation. The disorder pathogenesis has not been fully explored. Literature data indicate that the disease development may be associated with autoimmune processes. The paper presents the results of immunohistochemical study of the material obtained after amputation of the lower extremity in a patient diagnosed with Buerger's disease. The patient had a 15-year tobacco smoking experience. In the inflammatory cell infiltrates around the affected vessels, lymphocytes with CD4, CD8 antigens and IgG immunoglobulin deposits were found, which could be considered as the evidence of the autoimmune mechanisms' involvement. Immunohistochemical reactions with markers of NK cells CD56 and the central component of the C3d complement system were negative. The results of the study suggest that the key role is played by helper and suppressor T lymphocytes, as well as by humoral antibodies of the IgG class.

Keywords: Buerger's disease, immunohistochemistry, CD4, CD8, IgG

Author contribution: Babichenko II, Suftin BA — study concept and design; Suftin BA, Chupyatova EA — data acquisition and processing; Tsimbalist NS, Kriuchkova AV, Babichenko II — manuscript writing; Babichenko II — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the patient signed the informed consent to the study and publishing of the results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia S. Tsimbalist
Kuskovskaya, 1-77, Moscow, 111398; n_zimb@list.ru

Received: 09.12.2019 **Accepted:** 15.01.2020 **Published online:** 23.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.004

Болезнь Бюргера — это редкая патология, которая наиболее широко распространена в странах Восточной Европы и Азии [1]. Характеризующий ее облитерирующий тромбангиит был впервые описан в 1879 г. Феликсом фон Винивартером, в 1908 г. Лео Бюргер опубликовал более подробное описание этой патологии [2–5]. Облитерирующий тромбангиит, или болезнь Бюргера, — неатеросклеротическое прогрессирующее заболевание, для которого характерно поражение сосудов мелкого и среднего калибра [2]. В патологический процесс могут быть вовлечены сосуды различной локализации, наиболее часто заболевание поражает артерии конечностей, как правило, бедренную и лучевую. В редких случаях болезнь затрагивает коронарные, сонные и висцеральные артерии [6].

Согласно данным литературы, частота встречаемости заболевания у пациентов с нарушением кровообращения колеблется в пределах 0,5–5% в Европе, а в Японии этот показатель может достигать 16% [6]. Заболевание чаще встречается у курящих мужчин [2, 3, 7]. Как правило, болезнь проявляется в возрасте 40–45 лет [4, 8]. В основе патогенеза заболевания может лежать эндотелиальная дисфункция [9]. Под действием повреждающих агентов нарушается проходимость сосудов, возникают воспаление и тромбоз [10]. По данным ряда авторов, к развитию заболевания может приводить патология иммунного гомеостаза.

Известно, что при болезни Бюргера повышается уровень воспалительных цитокинов, высвобождаемых

иммунными клетками, при этом воспалительная реакция усугубляет тяжесть заболевания [9, 10]. У пациентов с облитерирующим тромбангиитом были выявлены антигены HLA, A28, Ax, B53 и Bx [11]. В плазме крови также отмечали повышение уровня TNF α , IL1 β , IL4, IL17 и IL23. Повышенный уровень IL17 и IL23 указывает на развитие аутоиммунных процессов, вызванных неизвестным антигеном (возможно, компонентом никотина) [10].

К клиническим проявлениям болезни Бюргера относится хромота, со временем появляются изъязвления на пальцах ног и боль в покое [2, 4, 6]. В пораженных конечностях отмечают ощущение холода и снижение чувствительности при прикосновении к коже ступней [5, 12]. Для подтверждения диагноза необходимо исключить тромбофилию, диабет, эмболию и аутоиммунные заболевания [2, 4].

Лечение облитерирующего тромбангиита заключается в строгом прекращении курения [2, 4, 13]. У пациентов, отказавшихся от курения, наблюдается ремиссия заболевания, что способствует снижению риска ампутации [2]. Пациентам также назначают адьювантные препараты, такие как илопрост, сосудорасширяющие препараты, включающие аналоги простагландина, антагонисты кальциевых каналов, антикоагулянты и антиагрегантные препараты, в том числе аспирин [5, 10, 13]. Если пациент не прекращает курение табака, болезнь прогрессирует, из-за чего возникает необходимость в ампутации конечностей [14].

В работе описан случай проведения иммуногистохимического исследования пораженных сосудов при болезни Бюргера (облитерирующий тромбоангиит) с целью уточнения клеточного состава воспалительного инфильтрата и выявления депозитов IgG.

Описание клинического случая

Болезнь Бюргера была выявлена у 36-летнего мужчины с 15-летним стажем курения. Наблюдение вели в течение шести месяцев. В мае 2017 г. пациента внезапно начали беспокоить боли в левой стопе. Ему провели симптоматическое лечение, которое не дало эффекта. В начале июня 2017 г. были зафиксированы усиление болей в левой стопе, похолодание стопы, потемнение кожи пальцев стопы. Пациента госпитализировали, ему провели ампутацию левой стопы по Лисфранку в связи с подострым тромбозом артерий левой голени с развитием острой ишемии III степени. Рана культи стопы не зажила, присутствовали выраженные боли в левой стопе и голени. Были отмечены отеки обеих голени, развилась сгибательная контрактура левого коленного сустава. Пациент спал в положении сидя. На УЗИ артерий нижних конечностей была выявлена окклюзия левой передней большеберцовой артерии. Стеноз левой поверхностной бедренной артерии был более 60%. У пациента развилась сухая гангрена левой нижней конечности, из-за чего ему провели ампутацию на уровне бедра в августе 2017 г. Клинический диагноз — облитерирующий тромбангиит с окклюзией передней большеберцовой артерии слева, ХАН IV, сухой некроз ампутационной культи торцевой поверхности мягких тканей левой стопы.

Материал был взят из архива ФГКУЗ «ГВКГ войск национальной гвардии». Для исследования были отобраны блоки с фрагментами ткани из области стопы и голени. Образцы подвергли стандартной обработке (вырезка, подготовка парафиновых блоков, получение срезов, окраска гематоксилином и эозином). Исследование

препаратов проводили с использованием микроскопа Axioplan 2 Imaging (Karl Zeiss; Германия), для фотосъемки препаратов пользовались камерой AxioCam ERc5s (Karl Zeiss; Германия).

Для уточнения клеточного состава воспалительного инфильтрата и выявления депозитов IgG было проведено иммуногистохимическое исследование по протоколу Quanto с использованием реагентов универсальной системы визуализации UltraVision Quanto (Thermo Fisher Scientific; США), среди которых конъюгат пероксидазы хрена (HRP) на полимере. Исследование проводили на аппарате Autostainer 360 (Thermo Fisher Scientific; Великобритания). В качестве антител использовали следующие сыворотки: моноклональные мышиные антитела к CD8 (Cell Marque; США), моноклональные кроличьи антитела к CD4 (Cell Marque; США), поликлональные кроличьи антитела к IgG (Cell Marque; США), моноклональные кроличьи антитела к CD56 (Epitomics; США), моноклональные кроличьи антитела к C3d (Clone SP7, Thermo Fisher Scientific; Великобритания). Время экспозиции антител на каждом срезе составило 20 мин.

При макроскопическом исследовании левой нижней конечности, резецированной на уровне средней и нижней трети бедра, было отмечено отсутствие стопы по линии плюсне-предплюсневых суставов (после ампутации по Лисфранку) с незажившей раной и синеватыми окружающими тканями. Также были найдены обтурирующие тромбы артерий и вен на уровне подколенной артерии. Мышцы голени красно-желтые, бледные. Мышцы на уровне резекции красноватые.

Образцы тканей содержали сосуды из области левого бедра, голени и стопы, они были отобраны в непосредственной близости от гангренозных поражений. При проведении гистологического исследования в области стопы и голени были обнаружены некрозы. Были выявлены смешанные тромбы артерий и вен стопы и голени, местами с реканализацией и организацией, отмечена частичная облитерация просвета сосуда. На рис. 1 представлен поперечный срез артерии стопы, присутствуют внутрисстеночный и периваскулярный фиброз, участки некроза стенки сосуда. На микрофотографии (рис. 2) представлен поперечный срез артерии голени с организованным тромбом и явлениями реканализации. В сосудах бедра тромботические массы не были обнаружены, однако была отмечена частичная облитерация их просвета. Атеросклеротические бляшки отсутствовали. Смешанные тромбы, участки некроза стенок и частичная облитерация просвета были выявлены в сосудах разного калибра, в

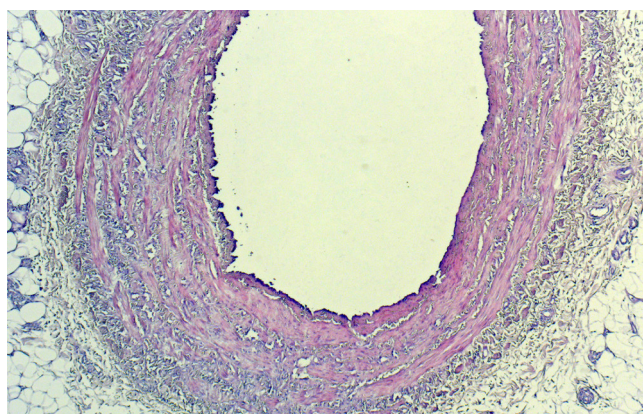


Рис. 1. Поперечный срез артерии стопы. Внутрисстеночный и периваскулярный фиброз. Микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином (x50)

крупных сосудах также отмечали большое количество *vasa vasorum* и присутствие лимфоцитов в стенке, из-за чего пациенту был поставлен диагноз облитерирующий тромбангиит.

Материал направили на иммуногистохимическое исследование. Дальнейшее проведение микроскопии показало, что в сосудах малого и среднего калибра, преимущественно в артериолах, имели место положительные цитоплазматические реакции при использовании сывороток к рецепторам маркера субпопуляций Т-лимфоцитов CD4 (преимущественно в стенке артерии голени (рис. 3)) и маркера субпопуляций Т-лимфоцитов CD8 (в стенке сосуда (артериолы) стопы (рис. 4)). На поверхности эндотелия сосудов и в их стенках наблюдали депозиты IgG (рис. 5). Отрицательная реакция была выявлена для сывороток к рецепторам CD56, маркеру NK-клеток, а также для главного компонента активации системы комплемента C3d.

Обсуждение клинического случая

Патологический процесс при болезни Бюргера начинается в дистально расположенных сосудах, прогрессируя до проксимальных [2]. Основные патологические изменения характеризуются образованием тромбов, внутривенным и периваскулярным фиброзом кровеносных сосудов [5]. Клинически выделяют три фазы течения болезни: острую, подострую и хроническую [2, 3]. В острой фазе отмечают начало воспаления, проявляющееся в инфильтрации нейтрофилами и окклюзии сосудов тромбом. Стенка сосуда относительно сохранена. В подострой фазе происходит организация тромба с постоянной адгезией тромбоцитов. В хронической фазе на фоне отсутствия медиаторов воспаления наблюдается фиброз сосуда с закупоркой его организованным тромбом. В дальнейшем может возникать реканализация [2]. При выраженных патологических изменениях и появлении язв проводят ампутацию конечности [5, 10]. В качестве лечения применяют эндоваскулярные методы вмешательства, проводят операции, предполагающие шунтирование, резекцию задних большеберцовых вен [13].

В описанном нами клиническом случае пациенту была проведена ампутация из-за развития гангрены левой ноги. При гистологическом исследовании в сосудах были выявлены смешанные тромбы, явления организации и частичная облитерация их просвета.

При постановке диагноза болезнь Бюргера необходимо отличать ее от других заболеваний, связанных с поражением сосудов. Так, при облитерирующем тромбангиите поражение сосудов характеризуется инфильтрацией клетками воспаления всех трех слоев стенки артерии, а при атеросклерозе в патологический процесс вовлечена только интима [2]. Мигрирующий тромбофлебит при болезни Бюргера отличает ее от остальных ангиитов. Основные гистологические признаки заболевания — это гиперплазия интимы сосудов наподобие капиллярного ангиоматоза, закупорка сосудов тромботическими массами, отсутствие кальцификации средней оболочки и панфлебит в венах [13].

Полученные нами результаты подтверждают, что основные патологические изменения при болезни Бюргера — это тромбоз сосудов артериального типа с наличием воспалительной инфильтрации во всех трех слоях стенки с гиперплазией интимы при отсутствии признаков атеросклероза. По данным ряда авторов [3],

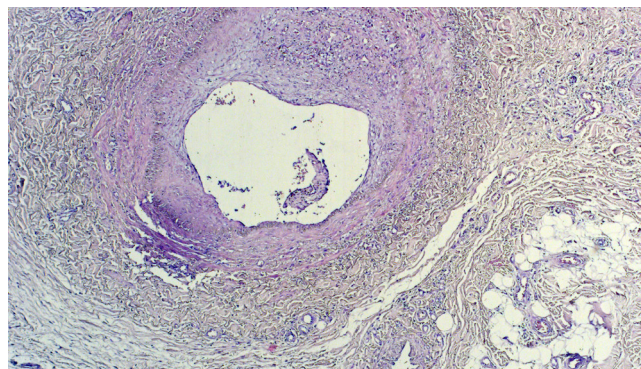


Рис. 2. Поперечный срез артерии голени. Организованный тромб с реканализацией. Микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином (x50)

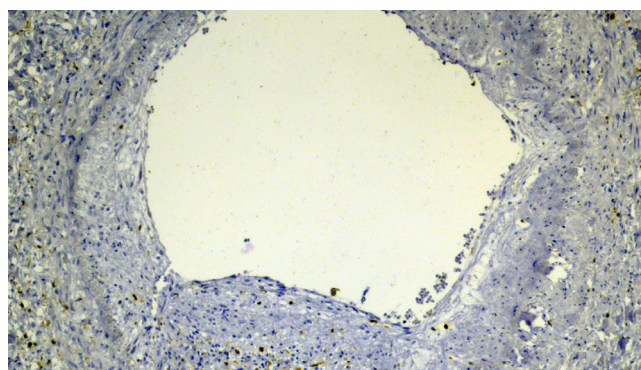


Рис. 3. Артерия голени. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белку CD4: цитоплазматическая локализация маркера. Микрофотография. Окраска ДАБ-гематоксилином (x100)

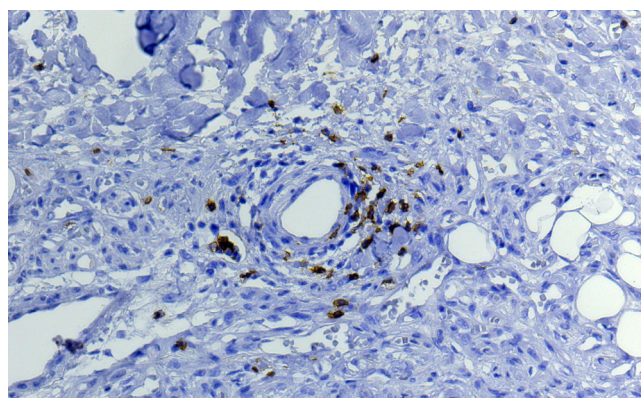


Рис. 4. Артериола стопы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белку CD8: цитоплазматическая локализация маркера. Микрофотография. Окраска ДАБ-гематоксилином (x200)

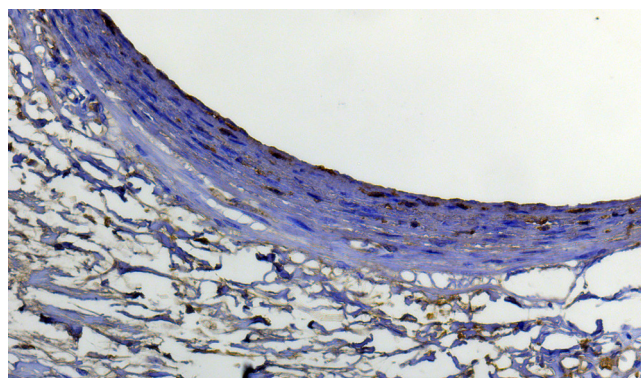


Рис. 5. Артерия стопы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белку IgG: локализация маркера на эндотелии. Микрофотография. Окраска ДАБ-гематоксилином (x200)

начало и сохранение воспалительного ответа зависит от целостности эндотелия — при эндотелиальной дисфункции нарушается эндотелий-зависимая вазорелаксация. В нашем исследовании на поверхности эндотелия и в стенке сосуда были обнаружены депозиты IgG.

В работе [10] показано повышение уровня провоспалительных цитокинов IL1 β , TNF α и IL6 в плазме пациентов с болезнью Бюргера, а также повышение уровня цитокинов Th1 (IFN γ и IL12). В отношении цитокинов Th2 показаны увеличение IL4, IL5 и IL13 и снижение IL10, а также увеличение цитокиновых профилей Th17 (IL17 и IL23), указывающих на вовлечение аутоиммунных механизмов. Группой авторов [2] было выдвинуто предположение, что у пациентов с болезнью Бюргера могут присутствовать специфический клеточный иммунитет к артериальным антигенам и гуморальные антиартериальные антитела и иммунные комплексы.

В работе [15] приведены результаты исследования иммуногистохимическим методом образцов ткани, полученных из артерии *dorsalis pedis* с целью обнаружения новых антигенов, которые могут отвечать за местные

воспалительные реакции и структурные изменения при облитерирующем тромбангите. Были определены такие антигены, как CD34, CD44 и CD90. Исследователи предполагают, что пара рецептор/лиганд CD90/CD11c играет важную роль в привлечении мононуклеарных клеток к месту повреждения.

В нашем случае образцы тканей были взяты из ампутированной конечности (стопы, голени и бедра) у пациента с клиническим диагнозом болезнь Бюргера, имевшего 15-летний стаж курения. Были определены клетки, несущие маркеры, которые могут указывать на вовлечение иммунного звена в патогенез болезни — CD4, CD8, а также депозиты IgG.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования позволяют предположить, что в развитии заболевания участвуют аутоиммунные механизмы, при этом ключевая роль принадлежит Т-лимфоцитам-хелперам и супрессорам, а также гуморальному иммунитету за счет IgG.

Литература

- Shionoya S, Leu HJ, Lie JT. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). In: Stehens WE, Lie JT, eds. Vascular pathology. London: Chapman & Hall Medical, 1995; p. 657–78.
- Qaja E, Fortune MA. Buerger Disease (Thromboangiitis Obliterans). StatPearls [Internet]. 2019 Nov [cited 2019 Nov 11]; [about 3 p.]. Available from: <https://www.statpearls.com/sp/rn/18685/>.
- Rivera-Chavarría IJ, Brenes-Gutiérrez JD. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). Ann Med Surg (Lond). 2016; (7): 79–82. PubMed PMID: 27144003.
- Seebald J, Gritters L. Thromboangiitis obliterans (Buerger disease). Radiol Case Rep. 2015; 10 (3): 9–11. PubMed PMID: 26649109.
- Li Q-L, He D-H, Huang Y-H, Niu M. Thromboangiitis obliterans in two brothers. Experimental and Therapeutic Medicine. 2013; 6 (2): 317–20. PubMed PMID: 24137181.
- Nobre CA, Vieira WP, da Rocha FE, de Carvalho JF, Rodrigues CE. Clinical, arteriographic and histopathologic analysis of 13 patients with thromboangiitis obliterans and coronary involvement. Isr Med Assoc J. 2014; 16 (7): 449–53. PubMed PMID: 25167694.
- Шилкина Н. П., Лилеева М. А., Дряженкова И. В., Кауфман Е. В., Прокопенко А. В. Облитерирующий тромбангит и атеросклероз сосудов нижних конечностей: клинико-морфологическая характеристика. Клиническая геронтология. 2006; 12 (2): 15–18.
- Elfarra M, Rădulescu D, Peride I, Niculae A, Ciocâlteu A, Checheriță IA, et al. Thromboangiitis obliterans — case report. Chirurgia (Bucur). 2015; 110 (2): 183–7. PubMed PMID: 26011844.
- Igari K, Kudo T, Toyofuku T, Inoue Y. Endothelial dysfunction in

- patients with Buerger disease. Vasc Health Risk Manag. 2017; (13): 317–23. PubMed PMID: 28860792.
- Dellalibera-Joviliano R, Joviliano EE, Silva JS, Evora PR. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients. Clin Exp Immunol. 2012; 170 (1): 28–35. PubMed PMID: 22943198.
- Schmitt J, Schmidt C, Alan C, Haller C, Perrier P. Population genetics, immunologic evaluation and Buerger's disease. Projection through a personal study comprising 127 cases of juvenile arteriopathy. Bull Acad Natl Med. 1993; 177 (7): 1153–64. PubMed PMID: 8149255.
- Wan J, Yang Y, Ma ZH, Sun Y, Liu YQ, Li GJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation to treat thromboangiitis obliterans: preliminary results. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016; 20 (3): 509–13. PubMed PMID: 26914127.
- Зербино Д. Д., Зимба Е. А., Багрий Н. Н. Облитерирующий тромбангит (болезнь Бюргера): современное состояние проблемы. Ангиология и сосудистая хирургия. 2016; 22 (4): 185–92.
- Sinclair NR, Laub DR. Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease). Eplasty [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 10]; [about 6 p.]. Available from: [http://www.eplasty.com/interesting-cases/3591-thromboangiitis-obliterans-\(buerger-s-disease\)](http://www.eplasty.com/interesting-cases/3591-thromboangiitis-obliterans-(buerger-s-disease))
- Guzel E, Topal E, Yildirim A, Atilla P, Akkus M, Dagdeviren A. Targeting novel antigens in the arterial wall in thromboangiitis obliterans. Folia Histochem Cytobiol. 2010; 48 (1): 134–41. PubMed PMID: 20529829.

References

- Shionoya S, Leu HJ, Lie JT. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). In: Stehens WE, Lie JT, eds. Vascular pathology. London: Chapman & Hall Medical, 1995; p. 657–78.
- Qaja E, Fortune MA. Buerger Disease (Thromboangiitis Obliterans). StatPearls [Internet]. 2019 Nov [cited 2019 Nov 11]; [about 3 p.]. Available from: <https://www.statpearls.com/sp/rn/18685/>.
- Rivera-Chavarría IJ, Brenes-Gutiérrez JD. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). Ann Med Surg (Lond). 2016; (7): 79–82. PubMed PMID: 27144003.
- Seebald J, Gritters L. Thromboangiitis obliterans (Buerger disease). Radiol Case Rep. 2015; 10 (3): 9–11. PubMed PMID: 26649109.
- Li Q-L, He D-H, Huang Y-H, Niu M. Thromboangiitis obliterans in two brothers. Experimental and Therapeutic Medicine. 2013; 6 (2): 317–20. PubMed PMID: 24137181.
- Nobre CA, Vieira WP, da Rocha FE, de Carvalho JF, Rodrigues CE. Clinical, arteriographic and histopathologic analysis of 13 patients with thromboangiitis obliterans and coronary involvement. Isr Med Assoc J. 2014; 16 (7): 449–53. PubMed PMID: 25167694.
- Shilkina NP, Lileeva MA, Drjazhenkova IV, Kaufman EV, Prokopenko AV. Obliterirujushij trombangit i ateroskleroz sosudov nizhnih konechnostej: kliniko-morfologicheskaja harakteristika. Klinicheskaja gerontologija. 2006; 12 (2): 15–18.

8. Elfarra M, Rădulescu D, Peride I, Niculae A, Ciocâlțeu A, Checheriță IA, et. al. Thromboangiitis obliterans — case report. *Chirurgia (Bucur)*. 2015; 110 (2): 183–7. PubMed PMID: 26011844.
9. Igari K, Kudo T, Toyofuku T, Inoue Y. Endothelial dysfunction in patients with Buerger disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2017; (13): 317–23. PubMed PMID: 28860792.
10. Dellalibera-Joviliano R, Joviliano EE, Silva JS, Evora PR. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients. *Clin Exp Immunol*. 2012; 170 (1): 28–35. PubMed PMID: 22943198.
11. Schmitt J, Schmidt C, Alan C, Haller C, Perrier P. Population genetics, immunologic evaluation and Buerger's disease. Projection through a personal study comprising 127 cases of juvenile arteriopathy. *Bull Acad Natl Med*. 1993; 177 (7): 1153–64. PubMed PMID: 8149255.
12. Wan J, Yang Y, Ma ZH, Sun Y, Liu YQ, Li GJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation to treat thromboangiitis obliterans: preliminary results. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20 (3): 509–13. PubMed PMID: 26914127.
13. Zerbino DD, Zimba EA, Bagrij NN. Obliterirujushhij trombangiit (bolezn' Bjurgera): sovremennoe sostojanie problemy. *Angiologija i sosudistaja hirurgija*. 2016; 22 (4): 185–92.
14. Sinclair NR, Laub DR. Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease). *Eplasty* [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 10]; [about 6 p.]. Available from: [http://www.eplasty.com/interesting-cases/3591-thromboangiitis-obliterans-\(buerger's-disease\)](http://www.eplasty.com/interesting-cases/3591-thromboangiitis-obliterans-(buerger's-disease))
15. Guzel E, Topal E, Yildirim A, Atilla P, Akkus M, Dagdeviren A. Targeting novel antigens in the arterial wall in thromboangiitis obliterans. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010; 48 (1): 134–41. PubMed PMID: 20529829.

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ СОМАТИЧЕСКОЙ БОЛИ НА КИЛЛИНГОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС

В. В. Алексеев¹✉, А. Х. Каде²

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Иммунная система претерпевает влияния различной природы. Один из факторов, сопровождающих жизнедеятельность организма, — боль. Знать и учитывать возрастные особенности факторов врожденного иммунитета необходимо для адекватной оценки изменения их параметров в онтогенезе. В литературных источниках недостаточно данных об особенностях изменения киллинговой активности нейтрофилов в ответ на острую боль у новорожденных. Целью работы было выявить изменения фагоцитарной активности нейтрофилов в ответ на краткосрочный аллогенный стимул у новорожденных крыс. Эксперимент проводили на 3–5-дневных крысках. Были сформированы две группы: контрольная и экспериментальная с моделированием острого аллогенного воздействия. После моделирования осуществляли забор материала через 2, 30–60, 120–180 мин. Для оценки микробицидной активности нейтрофилов использовали спонтанный и стимулированный методы автоматизированного учета теста с нитросиним тетразолием (НСТ-теста). Сравнение данных проводили на основе *U*-критерия Манна–Уитни. Наблюдалось повышение значений спонтанного НСТ-теста с 50,7 до 58,6 у. ед. через 30–60 мин ($p < 0,01$), а также стимулированного НСТ-теста с 71,5 до 87,4 у. ед. ($p < 0,001$) в течение первого часа эксперимента. Максимально выраженное изменение коэффициента микробицидности наблюдали через 2 мин с 1,40 до 1,72 у. ед. ($p < 0,001$). К концу эксперимента показатели приближались к исходным значениям. При анализе результатов учитывали, что новорожденные крыска испытывают влияние со стороны микробной колонизации, на фоне которой разворачивается реакция нейтрофилов на аллогенное раздражение.

Ключевые слова: боль, НСТ-тест, новорожденные, нейтрофилы, микробицидность нейтрофилов

Благодарности: В. Г. Овсянникову, заведующему кафедрой патологической физиологии РостГМУ и А. Е. Бойченко, профессору кафедры патологической физиологии за ценные идеи и критические замечания. И. А. Аболян, главному врачу КДЦ «Здоровье» за предоставленную возможность использовать оборудование лаборатории.

Вклад авторов: В. В. Алексеев — проведение экспериментальной и аналитической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; А. Х. Каде — разработка концепции и дизайна, проверка интеллектуального содержания, окончательное редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РостГМУ (протокол № 20/17 от 23 ноября 2017 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алексеев Владимир Вячеславович
пер. Нахичеванский, д. 29, г. Ростов-на-Дону, 344022; alexeev911@gmail.com

Статья получена: 17.12.2019 **Статья принята к печати:** 07.01.2020 **Опубликована онлайн:** 20.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.002

THE EFFECT OF ACUTE SOMATIC PAIN ON THE KILLING ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN NEWBORN RATS

Alekseev VV¹✉, Kade AKh²

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

The immune system is subject to all sorts of influences. Pain is one of them, accompanying an organism's existence. It is essential to be aware of and account for age-related characteristics of the innate immunity in order to adequately assess their dynamics in ontogenesis. The literature is scarce on the changes to the killing activity of neutrophils occurring in newborns in response to acute pain. The aim of this study was to detect potential changes to the phagocytic activity of neutrophils in response to an allogenic stimulus in newborn rats. The experiments were carried out in 3–5-day-old rats. Two groups were formed: the control group and the main group, in which acute pain was modelled. Blood samples were collected 2, 30–60 and 120–180 minutes after exposure to the allogenic stimulus. The microbicidal activity of neutrophils was measured using a spectrophotometric modification of the spontaneous/stimulated nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test. The results were compared using the Mann-Whitney U test. In the first hour following pain modeling, the stimulated NBT reduction test demonstrated an increase in the measured parameters from 71.5 to 87.4 a.u. ($p < 0.001$); the spontaneous NBT reduction test showed an increase from 50.7 to 58.6 a.u. ($p < 0.01$) 30 to 60 min after exposure. The most pronounced change of the microbicidal activity coefficient was observed 2 min after pain modeling, increasing from 1.40 to 1.72 a.u. ($p < 0.001$). By the end of the experiment, the measured parameters approximated their initial values. During the analysis, we accounted for the fact that the neutrophil response to the allogenic stimulus was unfolding in the setting of microbial colonization occurring in newborns.

Keywords: pain, NBT test, newborns, neutrophils, neutrophil microbicidal activity

Acknowledgements: the authors thank Ovsyannikov VG, Head of the Department of Pathologic Physiology (Rostov State Medical University) and Boychenko AE, Professor at the Department of Pathologic Physiology, for their valuable advice and feedback; Aboyan IA, Chief Physician of the Clinical Diagnostic Center Health, for granting access to the laboratory equipment of the Center.

Author contribution: Alexeev VV conducted the experiment, analyzed and interpreted the obtained results, wrote the manuscript; Kade AKh conceived and designed the study, revised the manuscript for intellectual content and made final corrections.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Rostov State Medical University (Protocol № 20/17 dated November 23, 2017).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir V. Alexeev
per. Nakhichevansky, 29, Rostov-on-Don, 344022; alexeev911@gmail.com

Received: 17.12.2019 **Accepted:** 07.01.2020 **Published online:** 20.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.002

В литературе накоплено большое количество фактов, свидетельствующих о том, что изменение иммунологического механизма реактивности возможно при раздражении неантгенной природы. В частности, при воздействии стресса [1, 2], инфракрасного света [3], светодиодного освещения [4], магнитного поля [5], наркотических веществ [6], тяжелой физической нагрузки [7] и т. д. Боль в этом отношении не должна стать исключением.

Вовлечение нейтрофилов в острый аллогенный процесс у взрослых крыс убедительно показано Н. С. Алексеевой. Наблюдаемая этим автором реакция ярко выражена, но быстро угасает, что дало автору право сформулировать понятие о синдроме функциональной готовности нейтрофилов к эффективному фагоцитозу на случай, если сценарий долорогенной атаки найдет свое развитие при возможном повреждении тканей, их инфицировании и т. п. [8].

Есть основания полагать, что аллогенное раздражение новорожденных крысят вызовет у них комплекс ответных реакций. В их числе изменение фагоцитарной активности нейтрофилов. Показано, что среди прочих факторов врожденного иммунитета наиболее реагирующими на изменения в среде внутриутробного пребывания и при рождении оказываются нейтрофилы [9].

В доступной литературе нами не было найдено данных о влиянии острой соматической боли на киллинговую активность нейтрофилов новорожденных крыс. Цель работы — выявить изменения фагоцитарной активности нейтрофилов в ответ на краткосрочный аллогенный стимул у новорожденных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были белые новорожденные 3–5-дневные крысята средней массой по 12–14 г. Все экспериментальные животные рождались и росли в стационарных условиях в комфортном температурном режиме (около 24 °C). Пол крысят в ходе эксперимента не учитывали. Световой день составлял 12 ч. Эксперименты проводили летом.

Для определения функциональной активности нейтрофилов провели 32 эксперимента. Всех животных разделили на две неравные группы: контрольную ($n = 8$) и экспериментальную ($n = 24$). В экспериментальной группе моделировали острый болевой синдром путем электрокожного раздражения рецепторной зоны корня хвоста крысы. Он достигал 3–4-й степени интенсивности на основании критериев А. В. Вальдмана и Ю. Н. Васильева в модификации В. Г. Овсянникова в течение 2 мин [10].

После моделирования острой соматической боли животных декапитировали и осуществляли забор крови в центрифужную пробирку с гепарином (100 ЕД/мл) через 2, 30–60, 120–180 мин. Кровь разводили средой Хенкса («ПанЭко»; Россия) в соотношении 1 : 2. Центрифугировали в градиенте плотности фиколл-верографин (1,083 г/мл) в течение 45 мин при 1500 об./мин. Для оценки микробицидной активности нейтрофилов использовали спонтанный и стимулированный метод автоматизированного учета теста с нитросиним тетразолием (НСТ-теста) с выделенной клеточной взвесью [11]. Метод основан на способности практически бесцветного НСТ восстанавливаться кислородными радикалами в темно-синий диформаза.

Во все ряды вносили 0,5%-й раствор НСТ по 50 мкл. В четные ряды планшета добавляли по 50 мкл забуференного физиологического раствора (pH = 7,0) — при спонтанном НСТ-тесте. В нечетные ряды планшета вносили по 50 мкл

0,1% латексного раствора с диаметром частиц 1,5 мкм («ПанЭко»; Россия) — при стимулированном НСТ-тесте. Затем планшеты инкубировали в термостате 24 мин при 37 °C. Учет результатов производили на спектрофотометре Multiscan Sky (THERMO FISHER SCIENTIFIC; США) при длине волны 540 нм. Определяли среднюю оптическую плотность в двух лунках спонтанного НСТ-теста и в двух лунках стимулированного. Результаты выражали в условных единицах (1 у. ед. = 1000 ед. оптической плотности). Затем вычисляли коэффициент микробицидности (КМ), разделив среднюю оптическую плотность в стимулированных лунках на среднюю оптическую плотность в лунках без стимуляции.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2010 Pro (Microsoft; США), STATISTICA 10.0 (Statsoft; США). Она включала в себя: проверку нормальности распределения количественных признаков с использованием критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерия Шапиро–Уилка; вычисление медианы (Me), квантилей ($Q_{0,25}$ — нижний, $Q_{0,75}$ — верхний), интервала значений от минимального значения (Min) до максимального (Max) для данных, не подчиняющихся нормальному распределению; сравнение данных на основе U-критерия Манна–Уитни. Критическое значение уровня значимости (p) принимали равным 0,05. Результаты расчетов представлены как медиана с квантилями и интервалом значений Me [$Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$] (Min–Max).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У новорожденных крысят контрольной группы Me_{сп. НСТ} = 50,7 у. ед. [$Q_{0,25}$ = 49,3 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 52,7 у. ед.], Min — 48,9 у. ед., Max — 57,1 у. ед. Через 2 мин после аллогенного воздействия Me_{сп. НСТ} = 51,4 у. ед. [$Q_{0,25}$ = 48,8 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 54,1 у. ед.], Min — 41,9 у. ед., Max — 59,1 у. ед. В течение первого часа эксперимента Me_{сп. НСТ} = 58,6 у. ед. [$Q_{0,25}$ = 57,0 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 60,5 у. ед.], Min — 52,1 у. ед., Max — 61,3 у. ед. В рамках третьего часа наблюдения Me_{сп. НСТ} = 46,9 у. ед. [$Q_{0,25}$ = 43,3 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 49,8 у. ед.], Min — 41,6 у. ед.; Max — 51,1 у. ед.

Как показал статистический анализ, после аллогенного воздействия спонтанный НСТ-тест приходит в движение. Вектор его изменения направлен в сторону активации. Статистически значимые различия по отношению к контролю и первичной реакции зарегистрированы через 30–60 мин от начала эксперимента ($p < 0,01$). При этом медианные значения результатов свидетельствуют о равномерном распределении показателей между нижним и верхним квантилями, а верхний квантиль приближен к максимальным значениям в выборке. Следует отметить, что наблюдаемая реакция не стойкая, непродолжительна и быстро истощаема. Через 2 ч после болевого воздействия медианные значения спонтанного НСТ-теста становились ниже, чем у животных контрольной группы ($p = 0,05$) (рис. 1).

Контрольные значения стимулированного НСТ-теста выше, чем спонтанного. Me_{ст. НСТ} = 71,5 у. ед. [$Q_{0,25}$ = 68,0 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 73,4 у. ед.], Min — 67,2 у. ед., Max — 76,5 у. ед.

Сразу после нанесения аллогенного стимула все показатели стимулированного НСТ-теста возрастали, что свидетельствует о высокой функциональной готовности нейтрофилов новорожденных крыс к противостоянию возможной микробной атаке. Me_{ст. НСТ} = 90,4 у. ед. ($p < 0,001$) [$Q_{0,25}$ = 87,8 у. ед.; $Q_{0,75}$ = 93,0 у. ед.], Min — 84,8 у. ед., Max — 96,3 у. ед.

Высокая микробицидная активность сохранялась в течение часа после болевой стимуляции. $Me_{ст\ НСТ} = 87,4$ у. ед. ($p < 0,001$) [$Q_{0,25} = 78,8$ у. ед.; $Q_{0,75} = 89,9$ у. ед.], Min — 77,6 у. ед., Max — 93,0 у. ед.

Как и при постановке спонтанного НСТ-теста, через 2 ч было отмечено истощение резервов микробицидности. $Me_{ст\ НСТ} = 64,5$ у. ед. ($p < 0,05$) [$Q_{0,25} = 57,2$ у. ед.; $Q_{0,75} = 66,9$ у. ед.], Min — 54,8 у. ед., Max — 74,1 у. ед. (рис. 2).

Признавая, что НСТ-тест отражает метаболическую активность нейтрофилов, кислородзависимые механизмы их микробицидности, следует принять точку зрения разработчиков методики о том, что конечный результат, киллинговый эффект нейтрофилов более информативно описывает коэффициент микробицидности (КМ) [12], который исчисляется путем деления значения стимулированного НСТ-теста на значение спонтанного НСТ-теста. $Me_{КМ\ контр} = 1,40$ у. ед. [$Q_{0,25} = 1,33$ у. ед.; $Q_{0,75} = 1,45$ у. ед.], Min — 1,26 у. ед., Max — 1,47 у. ед.

Спустя 2 мин после аллогенного воздействия КМ статистически значимо отличался от контрольных значений (возрастал): $Me_{КМ} = 1,72$ у. ед. ($p < 0,001$) [$Q_{0,25} = 1,68$ у. ед.; $Q_{0,75} = 1,80$ у. ед.], Min — 1,63 у. ед., Max — 2,19 у. ед.

В течение первого часа эксперимента КМ снижался, однако не достигал контрольных значений, сохранялась тенденция его превалирования над КМ контрольной группы животных: $Me_{КМ} = 1,49$ у. ед. [$Q_{0,25} = 1,44$ у. ед.; $Q_{0,75} = 1,51$ у. ед.], Min — 1,32 у. ед., Max — 1,53 у. ед.

К концу эксперимента КМ уже не имел статистически значимого отличия от контрольных значений: $Me_{КМ} = 1,34$ у. ед. [$Q_{0,25} = 1,30$ у. ед.; $Q_{0,75} = 1,41$ у. ед.], Min — 1,28 у. ед., Max — 1,47 у. ед. (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Построение теоретических основ влияния острой соматической боли на фагоцитарную активность

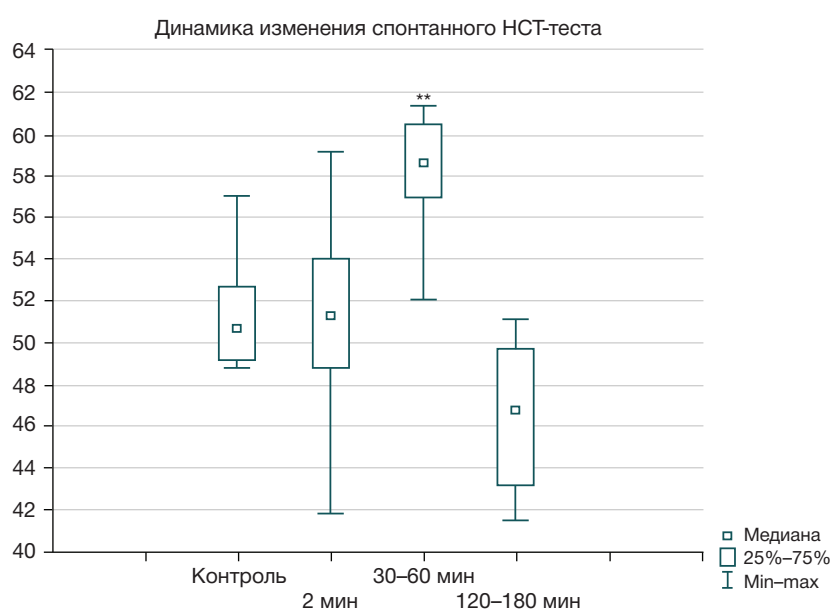


Рис. 1. Динамика изменения спонтанного НСТ-теста новорожденных крыс до и после болевого воздействия. ** — статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$)

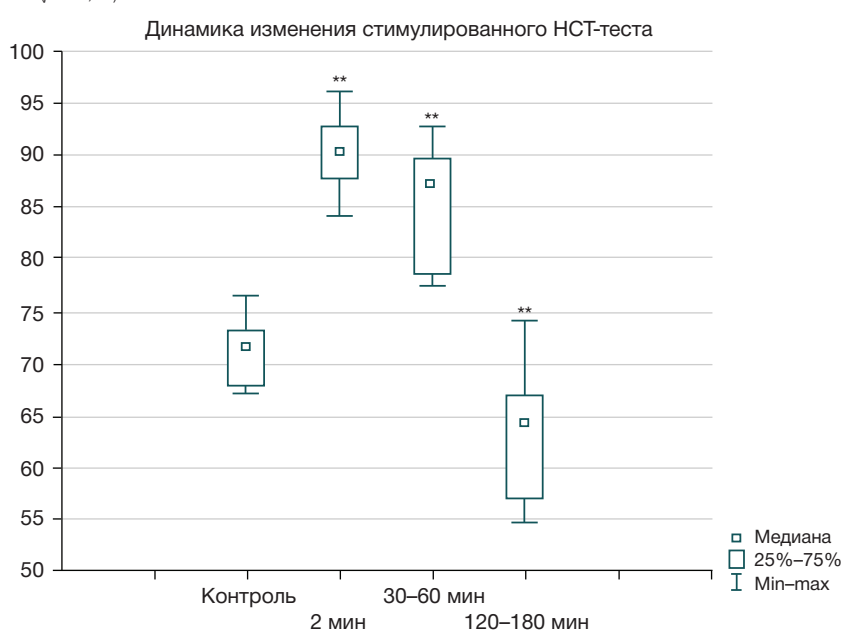


Рис. 2. Динамика изменения стимулированного НСТ-теста новорожденных крыс до и после болевого воздействия. ** — статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$)

нейтрофилов возможно только в контексте нейро-иммунно-эндокринных взаимоотношений. Сегодня ни у кого не возникает сомнения в динамическом единстве механизмов нейрогенной, эндокринной и иммунной природы в поддержании внутреннего гомеостаза целостного организма. Патогенез боли, по крайней мере, его инициальный фрагмент аналогичен стрессу. В основе стресса не всегда боль, но острая боль — это всегда стресс, а потому в ответ на аллогенное раздражение выделяются гормоны стресса и прежде всего катехоламины. На модели, используемой нами, ранее было показано, что уже через 2 мин после нанесения болевого стимула на периферии обнаруживается увеличение содержания адреналина и норадреналина, соотношение которых зависит от возраста животных [12].

Электрофизиологический анализ показал, что раздражение ноцицепторов и передача возбуждения по восходящим путям при этом приводят к активации структур мозга, обеспечивающих контроль вегетативных функций и в первую очередь гипоталамуса, совпадают с активацией нейтрофильных гранулоцитов [13].

Помимо нейрогенного норадреналина в кровь из мозгового вещества надпочечников поступают адреналин и норадреналин. Они находят свои мишени, и события развиваются по классическим канонам стресса. Одним из объектов воздействия являются нейтрофилы, они экспрессируют как α -, так и β -адренорецепторы [14], что было подтверждено позднее [15]. Как следствие, в нашей работе мы наблюдали увеличение фагоцитарной активности к первому часу эксперимента (спонтанный НСТ-тест), а при стимуляции — ко второй минуте после болевого воздействия (стимулированный НСТ-тест). Но уже к концу эксперимента фагоцитарная активность восстанавливается до исходных значений. В основе наблюдаемого снижения лежит активация β -адренорецепторов нейтрофилов [16]. Следует также учесть, что стресс сопровождается повышением продукции глюкокортикоидов, которые подавляют функциональную активность нейтрофилов [17].

Результат определения КМ свидетельствует о том, что нейтрофилы новорожденных крыс обладают киллинговой активностью [11, 18].

Установленные факты активации спонтанного и стимулированного НСТ-тестов, а также повышение киллинговой активности нейтрофилов в ответ на болевое раздражение на первый взгляд вступают в противоречие с достаточно устоявшимся представлением о функциональной незрелости фагоцитов новорожденных.

Одной из возможных версий объяснения вскрытой закономерности является признание наиболее рано формирующейся способности продуцировать супероксидный радикал [19] на фоне редуцированных защитных функций нейтрофилов [20].

В период новорожденности идет активная колонизация микрофлорой организма ребенка, его кожных покровов, слизистых оболочек, органов желудочно-кишечного тракта, легких, мочеполовой системы. Процесс этот весьма интенсивен и скоротечен. Несмотря на то что факт колонизации стал хрестоматийным, его продолжают освещать в научной литературе в новых ракурсах [21–23]. Неизменной остается лишь точка зрения о том, что интенсивная антигенная нагрузка не может не мобилизовать факторы резистентности организма, с учетом того, что механизмы адаптивного иммунитета к моменту рождения еще не развиты. Следует согласиться: факторы врожденного иммунитета и среди них нейтрофилы, как наиболее лабильные клетки, оперативно обеспечивающие первую линию защиты в период новорожденности, обретают ключевую роль. Открытие феномена бактериальной транслокации лишь подтверждает этот тезис [24].

Таким образом, система врожденного иммунитета новорожденных, с одной стороны, испытывает стимуляцию со стороны микробной колонизации, а с другой — это фон, на котором разворачиваются реакции, в частности нейтрофилов, на стимулы неантигенной природы, в нашем случае на острое аллогенное воздействие.

ВЫВОДЫ

1. У новорожденных крыс в ответ на острое аллогенное раздражение активируется и возрастает киллинговая активность нейтрофилов. 2. Реакции антимикробной защиты у нейтрофилов, наблюдаемые у новорожденных

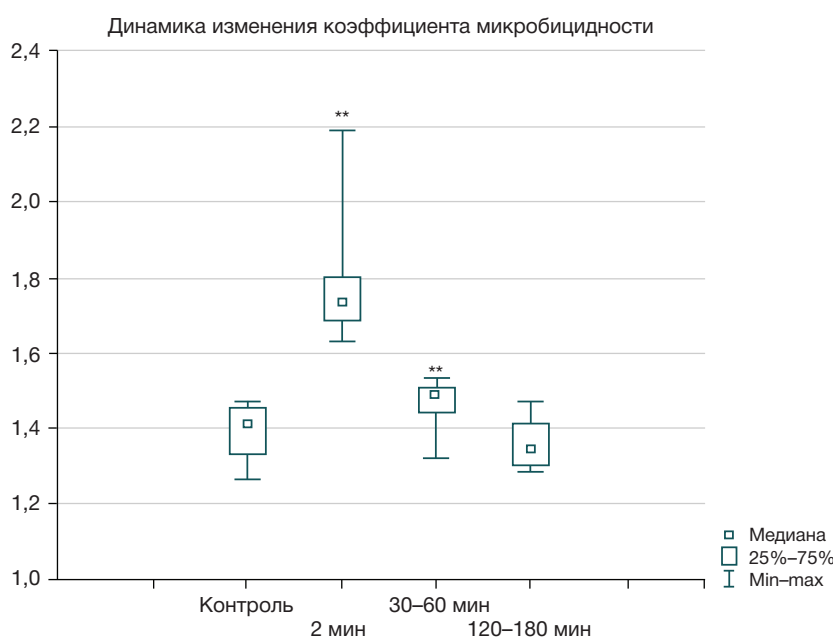


Рис. 3. Динамика изменения КМ новорожденных крыс до и после болевого воздействия. ** — статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$)

крыс в ответ на краткосрочную острую болевую стимуляцию, непродолжительны и быстро истощаются. 3. Проведенные исследования расширяют представления о реакции метаболической активности нейтрофилов

в ответ на острую боль у новорожденных. Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшего изучения боли, адекватной оценки изменения параметров в онтогенезе и профилактики ее негативных последствий.

Литература

1. Гаркави Л. Х., Уколова М. А., Квакина Е. Б. Закономерность развития качественно отличающихся общих неспецифических адаптационных реакций организма. Научное открытие № 158 от 3.10.1969.
2. Шилова Ю. А., Шилов Д. Ю., Шилов Ю. И. Влияние стресса на активность лейкоцитов периферической крови. Успехи современного естествознания. 2010; (7): 54–55.
3. Zhevago NA, Samoilova KA, Obolenskaya KD. The regulatory effect of polychromatic (visible and infrared) light on human humoral immunity. Photochemical & Photobiological Sciences. 2004; 3 (1): 102–8.
4. Огнева О. И., Осиков М. В., Гизингер О. А., Федосов А. А. Механизм изменения иммунного статуса при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. Современные проблемы науки и образования. 2015; (3): 184.
5. Зюзя Е. В., Калущий П. В., Иванов А. В. Влияние сочетанного применения кровезаменителя перфторан и антибиотика цефатаксим на состояние иммунологических показателей периферической крови в условиях моделирования инфицированной раны и воздействия на организм постоянного магнитного поля. Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2013; (1): 80.
6. Акперов Э. К., Цыган В. Н., Степанов А. В. Состояние неспецифической резистентности у лиц, злоупотребляющих наркотическими веществами. Психофармакология и биологическая наркология. 2005; 5 (2): 963–5.
7. Базарин К. П., Савченко А. А., Ковалев В. Н., Лазаренко Н. А., Ландёнок А. В. Нейросетевое моделирование влияния факторов спортивной деятельности на функциональную активность нейтрофилов крови у квалифицированных спортсменов. Acta Biomedica Scientifica. 2017; 2 (114): 62–8.
8. Алексеева Н. С. Механизмы изменения фагоцитарной активности лейкоцитов при острой висцеральной боли [диссертация]. Ростов-на-Дону, 2008.
9. Абрамова М. В. Факторы врожденного иммунитета у самок крыс и их потомства при нормальных родах и болевой стимуляции [диссертация]. Ростов-на-Дону, 2019.
10. Овсянников В. Г. Очерки патофизиологии боли. Ростов-на-Дону: Цветная печать, 2003; 148 с.
11. Киселева Е. П., Полевщиков А. В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста. Клиническая лабораторная диагностика. 1994; (4): 27–9.
12. Зайнаб А. М. Возрастные особенности моноаминергической реакции при острой боли [диссертация]. Ростов-на-Дону: 1995.
13. Степанова Е. С. Влияние переохлаждения на функциональную активность лейкоцитов [диссертация]. Сыктывкар, 2010.
14. Neumann D, Visher TL. Immunomodulation by alpha2-macroglobulin and alpha2-macroglobulin proteinase complexes: the effect on the T lymphocyte response. Eur J Immunol. 1988; (18): 755.
15. Nicholls AJ, Wen Wen S, Hall P, Hickey MJ, Wong CHY. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. J Leukoc Biol. 2018; (103): 295–309.
16. Качина И. И., Шилов Д. Ю., Шилов Ю. И. Влияние агониста бета-адренорецепторов гексопреналина сульфата *in vitro* на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови здоровых людей. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012; (1): 72–3.
17. Колесникова Н. В., Нестерова И. В., Чудилова Г. А. Ранние и отдаленные эффекты влияния экзогенного гидрокортизона на систему нейтрофильных гранулоцитов лабораторных мышей. Гематология и трансфузиология. 1999; 44 (5): 36–40.
18. Зинкин В. Ю., Годков М. А. Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2004; (8): 26–9.
19. Чиркин А. А. Биохимия с основами генной инженерии: учеб. пособие. Витебск: УО «ВГУ им. П. М. Машерова», 2010; 182 с.
20. Клименко Н. А., Шелест М. А. Функциональная активность нейтрофилов периферической крови при хроническом бронхите. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013; 11 (154): Выпуск 22: 129–131.
21. Желнина Т. П., Брежнева Н. И., Осяев Н. Ю. Анализ структуры микрофлоры новорожденных. Инфекция и иммунитет. 2016; 6 (3): 26.
22. Беляева И. А., Бомбардинова Е. П., Митиш М. Д., Потехина Т. В., Харитонов Н. А. Онтогенез и дизонтогенез микробиоты кишечника у детей раннего возраста: триггерный механизм нарушений детского здоровья. Вопросы современной педиатрии. 2017; 16 (1): 29–38.
23. Николаева И. В., Царегородцев А. Д., Шайхиева Г. С. Формирование кишечной микробиоты ребенка и факторы, влияющие на этот процесс. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018; 63 (3): 13–8.
24. Никитенко Н. И., Захаров В. В., Бородин А. В. Роль транслокации бактерий в патогенезе хирургической инфекции. Хирургия. 2001; (2): 63–6.

References

1. Garkavi LKh, Ukolova MA, Kvakina EB. Zakonomernost' razvitiya kachestvenno otlichayushchikhsya obshchikh nespetsificheskikh adaptatsionnykh reaktsiy organizma. Nauchnoe otkrytie № 158 ot 3.10.1969. Russian.
2. Shilova YuA, Shilov DYU, Shilov Yul. Vliyanie stressa na aktivnost' leykotsitov perifericheskoy krovi. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2010; (7): 54–5. Russian.
3. Zhevago NA, Samoilova KA, Obolenskaya KD. The regulatory effect of polychromatic (visible and infrared) light on human humoral immunity. Photochemical & Photobiological Sciences. 2004; 3 (1): 102–8.
4. Oгнева ОI, Osikov MV, Gizinger OA, Fedosov AA. Mekhanizm izmeneniya immunnogo statusa pri eksperimental'nom
- desinkhronoze v usloviyakh svetodiodnogo osveshcheniya. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015; (3): 184. Russian.
5. Zyuzya EV, Kalutskiy PV, Ivanov AV. Vliyanie sochetannogo primeneniya krovезаменителя перфторан и антибиотика тсефатаксим на состояние иммунологических показателей периферической крови в условиях моделирования инфицированной раны и воздействия на организм постоянного магнитного поля. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie. 2013; (1): 80. Russian.
6. Akperov EK, Tsygan VN, Stepanov AV. Sostoyanie nespetsificheskoy rezistentnosti u lits, zloupotrebyayushchikh narkoticheskimi veshchestvami. Psikhofarmakologiya i

- biologicheskaya narkologiya. 2005; 5 (2): 963–5. Russian.
7. Bazarin KP, Savchenko AA, Kovalev VN, Lazarenko NA, Landenok AV. Neyrosetevoie modelirovanie vliyaniya faktorov sportivnoy deyatel'nosti na funktsional'nyuyu aktivnost' neytrofilov krovi u kvalifitsirovannykh sportsmenov. *Acta Biomedica Scientifica*. 2017; 2 (114): 62–8. Russian.
 8. Alekseeva NS. Mekhanizmy izmeneniya fagotsitarnoy aktivnosti leykotsitov pri ostroy vistseral'noy boli [dissertatsiya]. Rostov-na-Donu, 2008. Russian.
 9. Abramova MV. Faktory vrozhdennogo immuniteta u samok krys i ikh potomstva pri normal'nykh rodakh i bolevoy stimulyatsii [dissertatsiya]. Rostov-na-Donu, 2019. Russian.
 10. Ovsyannikov VG. Ocherki patofiziologii boli. Rostov-na-Donu: Tsvetnaya pechat', 2003; 148 s. Russian.
 11. Kiseleva EP, Polevshchikov AV. Metod avtomatizirovannogo ucheta NST-testa. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1994; (4): 27–9. Russian.
 12. Zajnab AM. Vozrastnye osobennosti monoaminergicheskoy reakcii pri ostroy boli [dissertatsiya]. Rostov-na-Donu, 1995. Russian.
 13. Stepanova ES. Vliyanie pereohlazhdeniya na funktsional'nyuyu aktivnost' leykotsitov [dissertatsiya]. Syktyvkar, 2010. Russian.
 14. Heumann D, Visher TL. Immunomodulation by alpha2-macroglobulin and alpha2-macroglobulin proteinase complexes: the effect on the T lymphocyte response. *Eur J Immunol*. 1988; (18): 755.
 15. Nicholls AJ, Wen Wen S, Hall P, Hickey MJ, Wong CHY. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. *J Leukoc Biol*. 2018; (103): 295–309.
 16. Kachina II, Shilov DYU, Shilov Yul. Vliyanie agonista beta-adrenoreceptorov geksprenalina sul'fata in vitro na fagocitarnuyu aktivnost' neytrofilov perifericheskoy krovi zdorovykh ljudej. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 2012; (1): 72–3. Russian.
 17. Kolesnikova NV, Nesterova IV, Chudilova GA. Rannie i otdalennye jeffekty vlijaniya jezkogenogo gidrokortizona na sistemu neytrofil'nykh granulocitov laboratornykh myshej. *Gematologiya i transfuziologiya*. 1999; 44 (5): 36–40. Russian.
 18. Zinkin VYu, Godkov MA. Sposob kolichestvennoy otsenki kislorodzavisimogo metabolizma neytrofil'nykh granulotsitov cheloveka. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2004; (8): 26–9. Russian.
 19. Chirkin AA. Biokhimiya s osnovami gennoy inzhenerii: ucheb. posobie. Vitebsk: UO "VGU im. P. M. Masherova", 2010; 182 s. Russian.
 20. Klimenko NA, Shelest MA. Funktsional'naya aktivnost' neytrofilov perifericheskoy krovi pri khronicheskom bronkhite. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2013; 11 (154); Vypusk 22: 129–31. Russian.
 21. Zhelnina TP, Brezhneva NI, Osyayev NYu. Analiz struktury mikroflory novorozhdennykh. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3): 26. Russian.
 22. Belyaeva IA, Bombardirova EP, Mitish MD, Potekhina TV, Kharitonova NA. Ontogenez i dizontogenez mikrobioty kishechnika u detey rannego vozrasta: triggernyy mekhanizm narusheniy detskogo zdorov'ya. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2017; 16 (1): 29–38. Russian.
 23. Nikolaeva IV, Tsaregorodtsev AD, Shaykhieva GS. Formirovanie kishechnoy mikrobioty rebenka i faktory, vliyayushchie na etot protsess. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2018; 63 (3): 13–8. Russian.
 24. Nikitenko NI, Zakharov VV, Borodin AV. Rol' translokatsii bakteriy v patogeneze khirurgicheskoy infektsii. *Khirurgiya*. 2001; (2): 63–6. Russian.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ ТЯЖЕЛОГО ПОСТЭМБОЛИЗАЦИОННОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОК С МИОМОЙ МАТКИ

Э. Т. Нурмухаметова , М. Е. Шляпников

Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия


В последние годы проявляется интерес к органосохраняющим методам лечения миомы матки, одним из которых является эмболизация маточных артерий (ЭМА). Среди отрицательных сторон метода — развитие тяжелого постэмболизационного синдрома (ПЭС), требующего своевременного начала адекватного лечения с целью избежания грозных осложнений, способных привести к удалению органа. Целью исследования был поиск прогностических критериев развития тяжелого ПЭС в дооперационном периоде. В исследование вошла 81 женщина с миомой матки 7–17 недель в возрасте 19–50 лет, прошедшая лечение методом ЭМА. В работе использовали антропометрические данные пациенток и показатели кожной микроциркуляции, полученные методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с проведением окклюзионной пробы (ОП). На основании прогностических критериев построены модели с AUC (область под графиком ROC кривой) $> 0,8$. Антропометрические предикторы тяжелого ПЭС в моделях: возраст менее 38,5 лет ($p < 0,05$); ИМТ менее 25 кг/м^2 ($p < 0,05$) и показатель микроциркуляции (М) до ЭМА — менее 9,55 пф. ед. ($p = 0,001$). Показатели микрокровотока в ОП свидетельствуют о том, что чем выше значения индекса потребления кислорода (I), внутрисосудистого сопротивления (Rc), резерва капиллярного кровотока (РКК) в моделях, тем выше риск развития тяжелой формы ПЭС ($p < 0,05$). Низкие показатели угла альфа в ОП ($p = 0,003$) и эндотелиальных колебаний UVLF ($p = 0,004$) в моделях также ведут к повышенному риску развития тяжелого ПЭС. Многомерные прогностические модели позволяют диагностировать развитие тяжелого ПЭС до проведения ЭМА и подготовить пациентку к определенному послеоперационному ведению и лечению.

Ключевые слова: миома матки, эмболизация маточных артерий, постэмболизационный синдром, лазерная доплеровская флоуметрия, прогностические критерии

Благодарности: к. б. н., доценту кафедры лазерных и биотехнических систем Самарского университета М. В. Комаровой за консультативную помощь в статистической обработке результатов исследования.

Вклад авторов: Э. Т. Нурмухаметова, М. Е. Шляпников — равнозначен на всех этапах работы и написания статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом медицинского университета «Реавиз» (протокол № 2 от 14 января 2019 г.). Все пациентки подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании и публикацию данных.

 **Для корреспонденции:** Эльмира Тимеровна Нурмухаметова
ул. Чкалова, д. 100, г. Самара, 443001; nurelm@yandex.ru

Статья получена: 31.12.2019 **Статья принята к печати:** 19.01.2020 **Опубликована онлайн:** 29.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.006

PROGNOSIS CRITERIA OF THE SEVERE POSTEMBOLIZATION SYNDROME IN PATIENTS WITH UTERINE MYOMA

Nurmukhametova ET , Shlyapnikov ME

REAVIZ Medical University, Samara, Russia

Recently specialists take an interest in organ-preserving methods of uterine fibroids treatment, one of which is uterine artery embolization (UAE). One of the method's negative aspects is the severe postembolization syndrome (PES) development, requiring timely initiation of adequate treatment in order to avoid severe complications that could lead to the organ removal. The study was aimed to search for the prognostic criteria of the severe PES development during the preoperative period. The study included 81 UAE-treated women aged 19–50 with 7–17 week uterine myoma. The patients' anthropometric measurements were used, as well as the skin microcirculation data obtained by laser Doppler flowmetry together with the occlusion test. Based on prognostic criteria, models with AUC (area under ROC curve) > 0.8 were presented. According to the models, the anthropometric predictors of the severe PES were the following: age under 38.5 ($p < 0.05$); BMI lower than 25 kg/m^2 ($p < 0.05$), and microcirculation value (M) prior to UAE below 9.55 PU ($p = 0.001$). Microvascular blood flow during the occlusion test indicate that the higher the oxygen consumption index (I), intravascular resistance (Rc), capillary blood flow reserve capacity in the models, the higher the risk of the severe PES development ($p < 0.05$). Low alpha angle value obtained by the occlusion test ($p = 0.003$) as well as the UVLF value ($p = 0.004$) in the models also indicate the increased risk of severe PES. Multidimensional prognostic modelling admits to expect the severe PES development prior to UAE, which allows the doctor to prepare the woman for specific management and treatment.

Keywords: uterine fibroids, uterine artery embolization, postembolization syndrome, laser Doppler flowmetry, prognostic criteria

Acknowledgements: to MV Komarova, PhD, Associate Professor of the Samara University Department of Laser and Biotechnological Systems, for assistance in the statistical processing of the results.

Author contribution: Nurmukhametova ET, Shlyapnikov ME — the authors contributed to the study and manuscript writing equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the REAVIZ Medical University (protocol № 2 dated January 14, 2019). All patients submitted the informed consent to participation in the study and data publishing.

 **Correspondence should be addressed:** Elmira T. Nurmukhametova
Chkalova, 100, Samara, 443001; nurelm@yandex.ru

Received: 31.12.2019 **Accepted:** 19.01.2020 **Published online:** 29.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.006

Миома матки занимает лидирующее положение в структуре гинекологических заболеваний, диагностируется у 20–50% женщин репродуктивного возраста [1], а также у 18–56% пациенток с нарушением фертильности [2]. Миома матки

ухудшает качество жизни женщин активного репродуктивного возраста, их беспокоят маточные кровотечения, хроническая анемия, боли внизу живота, сдавление соседних органов и ухудшение их функций в виде нарушения работы

мочевыделительной системы и желудочно-кишечного тракта. Основным методом лечения является удаление матки, с чем не всегда согласны пациентки и врачи [1]. В последние годы признание получают органосохраняющие методики [2]. Хирургические вмешательства, например миомэктомия лапароскопическим, лапаротомическим, влагалищным доступом, проводят под наркозом. Существует малоинвазивная эндоваскулярная методика без наркоза и разреза — эмболизация маточных артерий (ЭМА). Данный эндоваскулярный метод малоинвазивен, не требует наркоза, что привлекательно для пациенток и врачей. В результате эмболизации сосудов миомы матки нарушается питание узла, что приводит к его острой гипоксии и некрозу, ацидозу и всасыванию продуктов распада тканей в общий кровоток организма. В ответ на это у 96% пациенток в раннем послеоперационном периоде (8–36 ч) развивается разной степени тяжести постэмболизационный синдром (ПЭС) [3]. Тяжесть развившегося ПЭС оценивали по шкале Ю. Э. Доброхотовой и соавт. [3].

Лечение ПЭС легкой и средней степеней тяжести ограничено назначением ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных средств внутрь, госпитализацией на 1–3 дня. При развитии тяжелой степени ПЭС показаны наркотические анальгетики, инфузионная терапия с антибиотиками, коррекция свертывающей системы, при необходимости — катетеризация мочевого пузыря и другие методы. При тяжелом ПЭС возникает риск развития грозных осложнений в виде метроррагии, пиометры, септических и тромбоземболических осложнений, способных привести к органонуносящей операции [4–6]. В связи с этим актуальным остается вопрос о своевременном начале коррекционной терапии при тяжелом ПЭС, что будет способствовать более легкому течению, послужит профилактикой осложнений и создаст у пациентки благоприятное мнение о данном методе лечения. Были предложены методики снижения болевого синдрома в раннем послеоперационном периоде, так как он является ведущим симптомом. Во время проведения процедуры ЭМА перед введением эмболов предложено вводить 100 мг (2,5 мл) актовегина с целью увеличения паренхиматозного кровотока в матке, тем самым уменьшать проявления ПЭС [7]. Другие авторы рекомендуют точно рассчитывать минимальное количество порций эмболизата, что позволит снизить число осложнений, связанных с передозировкой частиц, а также стоимость процедуры за счет цены эмболов [8]. Снижает выраженность ПЭС применение венопротекторной терапии в послеоперационном периоде, особенно у больных с миомой матки, страдающих венозно-лимфатической недостаточностью нижних конечностей [9].

В нашем исследовании мы проанализировали анамнез пациенток, поступивших на ЭМА, и выявили, что статистически значимы такие факторы, влияющие на течение ПЭС, как возраст, ИМТ и расположение узлов. Последний служит качественной характеристикой, поэтому в прогностические модели были включены антропометрические данные (количественные). Среди методов обследования выделен метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) как впервые использовавшийся нами в остром периоде у пациенток с миомой матки до проведения ЭМА. В доступной литературе имеются данные об изучении кожной микроциркуляции у гинекологических больных при хронически развивающихся заболеваниях, при острых — мы не встретили [10]. Так как ПЭС — это реакция организма на процедуру ЭМА, он является системным ответом.

ЛДФ отражает изменения кожной микроциркуляции, что характеризует организм в целом [11]. Развитие именно тяжелого ПЭС сопряжено с риском развития осложнений и более выраженным влиянием на общее самочувствие пациенток, чем развитие легкого и среднего ПЭС. Целью работы было определить прогностические критерии развития тяжелого ПЭС по антропометрическим данным и особенностям кожной микроциркуляции перед процедурой ЭМА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С 2016 по 2019 г. в ЧУЗ КБ «РЖД-Медицина» г. Самара была обследована 81 пациентка 18–50 лет с симптомной растущей миомой матки от 7 до 17 недель, с размерами узлов от 21 до 115 мм. Средний возраст наблюдаемых составил 39 ± 6 лет.

Критерии включения пациенток в исследование: наличие прогрессирующей миомы матки; наличие клинической симптоматики в виде менометроррагий, тянущих болей внизу живота; наличие симптома сдавления соседних органов с проявлениями в виде учащенного мочеиспускания и запоров; отсутствие в анамнезе эффекта от консервативной терапии; желание женщины сохранить матку по различным причинам, среди которых психологический комфорт, возможные повторные репродуктивные планы, большой риск оперативных вмешательств, «страх» перед наркозом и операцией.

В связи с наличием показаний всем поступившим женщинам выполнено лечение методом ЭМА. В раннем послеоперационном периоде все исследуемые были распределены на три группы по степени тяжести развившегося ПЭС: легкой степени (I группа) — 36 (44,44%) пациенток, умеренной степени (II группа) — 30 (37,04%), выраженной степени (III группа) — 15 (18,52%). При выявлении множественной миомы оценивали доминантный узел. Миома матки с одиночным узлом размерами 30–110 мм была выявлена у 41 (50,6%) пациентки, у остальных 40 (49,4%) — множественная миома матки с размерами узлов от 21 до 115 мм, статистически значимых различий в группах не было ($p = 0,705$; $\chi^2 = 0,7$).

Критерии исключения из исследования по факторам, влияющим на проведение ЭМА: наличие воспалительных заболеваний малого таза; указание в анамнезе на прием агонистов гонадотропин-рилизинг-гормонов или гормональных препаратов (гормональная контрацепция или заместительная терапия) менее чем в течение последних трех месяцев перед исследованием; злокачественные заболевания малого таза; аденомиоз III степени; аллергическая реакция на контрастные вещества; отрицательный тест Аллена; наличие артериовенозного шунта для проведения гемодиализа; болезнь Бюргера.

Критерии исключения из исследования по факторам, влияющим на результаты ЛДФ: наличие заболевания сердечно-сосудистой системы и атеросклеротических изменений сосудов тяжелой степени; сахарный диабет; хроническая венозная недостаточность; болезнь Рейно; облитерирующий эндоартериит; наличие травм; деформации и инфекционные поражения ногтевых фаланг [11].

Пациенткам с субмукозными и субсерозными узлами (типы 0, 1, 6 и 7 по FIGO, 2011 г.) вместо ЭМА рекомендовали другие методы лечения: миомэктомия методом резектоскопии, лапароскопии, влагалищным доступом. Процедуру ЭМА выполняли через бедренную артерию (по методике Сельдингера) 63 пациенткам и через лучевую артерию 18 пациенткам с применением микросфер

«Embosphere» (Biosphere Medikal; США) размерами 500–1200 мкм. Выбор метода выполнения ЭМА, количество флаконов и размеров эмболов определял рентгенист после консультации пациентки и в ходе проведения диагностических и лечебных артериальных вмешательств.

Пациенток обследовали по общепринятым критериям: общеклиническое обследование, УЗИ малого таза с цветным доплеровским картированием, консультации гинеколога, терапевта и рентгениста, диагностическое выскабливание полости матки или аспирация эндометрия с гистологическим исследованием. В раннем послеоперационном периоде у пациенток развивается симптомокомплекс, называемый «постэмболизационным синдромом» (ПЭС), характеризующийся болями различной интенсивности; повышением температуры тела; увеличением СОЭ; развитием лейкоцитоза; нарушением работы сердечно-сосудистой (тахикардия), желудочно-кишечной (тошнота, рвота, парез кишечника), мочевыделительной (задержка мочеиспускания) систем; свертывающей системы (гиперфибриногенемия); появлением кровянистых выделений.

Оценку состояния системы микроциркуляции проводили до ЭМА методом ЛДФ с проведением окклюзионной пробы (ОП) как самой приближенной к процедуре ЭМА на аппарате ЛАКК-О2 («Лазма»; Россия). Исследование выполняли после акклиматизации, длящейся в течение 30 мин в помещении с температурой 21–24 °С. Перед исследованием пациенткам запрещали курение, прием пищи и напитков, влияющих на микроциркуляцию. Исследование проводили в одном и том же помещении в одно и то же время суток (обед с 12–13 ч; исследование с 15 до 17 ч), вне менструации. Пациентка находилась в положении сидя, верхняя конечность в легком сгибании размещена на столе, датчик устанавливали в области эпонихия 3-го пальца правой руки, при этом рука находилась на уровне сердца. При ОП манжету тонометра фиксировали на плече правой руки. Пробу проводили по следующей схеме: в течение одной минуты осуществляли регистрацию исходного уровня кровотока, запись останавливали. Затем создавали окклюзию путем быстрого нагнетания давления в манжете до уровня 230–250 мм рт. ст. и проводили дальнейшую регистрацию потока крови в течение 3 мин периода окклюзии. По истечении трехминутной окклюзии воздух из манжеты быстро выпускали, в течение последующих 6 мин регистрировали реакцию перфузии в ходе восстановления кровотока [11].

Данные, полученные при исследовании, обрабатывали с помощью программного обеспечения, входящего в комплект к используемому оборудованию. Оценивали

следующие показатели: M — среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции, измеряемое в перфузионных единицах (пф. ед.); σ — среднее квадратичное отклонение (СКО) амплитуды колебаний кровотока от среднего арифметического значения M ; с помощью вейвлет-преобразования показатели UULF, VLF, LF, HF, CF — колебания кровотока соответственно эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного, сердечного частотных диапазонов (пф. ед.); РКК — резерв капиллярного кровотока; угол α — угол подъема кривой реактивной гиперемии; I — индекс удельного потребления кислорода в ткани; R_s — внутрисосудистое сопротивление.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы SPSS 21 (IBM SPSS, США). Описательные статистики для количественных показателей представляли в виде среднего значения M и стандартного отклонения $M \pm \text{СКО}$, либо в случае скошенной формы распределения — в виде медиан и межквартильного размаха. Для сравнения групп применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) либо его непараметрический аналог — анализ Краскела–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением по критерию Манна–Уитни–Уилкоксона с поправкой Бонферрони. Для сравнения номинальных признаков применяли критерий χ^2 Пирсона. Для оценки вклада отдельных признаков в риск развития тяжелой формы ПЭС применяли одномерную и многомерную логистическую регрессию. Качество прогнозирования оценивали с помощью ROC-анализа. Статистически значимыми результаты считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статистически значимых различий в клинико-диагностическом анамнезе, жалобах, данных обследования, размерах миомы матки ($p_{\text{ANOVA}} = 0,607$), размерах доминантного узла ($p_{\text{ANOVA}} = 0,897$) в исследуемых группах до ЭМА не выявлено. По локализации и количеству миоматозных узлов имелись различия (табл. 1).

Установлено, что у женщин с исходно низким кожным микрокровоотком M (7,90 пф. ед.) и высокой вариабельностью перфузии СКО (3,35 пф. ед.) после эмболизации развивается тяжелая степень ПЭС (табл. 2). Амплитудно-частотный спектр колебаний кровотока в покое не имеет диагностического значения, а при проведении ОП эндотелиальные и нейрогенные составляющие (активные механизмы микроциркуляции, связанные с притоком крови) могут быть предикторами тяжелого ПЭС. В частности, UULF-колебания в ОП

Таблица. 1. Локализация и размеры доминантного узла в обследуемых группах

Классификация миомы матки по FIGO, 2011 г.	Степень ПЭС			Межгрупповые сравнения			Сравнение по таблице в целом, p
	Легкая ($n = 36$) Абс. (%)	Средняя ($n = 30$) Абс. (%)	Тяжелая ($n = 15$) Абс. (%)	p^{1-2}	p^{1-3}	p^{2-3}	
Интрамуральный узел, в полость матки до 50% (тип 2)	16 (44,4%)	8 (26,7%)	6 (40,0%)	0,216	0,985	0,569	0,020
Интрамуральная миома (тип 4)	16 (44,4%)	11 (36,7%)	1 (6,7%)	0,698	0,023	0,074	
Субсерозно-мышечная миома, до 50% в брюшную полость (тип 5)	3 (8,3%)	6 (20,0%)	6 (40,0%)	0,310	0,021	0,283	
Перешеечный узел (тип 8)	1 (2,8%)	5 (16,7%)	2 (13,3%)	0,127	0,420	0,885	
Количество узлов	1,53 \pm 1,02	2,15 \pm 1,50	2,62 \pm 1,75	0,349	0,010	0,624	0,042
Размеры доминантного узла до ЭМА, мм	58,32 \pm 17,30	55,60 \pm 22,10	54,76 \pm 17,70	0,963	0,843	0,998	0,791

Примечание: сравнение локализации миоматозных узлов выполнено по критерию χ^2 Пирсона ($\chi^2 = 15,1$), количества и размера узлов — с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

(эндотелиальные) в III группе исследуемых составили 1,76 пф. ед., что значительно ниже значений I группы (3,15 пф. ед.; $p_{1-3} < 0,001$) и II группы (2,76 пф. ед.; $p_{2-3} = 0,002$); и VLF-колебания в ОП (нейрогенные) в группе с тяжелым ПЭС ниже, чем в группах с легким ($p_{1-3} = 0,001$) и средним ($p_{2-3} = 0,006$) течением ПЭС.

Выявленные статистически значимые различия в антропометрических характеристиках (возраст, ИМТ), а также показателях кожного микрокровотока (М в покое, СКО в покое, РКК в ОП, угол α в ОП, UVLF в ОП, VLF в ОП, Rc в ОП) до вмешательства послужили основой для выявления наиболее существенных факторов риска и предикторов (см. табл. 2). Математическим инструментом для оценки степени влияния изучаемых протективных факторов на ПЭС была логистическая регрессия. Прогнозирование риска развития тяжелой формы ПЭС по сравнению с легкой или средней степенями тяжести осуществляли, не разделяя последние две категории. На первом этапе были построены одномерные модели для основных показателей кровотока методом принудительного включения предикторов (табл. 3).

В ходе проведенного исследования нам удалось выделить ряд прогностических критериев развития тяжелого течения ПЭС в раннем послеоперационном периоде после проведения ЭМА. Среди антропометрических признаков статистически значимыми факторами, влияющими на течение ПЭС, оказались возраст женщины и ИМТ. У обоих показателей отношения шансов меньше единицы: для возраста ОШ = 0,87 (0,79–0,96), а для ИМТ ОШ = 0,77

(0,63–0,94), что позволяет характеризовать их как протективные факторы. Согласно построенным математическим моделям, чем больше возраст и чем больше ИМТ пациентки, тем меньше у нее риск ПЭС. Для того чтобы выяснить, какие именно пороговые значения изучаемых признаков наилучшим образом прогнозируют развитие ПЭС, а также для количественной оценки предиктивных способностей каждого из изученных признаков были построены ROC-кривые (рис. 1), проанализированы их координаты и соответствующие значения чувствительности и специфичности. Установлено, что возраст женщины 38,5 лет и младше является фактором риска тяжелой ПЭС с чувствительностью 80% и специфичностью 71%. Следующим фактором риска развития тяжелого ПЭС является ИМТ. Согласно полученным данным, женщины с нормальной массой тела и с дефицитом массы тела оказываются в группе риска по тяжелому течению ПЭС. При пороговом значении ИМТ, равном 25 кг/м², чувствительность прогнозирования тяжелого ПЭС составила 80%, специфичность — 62%. Площадь под графиком характеристической кривой для возраста составила $0,76 \pm 0,068$ ($p = 0,002$), для ИМТ — $0,74 \pm 0,073$ ($p = 0,003$).

Из особенностей кровотока в покое высокоинформативным оказался показатель микроциркуляции М, площадь под ROC-кривой для которого составила $0,81 \pm 0,05$ ($p < 0,001$). Анализ координат ROC-кривой для М показал, что хорошей пороговой точкой является значение 9,55 пф. ед. У женщин с показателем перфузии в покое до

Таблица. 2. Антропометрические данные пациенток и параметры микроциркуляции в покое и при окклюзионной пробе до проведения ЭМА по группам ПЭС

	ПЭС легкая степень (до 7 баллов)	ПЭС средняя степень (8–14 баллов)	ПЭС тяжелая степень (15–21 балл)	p^{1-2}	p^{1-3}	p^{2-3}	p^{ANOVA}
Возраст, лет*	39,72 ± 6,47	42,10 ± 5,70	35,07 ± 5,74	0,310	0,048	0,002	0,002
ИМТ, кг/м ² *	26,24 ± 3,41	27,86 ± 6,39	23,34 ± 3,14	0,515	0,020	0,008	0,013
<i>Показатели микроциркуляции в покое без проб</i>							
М, пф. ед.	22,33 (12,98–24,03)	17,55 (10,38–19,15)	7,90 (5,40–15,60)	0,110	0,002	0,011	0,003
σ (СКО), пф. ед.	1,70 (1,40–3,68)	1,25 (1,10–1,40)	3,35 (1,50–3,98)	< 0,001	0,278	< 0,001	< 0,001
VLF, пф. ед.	0,98 (0,57–1,02)	0,58 (0,31–0,74)	0,62 (0,52–0,74)	< 0,001	0,005	0,268	< 0,001
LF, пф. ед.	0,54 (0,45–0,81)	0,42 (0,28–0,69)	0,42 (0,38–0,54)	0,037	0,054	0,791	0,053
HF, пф. ед.	0,17 (0,14–0,19)	0,16 (0,13–0,22)	0,16 (0,14–0,17)	0,583	0,448	0,837	0,729
CF, пф. ед.	0,15 (0,14–0,24)	0,22 (0,13–0,37)	0,17 (0,14–0,26)	0,017	0,279	0,242	0,047
I	9,45 (4,67–12,25)	10,93 (8,96–19,47)	3,88 (2,61–4,88)	0,017	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Rc	0,19 (0,10–0,27)	0,38 (0,24–0,47)	0,18 (0,08–0,21)	< 0,001	0,489	< 0,001	< 0,001
<i>Показатели кровотока в окклюзионной пробе</i>							
М, пф. ед.	15,00 (6,95–17,03)	12,55 (9,05–21,98)	14,80 (3,60–17,50)	0,567	0,166	0,097	0,220
δ (СКО)	11,40 (7,55–13,63)	10,25 (7,73–12,25)	8,30 (2,60–9,40)	0,463	0,042	0,089	0,097
РКК, %	166,21 (139,95–219,05)	136,31 (128,33–174,04)	220,09 (134,40–245,11)	0,008	0,414	0,013	0,008
Угол α	65,89 (54,19–69,27)	50,22 (48,35–65,73)	41,11 (34,92–48,22)	0,051	< 0,001	< 0,001	< 0,001
UVLF, пф. ед.	3,15 (2,63–3,72)	2,76 (2,29–3,74)	1,76 (1,21–2,65)	0,241	< 0,001	0,002	< 0,001
VLF	1,75 (1,46–2,61)	1,75 (1,23–2,41)	1,33 (0,81–1,64)	0,312	0,001	0,006	0,003
LF	0,78 (0,63–1,13)	0,95 (0,46–1,01)	1,00 (0,32–1,09)	0,279	0,282	0,981	0,432
HF	0,23 (0,13–0,32)	0,23 (0,17–0,32)	0,27 (0,12–0,44)	0,588	0,694	0,923	0,843
CF	0,15 (0,13–0,19)	0,16 (0,11–0,24)	0,16 (0,12–0,23)	0,380	0,413	0,904	0,592
I	5,90 (4,33–7,28)	7,77 (4,68–8,42)	4,68 (1,82–9,20)	0,039	0,942	0,253	0,125
Rc	0,04 (0,03–0,04)	0,04 (0,03–0,07)	0,06 (0,05–0,09)	0,124	< 0,001	0,004	< 0,001

Примечание: * — данные представлены в виде М ± СКО, в остальных случаях — в виде медианы и межквартильного размаха.

планируемого вмешательства ниже 9,55 пф. ед. можно ожидать тяжелую форму ПЭС с чувствительностью 73% и специфичностью 83%. Выделение отдельных колебаний в микроциркуляторном русле с помощью вейвлет-анализа в состоянии покоя без дополнительных проб прогностической ценности для диагностики тяжелого ПЭС не имело.

Проведение окклюзионной пробы, позволяющее моделировать ответ организма на острую гипоксию, показало высокий прогностический потенциал угла восстановления α (площадь под ROC-кривой $0,87 \pm 0,059$; $p < 0,001$) (рис. 1Г). Быстрое восстановление после трехминутной окклюзии уменьшает риск тяжелого ПЭС (ОШ = 0,85 (0,78–0,93); $p < 0,001$). Оптимальной пороговой точкой, на наш взгляд, является значение α , равное 48, при котором чувствительность и специфичность прогноза равны 80%.

На следующем этапе были разработаны многомерные прогностические модели логистической регрессии с помощью пошагового отбора потенциальных предикторов (табл. 4). Поскольку различные показатели кровотока получаются из обработки одного сигнала, а некоторые являются производным от первичных показателей, все они в той или иной степени взаимосвязаны. Поэтому предложено несколько моделей сопоставимого качества (рис. 2).

Модель 1 построена по антропометрическим данным. Качество прогнозирования при пороговой вероятности 0,25: чувствительность — 67%, специфичность — 88%. Оба признака имеют ОШ меньше единицы, следовательно,

их высокие значения являются протективными факторами; AUC — $0,81 \pm 0,058$ ($p < 0,001$).

Модель 2 построена по антропометрическим данным и по состоянию кровотока в покое. В результате пошагового отбора в нее были включены только возраст и М. Качество прогнозирования при пороговой вероятности 0,35: чувствительность — 73%, специфичность — 89%; AUC — $0,89 \pm 0,04$ ($p < 0,001$).

Модель 3 построена по антропометрическим данным и неспектральным показателям ОП (углу α и РКК). Угол α наиболее сильно влияет на исход признаков: его снижение ассоциировано с повышением риска тяжелой формы ПЭС. Качество прогнозирования при пороговой вероятности 0,25: чувствительность — 87%, специфичность — 91%; AUC — $0,93 \pm 0,042$ ($p < 0,001$).

Модель 4 близка по сути к модели 3. Для ее создания в качестве потенциальных предикторов использованы спектральные показатели ЛДФ в ОП по результатам вейвлет-анализа исходного сигнала. Согласно данной модели, наиболее существенным протективным фактором являются эндотелиальные колебания: их высокие значения снижают риск тяжелой формы ПЭС: ОШ — 0,09 (95% ДИ: 0,02–0,47), что хорошо согласуется с выявленным ранее аналогичным эффектом угла α , который также отражает интенсивность восстановления кровотока после ОП. Повышают риск тяжелого ПЭС высокие значения I и Rc. Качество прогнозирования при пороговой вероятности 0,25: чувствительность — 87%, специфичность — 98%; AUC — $0,94 \pm 0,056$ ($p < 0,001$).

Таблица 3. Оценка прогностических способностей антропометрических показателей и особенности микроциркуляции для прогнозирования тяжелого ПЭС по данным одномерных логистических регрессий

Предиктор в модели	ОШ (95% ДИ)	p
<i>Антропометрические показатели</i>	–	–
Возраст, лет	0,87 (0,79–0,96)	0,005
ИМТ, кг/м ²	0,77 (0,63–0,94)	0,010
<i>Показатели микроциркуляции в покое</i>	–	–
М, пф.ед.	0,83 (0,74–0,92)	0,001
СКО, δ	1,70 (1,09–2,64)	0,019
VLF	0,38 (0,05–3,20)	0,375
LF	0,23 (0,02–3,16)	0,271
HF (шаг 0,1)*	0,50 (0,15–1,63)	0,248
CF	0,15 (0,00–20,14)	0,452
I	0,58 (0,42–0,80)	0,001
Rc (шаг 0,1)*	0,58 (0,35–0,96)	0,033
<i>Показатели микроциркуляции в окклюзионной пробе</i>	–	–
М, пф. ед.	0,94 (0,86–1,03)	0,166
СКО, δ	0,82 (0,71–0,96)	0,014
РКК, %	1,02 (1,00–1,03)	0,008
Угол α	0,85 (0,78–0,93)	< 0,001
UVLF	0,23 (0,10–0,53)	0,001
VLF	0,14 (0,04–0,53)	0,004
LF	0,46 (0,07–3,18)	0,430
HF (шаг 0,1)*	1,41 (0,85–2,32)	0,179
CF	0,87 (0,00–183,07)	0,959
I	1,07 (0,91–1,26)	0,422
Rc** (шаг 0,01)	1,68 (1,27–2,21)	< 0,001

Примечание: * — отношение шансов рассчитано на увеличение данного предиктора на 0,1; ** — отношение шансов рассчитано на увеличение данного предиктора на 0,01.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам других авторов, ПЭС тяжелой степени развивается у 10,2% пациенток, перенесших ЭМА [3], по нашим данным — у 18,52%, что может быть связано с тем, что у нас было больше критериев исключения в связи с проведением ЛДФ, т. е. заболевания препятствующие (искажающие) исследованию микрокровотока в ногтевом ложе. Известно, что реакция на один и тот же раздражитель выражена у людей молодого возраста больше, чем у представителей старшего поколения [12], о чем, например, свидетельствует самооценка боли по шкале ВАШ. Возможно этим объясняется, что в группе с тяжелым течением ПЭС средний возраст пациенток был меньше ($35,07 \pm 5,74$ года), что отнесли к факторам риска ($p = 0,005$). ИМТ менее 25 кг/м^2 также являлся фактором риска развития тяжелого ПЭС. По данным нашего исследования, при избыточном весе микроциркуляция выше, что способствует более легкому течению ПЭС, а все системы организма работают в повышенном регуляторном и компенсаторном режиме, в связи с чем метаболическая нагрузка, возникающая после ЭМА, переносится легче [12]. По другим данным, у 2,8% пациенток с размером миомы матки до 12 недель и у 7,3% с миомой более 12 недель после ЭМА возникал стойкий парез кишечника с рвотой, что связывают с рефлекторным действием ишемизированных участков матки на близлежащие интимно расположенные органы или транзиторной ишемией кишечника в результате случайной частичной эмболизации верхней брыжеечной артерии [3]. В проведенном нами исследовании средние размеры доминантного узла были небольшими и статистически не различались в группах (см. табл. 1) в силу дизайна исследования, хотя по данным исследования размеры

узла коррелируют с выраженностью болевого синдрома [13]. Мы отметили, что расположение миоматозных узлов влияет на течение послеоперационного периода. Фактором риска развития стало преобладание субсерозно-мышечной локализации узлов в группе пациенток с тяжелым течением ПЭС, так как ишемизированные узлы раздражают петли кишечника, приводят к тошноте, вздутию живота и другим признакам желудочно-кишечных нарушений после ЭМА, тем самым утяжеляя течение ПЭС в раннем послеоперационном периоде (см. табл. 1). К увеличению количества и длительности кровянистых выделений (один из симптомов ПЭС) приводят миомы матки с субмукозно-интерстициальным расположением узлов, которые преобладали в III группе [14].

У женщин с показателем перфузии в покое до планируемого вмешательства ниже 9,55 пф. ед. чаще развивается тяжелая форма ПЭС. Более низким был показатель М у большинства женщин с тяжелой формой ПЭС в последующем по сравнению с легкой: 53,3% против 11,1% ($p = 0,004$) и 23,3% ($p = 0,094$). У других исследователей, аналогично нашим данным, низкий показатель М тоже стал фактором риска развития послеоперационных осложнений, в сравнении с группой с высоким М [15]. Этим можно объяснить тот факт, что у пациенток со сниженным М для сохранения нормальной функции микроциркуляции в условиях изменения метаболических потребностей организма при развитии тяжелой степени ПЭС происходит увеличение микроциркуляции и ее регуляции (для этого необходимо время). Можно предположить, что у пациенток с высоким М вероятность развития тяжелого ПЭС ниже, так как микроциркуляция во всем организме в целом уже хорошая и не требуется время для подключения механизмов регуляции для поддержания гомеостаза [12, 16]. Колебания кровотока UVLF, VLF, LF, HF, CF (табл. 3) прогностического

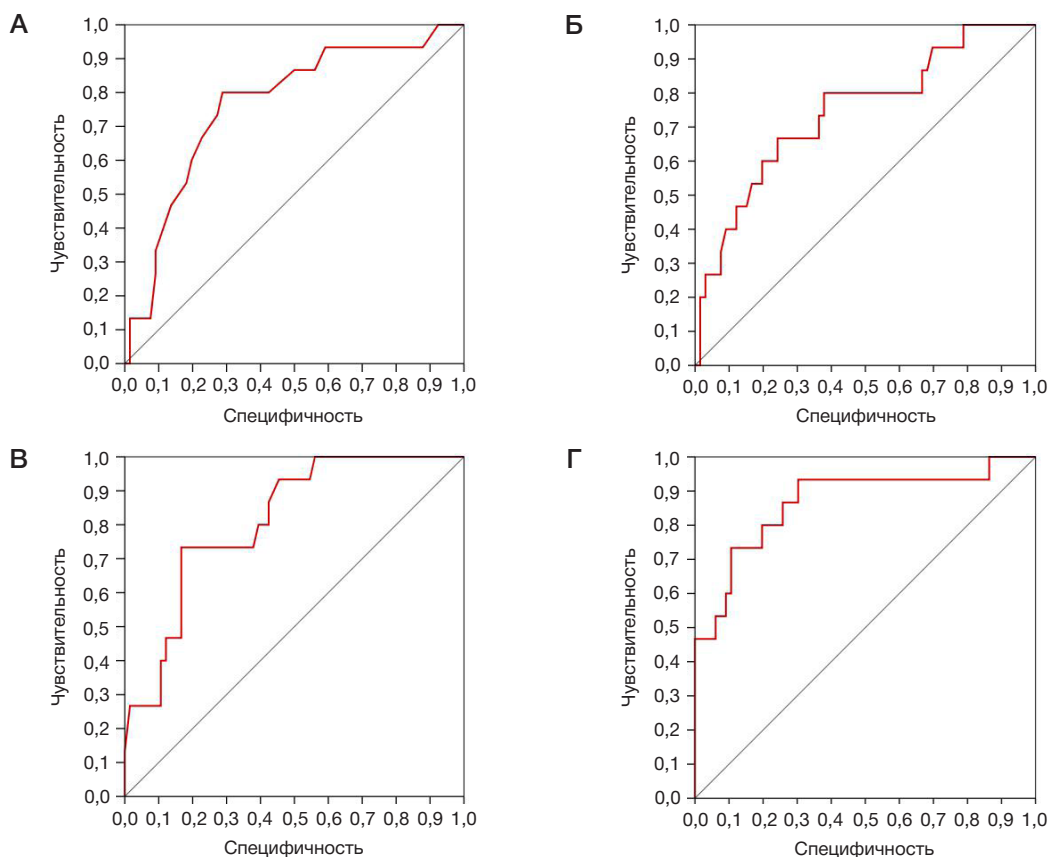


Рис. 1. ROC-кривые прогностической способности возраста (А) и ИМТ (Б), показателя перфузии в состоянии покоя (В), угла восстановления кровотока α (Г)

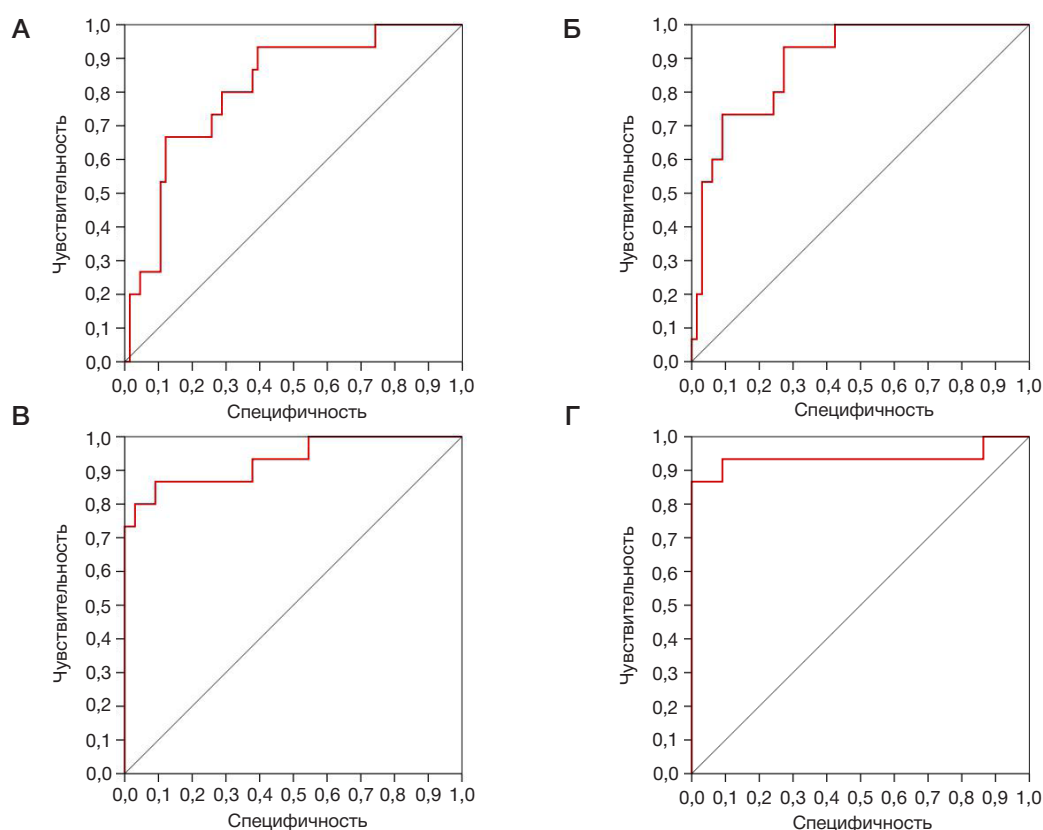


Рис. 2. ROC-кривые прогностической способности многомерных моделей 1 (А), 2 (Б), 3 (В), 4 (Г)

значения в покое не имели, при проведении ОП были выявлены изменения в эндотелиальных и нейрогенных колебаниях кровотока [17]. Так как ОП отражает интенсивность восстановления кровотока и резервные возможности микроциркуляторного русла, оцениваемые показатели обладают хорошей прогностической способностью. После трехминутного прекращения кровотока при декомпрессии кровотока в артерии

восстанавливается и развивается реактивная гиперемия (РКК, угол α , индекс потребления кислорода), которая через нейрогенную реакцию приводит к стимуляции выработки эндотелием оксида азота, вызывающего вазодилатацию [11, 16]. Медленное восстановление микрокровоотока является фактором риска развития тяжелого ПЭС. На основании полученных показателей были сформированы многомерные прогностические модели.

Таблица. 4. Оценка возможности использования антропометрических показателей и особенности микроциркуляции для прогнозирования тяжелого ПЭС по данным многомерных логистических регрессий

Переменные в модели	Коэффициент регрессии, b	SE b	Статистика Вальда	ОШ (95% ДИ)	p
Модель 1					
ИМТ, кг/м ²	-0,19	0,1	3,83	0,83 (0,69–1,00)	0,05
Возраст, лет	-0,11	0,05	4,44	0,89 (0,81–0,99)	0,035
Константа	7,49	2,68	7,82	–	0,005
Модель 2					
М в покое, канал ПМ	-0,23	0,07	11,04	0,80 (0,70–0,91)	0,001
Возраст, лет	-0,17	0,06	8,17	0,84 (0,75–0,95)	0,004
Константа	7,71	2,53	9,28	–	0,002
Модель 3					
Угол α в ОП	-0,19	0,06	9,02	0,82 (0,73–0,94)	0,003
РКК в ОП, %	0,03	0,01	5,62	1,03 (1,00–1,05)	0,018
Возраст, лет	-0,16	0,08	4,41	0,85 (0,74–0,99)	0,036
Константа	9,42	3,91	5,81	–	0,016
Модель 4					
UVLF в ОП, пф. ед.	-2,35	0,81	8,42	0,09 (0,02–0,47)	0,004
I в ОП	0,56	0,21	6,81	1,74 (1,15–2,64)	0,009
Rc в ОП*	62,64	23,22	7,28	1,87 (1,19–2,95)	0,007
Возраст, лет	-0,18	0,08	5,12	0,83 (0,71–0,98)	0,024
Константа	3,91	3,7	1,12	–	0,290

ВЫВОДЫ

В ходе исследования нам удалось сформировать четыре прогностические модели развития тяжелого ПЭС. В состав многомерных моделей входят факторы риска развития тяжелого ПЭС. Из антропометрических данных в модели включены возраст пациенток младше 38,5 лет и ИМТ ниже 25 кг/м². Из показателей микроциркуляции, полученных с помощью ЛДФ, необходимо обратить внимание на фоновый уровень микроциркуляции; при М в покое менее 9,55 пф. ед. высок риск развития тяжелого ПЭС. Модели 1 и 2 с антропометрическими характеристиками и фоновым уровнем М имеют AUC в пределах, равных 0,8–0,9, что

можно охарактеризовать как «очень хорошее». В модели 3 и 4 с AUC в пределах 0,9–1,0 («отличное») использованы показатели микроциркуляции при нагрузке (ОП) до ЭМА, которые имеют хорошую прогностическую ценность. Чем выше в моделях значения I в ОП, Rс в ОП и РКК в ОП, тем выше риск развития тяжелой формы ПЭС. И наоборот, низкие показатели угла α в ОП и эндотелиальных колебаний UVLF в моделях ассоциированы с повышенным риском тяжелого ПЭС. Применяя эти прогностические модели в практической работе, врач может провести консультацию о возможном течении ПЭС и запланировать схему лечения в более ранний период после ЭМА, тем самым облегчив самочувствие пациенток в послеоперационном периоде.

Литература

1. Адамян Л. В., Серов В. Н., Сухих Г. Т., Филиппов О. С., редакторы. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология. Проблемы репродукции. Спец. вып. 2017; 23 (6).
2. Шаповалова А. И. Лейомиома матки и репродукция. Журнал акушерства и женских болезней. 2019; 68 (1): 93–101. <https://doi.org/10.17816/JOWD68193-101>.
3. Доброхотова Ю. Э., редактор. Эмболизация маточных артерий. СПб: Экстен Медикал, 2013; 112 с.
4. Marín-Sánchez P, Sánchez-Ferrer ML. Conservative management of vesical-vaginal fistula after partial uterine and bladder necrosis due to embolization as a treatment for postpartum hemorrhage. Int Urogynecol J. 2015; 26 (5): 773–4. DOI: 10.1007/s00192-014-2617-1.
5. Pillai AK, Koor JM, Reis SP, et al. Exposure of a Uterine Fibroid into the Small Bowel through Uteroenteric Fistula Presenting with Bowel Obstruction after Uterine Fibroid Embolization: Case Report with Histopathological Correlation. J Vasc Interv Radiol. 2016; 27 (5): 762–4. DOI: 10.1016/j.jvir.2015.11.047.
6. Yu Q, Gabriel G, Hoffman M, Sanampudi S, Jassim T, Raissi D. Uterine-sparing management of pyomyoma after uterine fibroid embolization. Radiol Case Rep. 2019 Jun 12; 14 (8): 1031–5. DOI: 10.1016/j.radcr.2019.05.009
7. Горюнова Т. В., Агапов В. К., Цвиркун В. В., Голощапов-Аксенов Р. С., Скруберт В. С., Климов М. М., авторы; Горюнова Т. В., патентообладатель. Способ лечения миомы матки. Патент РФ №2289415, А61К35/14, 20.12.2006.
8. Пирогова В. И., Галанова З. М., Гарипов Р. М., Мухаметвалеева Г. Р., Галимов О. В., Бузаев И. В., и др., авторы; Башкирский государственный медицинский университет, патентообладатель. Способ профилактики послеоперационных осложнений эмболизации маточных артерий при миомах матки. Патент РФ №2364335, А61В5/1473, А61К49/12, 20.08.2009.
9. Юдина Т. А., Манухин И. Б., Тихомиров А. Л. Оптимизация постэмболизационного периода у больных миомой матки. Акушерство и гинекология. 2017; (12): 110–4. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.12.110-114>.
10. Дамиров М. М., Шахова О. Б., Саттарова З. И., Олейникова О. Н. Современные подходы к диагностике нарушений микроциркуляции в гинекологической практике (обзор литературы). Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2016; (1): 40–4.
11. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: рук-во для врачей. М.: Медицина, 2005; 126 с.
12. Пальцев М. А., Пауков В. С., редакторы. Патология в 2-х томах: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 1024 с.
13. Сосин С. А., Приворотский В. В., Зазерская И. Е., Кустаров В. Н. Прогностические признаки выраженности болевого синдрома после эмболизации маточных артерий у женщин с лейомиомой матки. Гинекология. 2017; 19 (5): 30–3. DOI: 10.26442/2079-5696_19.5.30-33.
14. Нурмухаметова Э. Т., Шляпников М. Е. Архитектоника миоматозных узлов у женщин, поступивших на лечение методом эмболизации маточных артерий. Вестник медицинского института «Реавиз»: Реабилитация, врач и здоровье. 2019; 2 (38): 48–54.
15. Мусин И. И., Фаткуллина И. Б., Газизова Г. Х., Попова Е. М., Молоканова А. Р. Применение лазерной доплеровской флоуметрии и биологической обратной связи с целью профилактики эрозий сетчатого протеза. Практическая медицина. 2019; 17 (4): 88–91. DOI: 10.32000/2072-1757-2019-4-88-91.
16. Козлов В. И., Азизов Г. А., Гурова О. А., Литвин Ф. Б. Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке состоянии и расстройств микроциркуляции крови. Методическое пособие РУДН. Москва. 2012, 32 с.
17. Нурмухаметова Э. Т., Шляпников М. Е. Диагностическая значимость оценки состояния периферического кровотока после эмболии маточных артерий. Практическая медицина. 2018; 16 (8): 106–10.

References

1. Adamyan LV, Serov VN, Sukhikh GT, Filippov OS, redactory. Klinicheskiye rekomendatsii. Akusherstvo i ginekologiya. Problemy reprodukcii. Spets vyp. 2017; 23 (6). Russian.
2. Shapovalova A. I. Lejomioma matki i reprodukcija. Zhurnal akusherstva i zhenskix boleznej. 2019; 68 (1): 93–101. <https://doi.org/10.17816/JOWD68193-101>. Russian.
3. Dobrohotova YuE, redaktor. Embolizaciya matocnyh arterij. Spb: Eksten Medikal, 2013; 112 s. Russian.
4. Marín-Sánchez P, Sánchez-Ferrer ML. Conservative management of vesical-vaginal fistula after partial uterine and bladder necrosis due to embolization as a treatment for postpartum hemorrhage. Int Urogynecol J. 2015; 26 (5): 773–4. DOI: 10.1007/s00192-014-2617-1.
5. Pillai AK, Koor JM, Reis SP, et al. Exposure of a Uterine Fibroid into the Small Bowel through Uteroenteric Fistula Presenting with Bowel Obstruction after Uterine Fibroid Embolization: Case Report with Histopathological Correlation. J Vasc Interv Radiol. 2016; 27 (5): 762–4. DOI: 10.1016/j.jvir.2015.11.047.
6. Yu Q, Gabriel G, Hoffman M, Sanampudi S, Jassim T, Raissi D. Uterine-sparing management of pyomyoma after uterine fibroid embolization. Radiol Case Rep. 2019 Jun 12; 14 (8): 1031–5. DOI: 10.1016/j.radcr.2019.05.009.
7. Goryunova TV, Agapov VK, Cvirkun VV, Goloshchapov-Aksenov RS, Skrubert VS, Klimov MM, avtory; Goryunova TV, patentoobladatel'. Sposob lecheniya miomy matki. Patent RF № 2289415, А61К35/14, 20.12.2006. Russian.
8. Pirogova VI, Galanova ZM, Garipov RM, Muhametvaleeva GR,

- Galimov OV, Buzaev IV, i dr, avtory; Bashkirskij gosudarstvennyj medicinskij universitet, petentoobladatel'. Sposob profilaktiki posleoperacionnyh oslozhnenij embolizacii matochnyh arterij pri miomah matki. Patent RF № 2364335, A61V5/1473, A61K49/12, 20.08.2009. Russian.
9. Yudina TA, Manuhin IB, Tihomirov AL. Optimizaciya postembolizacionnogo perioda u bol'nyh miomoy matki. Akusherstvo i ginekologiya. 2017; (12): 110–4. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.12.110-114>. Russian.
 10. Damirov MM, Shaxova OB, Sattarova ZI, Olejnikova ON. Sovremennye podxody k diagnostike narushenij mikrocirkulyacii v ginekologicheskoj praktike (obzor literatury). Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo «Neotlozhnaya medicinskaya pomoshh». 2016; (1): 40–4. Russian.
 11. Krupatkin AI, Sidorov VV. Lazernaya doplerovskaya floumetriya mikrocirkulyacii krovi: ruk-vo dlya vrachej. M.: Medicine, 2005; 126 s. Russian.
 12. Palcev MA, Paukov VS, redaktory. Patologiya v 2-h tomah: uchebnik. M.: GEOTAR-Media, 2010; 1024 s. Russian.
 13. Sosin SA, Privorotskij VV, Zazerskaya IE, Kustarov VN. Prognosticheskie pri-znaki vy`razhennosti bolevoogo sindroma posle e`mbolizacii matochny`x arterij u zhenshhin s lejomiomoy matki. Ginekologiya. 2017; 19 (5): 30–3. DOI: 10.26442/2079-5696_19.5.30-33. Russian.
 14. Nurmukhametova ET, Shlyapnikov ME. Arkhitektonika miomatoznykh uzlov u zhenshhin. postupivshikh na lecheniye metodom embolizatsii matochnykh arterij. Vestnik meditsinskogo instituta «Reaviz»: Reabilitatsiya, vrach i zdorovye. 2019; 2 (38): 48–54. Russian.
 15. Musin II, Fatkullina IB, Gazizova GH, Popova EM, Molokanova AR. Primenenie lazernoj doplerovskoj floumetrii i biologicheskoy obratn oj svyazi s cel'yu profilaktiki erozij setchatogo proteza. Prakticheskaya medicina. 2019; 17 (4): 88–91. DOI: 10.32000/2072-1757-2019-4-88-91. Russian.
 16. Kozlov VI, Azizov GA, Gurova OA, Litvin FB. Lazernaya doplerovskaya floumetriya v ocenke sostoyanii i rasstrojstv mikrocirkulyacii krovi. Metodicheskoe posobie RUDN. Moskva, 2012; 32 s. Russian.
 17. Nurmukhametova ET, Shlyapnikov ME. Diagnosticheskaya znachimost' ocenki sostoyaniya perifericheskogo krovotoka posle e`mbolii matochny`x arterij. Prakticheskaya medicina. 2018; 16 (8): 106–10. Russian.

СИНТЕЗ НОВОГО АМИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ И 1,3,4-ТИАДИАЗОЛА С ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А. С. Малыгин¹✉, М. А. Демидова¹, С. Я. Скачилова², Е. В. Шилова²

¹ Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

² Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ, Старая Купавна, Московская область, Россия

Вальпроаты являются основными препаратами для лечения эпилепсии различных форм. Среди проблем, возникающих при их клиническом использовании, — фармакорезистентность, нежелательные побочные реакции, а также проявления острой и хронической интоксикации. Путем модификации химической структуры вальпроевои кислоты возможно создание более эффективных и безопасных антиконвульсантов. Перспективно получение тиadiaзолиамидных производных вальпроатов, так как 1,3,4-тиадиазол может повышать биодоступность и снижать токсичность лекарственных средств. Целью работы был синтез нового амидного производного вальпроевои кислоты и 1,3,4-тиадиазола с противоэпилептической активностью. Химическую структуру синтезированного вальпроата исследовали методами ИК-спектроскопии, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектроскопии и элементного анализа. Чистоту и индивидуальность подтверждали методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографий. Противоэпилептическую активность оценивали в тесте антагонизма с изониазидом (250 мг/кг, интраперитонеально) у мышей методом пробит-анализа. В результате исследования был получен N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид (вальпрозоламид). ESI⁺-масс-спектр N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид — m/z 256,1 [M + H]⁺, MRM-переходы — m/z 256,1 — m/z 81,0 и m/z 130,1. Синтезированный вальпроат оказывал противоэпилептическое действие при изониазид-индуцированных судорогах у мышей. Значение ED₅₀ (интраперитонеально, мыши) в тесте антагонизма с изониазидом составило 126,8 мг/кг (95% ДИ: 65,5–245,4). Терапевтический индекс был равен 7,3.

Ключевые слова: противоэпилептические средства, вальпроевои кислота, 1,3,4-тиадиазол

Вклад авторов: А. С. Малыгин — экспериментальное исследование, анализ результатов, обзор публикаций по теме статьи, написание текста; М. А. Демидова — концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; С. Я. Скачилова, Е. В. Шилова — синтез и анализ соединения; все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Тверского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 26 марта 2018 г.). Подопытных животных содержали согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 «Правила надлежащей лабораторной практики»). Все эксперименты осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Directive 2010/63/EU).

✉ Для корреспонденции: Александр Сергеевич Малыгин
ул. Советская, д. 4, г. Тверь, 170100; dr.a.s.m@yandex.ru

Статья получена: 17.01.2020 Статья принята к печати: 03.02.2020 Опубликована онлайн: 09.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.007

SYNTHESIS OF A NOVEL AMIDE DERIVATIVE OF VALPROIC ACID AND 1,3,4-THIADIAZOLE WITH ANTIEPILEPTIC ACTIVITY

Malygin AS¹✉, Demidova MA¹, Skachilova SYa², Shilova EV²

¹ Tver State Medical University, Tver, Russia

² All-Russian Research Center for the Safety of Bioactive Substances, Staraya Kupavna, Moscow region, Russia

Valproates are commonly used to treat various forms of epilepsy. Problems accompanying their clinical application include drug resistance, adverse effects, acute and chronic toxicity. Safer anticonvulsants with improved efficacy can be obtained through the chemical modification of valproic acid structure. Thiadiazole-linked amide derivatives of valproates hold great promise because 1,3,4-thiadiazole can improve the drug's bioavailability and reduce its toxicity. The aim of this work was to synthesize a novel amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole exerting antiepileptic activity. The chemical structure of the synthesized valproate was studied by IR, proton NMR and ¹³C-NMR-spectroscopy, mass spectroscopy and elemental analysis. The purity and individuality of the compound was confirmed by thin-layer and high-performance liquid chromatography. Its antiepileptic activity was assessed in the test with intraperitoneally injected 250 mg/kg isoniazid and subsequent Probit analysis. The synthesized N-(5-ethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-propyl pentane amide (valprozolamide) had the following characteristics. ESI⁺MS: m/z 256.1 [M + H]⁺; MRM transitions: m/z 256.1 — m/z 81.0 and m/z 130.1. The valproate exerted antiepileptic activity against isoniazid-induced seizures in mice. In the test with isoniazid, ED₅₀ of intraperitoneally injected VPZ was 126.8 mg/kg (95% CI: 65.5–245.4). Its therapeutic index was 7.3.

Keywords: antiepileptic drugs, valproic acid, 1,3,4-thiadiazole

Author contribution: Malygin AS — laboratory tests; data analysis; literature analysis; manuscript preparation; Demidova MA — study concept and design; manuscript preparation; Skachilova SYa, Shilova EV — synthesis and analysis of the compound; All authors equally contributed to the discussion of the study results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Tver State Medical University (Protocol № 4 dated March 26, 2018). The animals were treated in compliance with the guidelines for laboratory practice in preclinical trials (Order 199n of the Russian Ministry of Healthcare dated April 1, 2016, on the *Good laboratory practice*). All tests were carried out in accordance with the guidelines for preclinical trials of medicinal drugs and in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 2010/63/EU).

✉ Correspondence should be addressed: Alexandr S. Malygin
Sovetskaya, 4, Tver, 170100; dr.a.s.m@yandex.ru

Received: 17.01.2020 Accepted: 03.02.2020 Published online: 09.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.007

Эпилепсией страдает более 75 млн людей по всему миру, и их число постоянно растет [1–2]. Ключевая проблема современной эпилептологии — фармакорезистентность, низкий процент больных эпилепсией (14,9%), достигающих стойкой ремиссии. У 48,1% происходят повторные приступы с частотой до 12 раз в год [3–4]. Половина больных эпилепсией получают несколько антиконвульсантов одновременно. Часть пациентов страдают от нерациональной замены препаратов, необоснованной политерапии, ухудшающей качество жизни, повышающей вероятность возникновения нежелательных лекарственных реакций. Остро стоит проблема приверженности лечению: 18,05% больных эпилепсией в России не получают лекарственной терапии [5]. Оптимизация фармакотерапии эпилепсии — важнейшая задача эпилептологии.

Среди многочисленных антиконвульсантов особое положение занимает вальпроевая кислота, которую синтезировал в 1882 г. Беверли С. Бертон и первоначально использовали в качестве растворителя. Противосудорожные свойства вальпроевой (2-пропилпентановой) кислоты случайно открыли в 1963 г. и с тех пор широко используют в клинической практике [6]. Вальпроаты являются противоэпилептическими средствами широкого спектра действия, в связи с чем их относят к препаратам первого выбора при эпилепсии различных форм. Долгосрочные исследования показали эффективность вальпроатов при всех формах генерализованных эпилепсий [7–9]. Существенная проблема в использовании вальпроатов — нежелательные побочные реакции, а также проявления острой и хронической интоксикации [10–12]. Из-за высокой тератогенности они не рекомендованы женщинам детородного возраста [13]. За счет химической модификации вальпроевой кислоты возможно получение более эффективных и безопасных препаратов с антиконвульсивной активностью [14].

Целью исследования было получить новый антиконвульсант из группы тиадiazолиламидных дериватов вальпроевой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и препараты

2-Амино-5-этил-1,3,4-тиадiazол (Acros Organics; Бельгия), 2-пропилпентановая кислота (Sigma Aldrich; США), пиридин («ЛенРеактив»; Россия), изониазид («Мосхимфармпрепараты им. Н. А. Семашко»; Россия), хлористоводородная кислота («ЛенРеактив»; Россия), пропанол-2 («ЛенРеактив»; Россия), ацетонитрил (LC-MS; Scharlau, Испания), ацетат аммония (Panreac AppliChem ITW reagents, США), этанол («Медхимпром»; Россия), вода деионизированная Milli-Q.

Оборудование

Масс-селективный квадрупольный детектор AB Sciex QTrap 3200 MD (Sciex; Сингапур), высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies; Германия), пластины для тонкослойной хроматографии (силикагель 60 F 254) (Merck; Германия), спектрометр Bruker Avance-400 (Bruker; Германия), ИК-спектрометр Agilent Cary 630 FTIR (Agilent; Германия), анализатор для элементного анализа EA 1108 (Carlo Erba Instruments; Италия), аналитические весы Acculab ALC-80d4 (Acculab; США), центрифуга с охлаждением ротора Eppendorf 5810R (Eppendorf; Германия), система получения

особо чистой воды Миллипор DirectQ UV (Millipore SAS; Франция), вортекс-встряхиватель Elmi V-3 (Elmi; Латвия), шейкер Elmi S-3 (Elmi; Латвия), термостат твердотельный «Термит» («ДНК-Технология»; Россия), автоматические дозаторы Eppendorf (Eppendorf; Германия) и Black Thermo («Термо Фишер Сайентифик»; Россия).

Методы идентификации

Химическую структуру синтезированного вальпроата (N-(5-этил-1,3,4-тиадiazол-2-ил)-2-пропилпентанамид) исследовали методами ИК-спектроскопии, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектроскопии и элементного анализа. Чистоту и индивидуальность подтверждали методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Экспериментальная оценка противоэпилептической активности

Противоэпилептическую активность синтезированного вальпроата оценивали в тесте антагонизма с изониазидом. Генерализованные клонико-тонические судороги индуцировали у мышей интраперитонеальным введением изониазида (ИЗН) в дозе 250 мг/кг [15]. Использовали аутбредных мышей-самцов SNK массой 19–21 г ($n = 40$). Животных содержали в условиях вивария Тверского ГМУ при постоянной температуре (22 ± 2 °C) и искусственном 12-часовом режиме дня и ночи (светлое время 08:00–20:00) со свободным доступом к воде и пище. Мыши были рандомизированы на пять групп: контрольную (изониазид-индуцированные судороги) и опытные группы (интраперитонеальное введение тестируемого препарата в дозах 75, 150, 300 и 450 мг/кг за 40 мин до изониазида). Видеонаблюдение за подопытными животными осуществляли в течение 3 ч, регистрируя латентный период первого судорожного приступа, появление клонических и тонических судорог, исходы (выживание или гибель). Рассчитывали значения ED_{50} (средней терапевтической дозы, обеспечивающей выживание 50% животных в тесте) и терапевтического индекса ($TI = DL_{50}/ED_{50}$ — отношение среднесмертельной дозы к средней терапевтической).

Статистические методы исследования

Статистический анализ проводили с использованием программы «BioStat, 2009» (AnalystSoft; США). Для обработки результатов исследования применяли методы описательной статистики. После проверки гипотезы о нормальном распределении данных с помощью W -критерия Шапиро–Уилка проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным сравнением (post-hoc тест множественного сравнения) с помощью критерия Тьюки HSD. Для статистического анализа относительных показателей использовали точный критерий Фишера. Данные представляли в виде $m \pm SEM$. Значение ED_{50} рассчитывали путем пробит-анализа методом Финни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема синтеза

Синтезированный тиадiazолиламидный дериват вальпроевой кислоты — N-(5-этил-1,3,4-тиадiazол-2-ил)-2-пропилпентанамид

(брутто формула $C_{12}H_{21}N_3OS$) с лабораторным наименованием вальпрозоламид (ВПЗ) представлен на рис. 1.

Синтез нового антиконвульсанта состоял из следующих этапов: галогенирование 2-пропилпентановой кислоты хлорангидридом сернистой кислоты; стехиометрическое взаимодействие полученного хлорангидрида 2-пропилпентановой кислоты с 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазолом; получение кристаллического осадка при подкислении реакционной массы HCl до pH = 1–2 при температуре 5 °С (рис. 2).

После синтеза осуществляли очистку полученного продукта. Поэтапная очистка включала: удаление водорастворимых примесей путем промывания охлажденной водой с повторной фильтрацией и перекристаллизацию с пропанолом-2 после предварительного высушивания в вакууме при 10 мм рт. ст. до постоянной массы (выход 67%). Эффективность очистки контролировали хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ).

Описание и идентификация N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида

Полученная активная фармацевтическая субстанция — белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок, молярная масса 255,14 г/моль, температура плавления 93–94 °С. Практически не растворим в воде, растворим в спирте, в ацетонитриле и других органических растворителях.

Химическую структуру N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида ($C_{12}H_{21}N_3OS$) подтверждали методом элементного анализа и с помощью спектральных характеристик. Расчетным путем для $C_{12}H_{21}N_3OS$ было определено содержание элементов: С — 56,44%; Н — 8,29%; N — 16,45%; O — 6,26%; S — 12,56%. Элементный анализ показал содержание С — 56,39%; Н — 8,34%; N — 16,41%; O — 6,26%; S — 12,60%, что соответствовало химической структуре синтезированного соединения.

Результаты спектроскопии: ИК-спектры (при таблетировании с KBr), $\nu/\text{см}^{-1}$: 3302, 3030 (NH), 2981, 2959, 2860 (CH), 1545 (NHCO); ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm: 0,97 (s, 3H, CH_3), 1,33 (s, 2H, CH_2), 1,41–1,50 (m, 4H), 2,65 (s, 2H, CH_2), 10,63 (s, 1H, NH); ^{13}C -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm: 13,48, 13,66, 20,06, 24,70, 35,27, 43,22, 155,85, 156,5, 175,00; ESI⁺-масс-спектр — m/z 256,1 ($[\text{M} + \text{H}]^+$),

значения MRM-переходов — m/z 256,1 \rightarrow m/z 81,1 и m/z 130,1. ESI⁺-масс-спектр N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида представлен на рис. 3.

Индивидуальность синтезированного антиконвульсанта оценивали с помощью ВЭЖХ. Хроматографию проводили с использованием колонки Phenomenex synergi Fusion 4 мкм-С18 2 × 50 мм, при температуре 50 °С. Элюирование осуществляли метанолом с водой деионизированной в соотношении 90 : 10 и с добавлением 0,1%-го аммония ацетата. Время удерживания составило 1,31 мин (рис. 4).

Оценка противосудорожной активности на модели изониазид-индуцированных судорог у мышей

При интраперитонеальном введении изониазида (250 мг/кг) генерализованные клонико-тонические судороги со смертельным исходом развивались у всех подопытных мышей группы контроля. Предварительное введение ВПЗ за 40 мин до изониазида оказывало дозозависимое влияние на течение изониазид-индуцированных судорог у мышей ($p < 0,0001$; однофакторный дисперсионный анализ ANOVA). ВПЗ в дозе 75 мг/кг статистически значимо увеличивал продолжительность латентного периода первого судорожного приступа в среднем в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, однако не предупреждал развития судорог и гибели подопытных животных. При использовании ВПЗ в дозах 150 мг/кг и 300 мг/кг наряду с увеличением латентного периода первого судорожного приступа отмечено уменьшение числа смертельных исходов. В серии опытов с использованием ВПЗ в дозе 450 мг/кг развития судорожного синдрома в течение 3 ч после введения изониазида зарегистрировано не было (см. табл.).

По результатам пробит-анализа значение ED_{50} при интраперитонеальном введении ВПЗ в тесте антагонизма с изониазидом составило 126,8 мг/кг (95% ДИ: 65,5–245,4). Терапевтический индекс был равен 7,3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные критерии для поиска новых антиконвульсантов — эффективность при фармакорезистентной эпилепсии, меньшее количество побочных эффектов, лучшая переносимость, а также способность замедлять прогрессирование и модифицировать течение

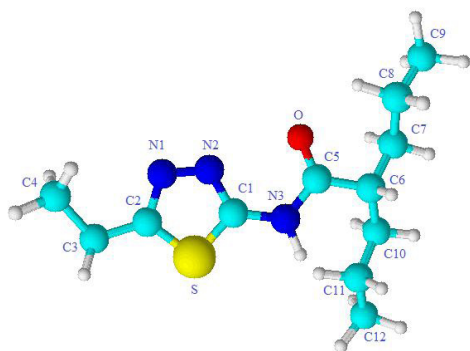


Рис. 1. N-(5-Этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид

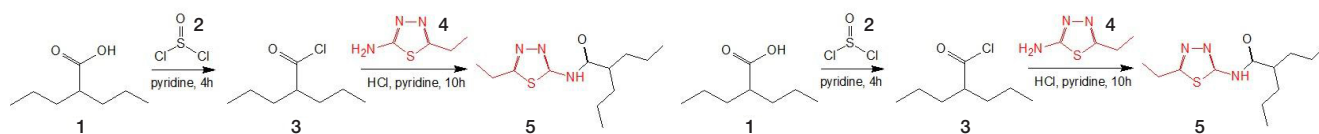


Рис. 2. Схема синтеза N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида. 1 — 2-пропилпентановая кислота; 2 — хлорангидрид сернистой кислоты; 3 — хлорангидрид 2-пропилпентановой кислоты; 4 — 2-амино-5-этил-1,3,4-тиадиазол; 5 — N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид

эпилепсии; дополнительные преимущества — линейность фармакокинетики, легкость титрации при клиническом использовании, наличие дополнительных терапевтических эффектов, в том числе обезболивающего при невропатической боли. Поиск таких препаратов осуществляют как среди новых молекул, так и путем создания новых производных известных антиконвульсантов.

В литературе показана возможность создания новой генерации вальпроатов [16]. Отмечено, что тератогенность амидных аналогов существенно ниже, чем у самой вальпроевой кислоты [17]. Среди амидов вальпроевой кислоты выявлены эффективные противоэпилептические [18], антиневропатические [19–20], противовирусные [21–22] и другие средства. Антиконвульсивная активность обнаружена также у ряда производных 1,3,4-тиадиазола, в том числе содержащих остаток вальпроевой кислоты [23]. Большинство тиadiaзоловых производных отличалось от аналогов более высокой биодоступностью и меньшей токсичностью. Подобная закономерность отмечена и в отношении синтезированного вальпроата, содержащего в своей структуре 1,3,4-тиадиазолил. Показано, что значение полураспада дозы 1,3,4-тиадиазолиламидного

derivata вальпроевой кислоты (внутрибрюшинно, мыши) в среднем в 1,8 раза больше, чем у вальпроевой кислоты [24]. Наличие противоэпилептического эффекта у синтезированного вальпроата подтверждено на моделях максимального электрошока и пентилентетразоловых судорог у мышей [25–26]. Учитывая, что наибольшую активность ВПЗ проявил в тесте с антагонистом ГАМК-рецепторов пентилентетразолом, в настоящем исследовании оценивали его влияние на судороги, индуцированные другим антагонистом ГАМК — гидразидом изоникотиновой кислоты изониазидом. Проконвульсивный эффект изониазида связан с угнетением синтеза ГАМК за счет антагонизма с пиридоксальфосфатом, являющимся коферментом глутаматдекарбоксилазы, которая катализирует превращение глутамата в ГАМК. Судорожный синдром, нередко описываемый как эпилептический статус, представляет собой серьезное осложнение при лечении туберкулеза гидрамидами изоникотиновой кислоты. Изониазид-индуцированные судороги плохо поддаются лечению обычными антиконвульсантами и не всегда могут быть предупреждены пиридоксином [27–28]. Известно, что вальпроаты могут дозозависимо угнетать развитие судорог, вызванных изониазидом

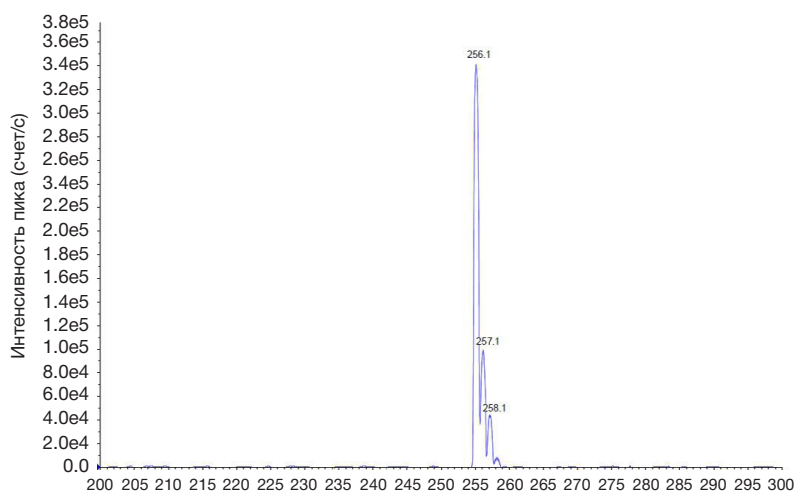


Рис. 3. ESI⁺-масс-спектр N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида ($[M + H]^+$)

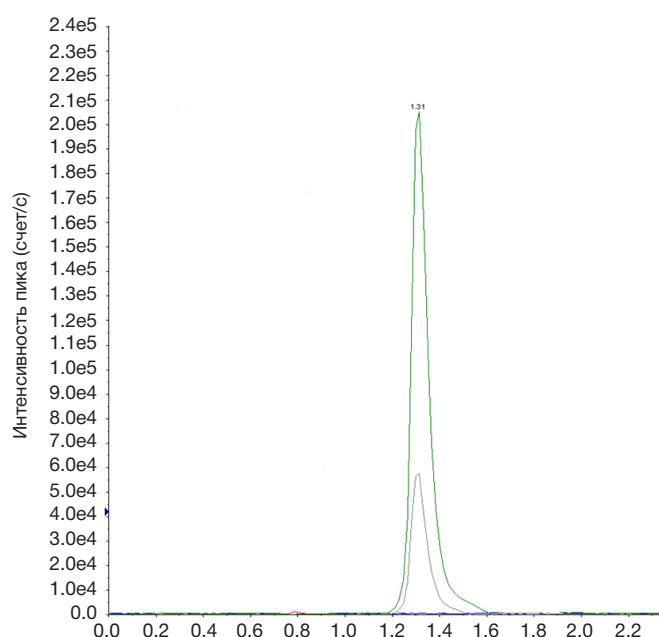


Рис. 4. Хроматограмма N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида

Таблица. Влияние N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида (ВПЗ) на продолжительность латентного периода первого судорожного приступа и выживаемость мышей в тесте антагонизма с изониазидом (250 мг/кг, интраперитонеально)

Серия опытов	Доза, мг/кг	ЛП1, мин <i>m</i> ± SEM	Число выживших/всего мышей	Выживаемость, %
ИР NaCl + ИЗН	–	31,25 ± 2,03	0/8	0
ВПЗ + ИЗН	75	47,75 ± 2,42*	0/8	0
ВПЗ + ИЗН	150	72,13 ± 4,28*	5/8	62,5*
ВПЗ + ИЗН	300	93,75 ± 4,77*	7/8	87,5*
ВПЗ + ИЗН	450	–	8/8	100*

Примечание: * — различия с контролем (изониазид-индуцированные судороги у мышей, получавших ИР NaCl) статистически значимы ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc тестом множественного сравнения Тьюки); # — различия с контролем статистически значимы ($p < 0,05$; точный критерий Фишера). ВПЗ — вальпрозоламид (N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид); ИЗН — изониазид; ИР NaCl — изотонический раствор натрия хлорида; ЛП1 — продолжительность латентного периода первого судорожного приступа.

[29]. В настоящем исследовании показано, что предварительное введение N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида увеличивало латентный период судорог и уменьшало гибель мышей в тесте антагонизма с изониазидом. На основании этих сведений N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид можно отнести к потенциальным противозепептическим средствам с улучшенным профилем безопасности.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования подтверждают перспективность поиска новых антиконвульсантов путем модификации

вальпроевой кислоты за счет введения в ее химическую структуру 1,3,4-тиадиазола. Преимущество синтезированного N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида в способности предупреждать развитие изониазид-индуцированных судорог, недостаток — нерастворимость в воде, что затрудняет получение инъекционных лекарственных форм. В дальнейшем для улучшения его биофармацевтических свойств предполагается получение нанокапсулированной формы с β -циклодекстрином. Методики идентификации N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамида могут быть использованы для определения его подлинности и проведения фармакокинетических исследований.

Литература

- Singh A, Trevick S. The epidemiology of global epilepsy. *Neurol Clin.* 2016 Nov; 34 (4): 837–47. PubMed PMID: 27719996.
- Авакян Г. Н. Вопросы современной эпилептологии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2015; (4): 16–21.
- Авакян Г. Н., Белоусова Е. Д., Бурд С. Г., Власов П. Н., Ермоленко Н. А., Киссин М. Я. и др. Проблемы эпилептологии. Ключевые приоритеты, задачи, вызовы и способы их решения. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2019; 11 (4): 395–406.
- Kalilani L, Sun X, Pelgrims B, Noack-Rink V, Villanueva V. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia.* 2018; 59 (12): 2179–93. PubMed PMID: 30426482.
- Авакян Г. Н., Власов П. Н., Жидкова И. А., Карлов В. А., Лебедева А. В., Михаловска-Карлова Е. П. и др. Заключение Совета экспертов по применению вальпроатов у пациентов с эпилепсией. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. Эпилепсия. 2015; (1): 63–64.
- Tomson T, Battino D, Perucca E. The remarkable story of valproic acid. *Lancet Neurol.* 2016 Feb; 15 (2): 141. PubMed PMID: 28463122.
- Воронкова К. В., Никитин А. Э., Рудакова И. Г., Власов П. Н., Бурд С. Г., Лебедева А. В. и др. Современный выбор антиэпилептической терапии: этапы и рекомендации. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2018; 10 (2): 74–81.
- Мухин К. Ю., Петрухин А. С., Миронов М. Б. Вальпроат натрия (Депакин) в достижении ремиссии у больных идиопатической генерализованной эпилепсией (долгосрочный катамнез). Неврологический журнал. 2004; (4): 34–39.
- Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs.* 2012; 16 (10): 695–714.
- Бадалян О. Л., Бурд С. Г., Савенков А. А., Авакян Г. Г., Юцкова Е. В., Авакян Г. Н. Сравнительная оценка эффективности и безопасности производных вальпроевой кислоты: опыт применения. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2014; 6 (2): 39–44.
- Шнайдер Н. А., Дмитренко Д. В. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2016; 8 (2): 94–99.
- Sztajnkrzyer MD. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40 (6): 789–801. PubMed PMID: 12475192.
- Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol.* 2016 Feb; 15 (2): 210–8. PubMed PMID: 26655849.
- Pessah N, Yagen B, Hen N, Shimshoni JA, Wlodarczyk B, Finnell RH, Bialer M. Design and pharmacological activity of glycinamide and N-methoxy amide derivatives of analogs and constitutional isomers of valproic acid. *Epilepsy Behav.* 2011 Nov; 22 (3): 461–8. PubMed PMID: 21959082.
- Sun XY, Wei CX, Deng XQ, Sun ZG, Quan ZS. Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a] phthalazine in various experimental seizure models in mice. *Pharmacological Reports: PR.* 01 Mar 2010, 62 (2): 273–7. PubMed PMID: 20508282.
- Trojan MK, Wierzchowska-Cioch E, Krzyzanowski M, Jargiełło M, Czuczwar SJ. New generation of valproic acid. *Pol J Pharmacol.* 2004 May–Jun; 56 (3): 283–8. PubMed PMID: 15215557.
- Lin YL, Bialer M, Cabrera RM, Finnell RH, Wlodarczyk BJ. Teratogenicity of valproic acid and its constitutional isomer, amide derivative valnoctamide in mice. *Birth Defects Res.* 2019 Aug 15; 111 (14): 1013–23. PubMed PMID: 30325584.
- Haines KM, Matson LM, Dunn EN1, Ardinger CE, Lee-Stubbs R, Bibi D, McDonough JH, Bialer M. Comparative efficacy of valnoctamide and sec-butylpropylacetamide (SPD) in terminating nerve agent-induced seizures in pediatric rats. *Epilepsia.* 2019 Feb; 60 (2): 315–21. PMID: 30615805.
- Kaufmann D, Bialer M, Shimshoni JA, Devor M, Yagen B. Synthesis and evaluation of antiallodynic and anticonvulsant activity of

- novel amide and urea derivatives of valproic acid analogues. *J Med Chem*. 2009 Nov 26; 52 (22): 7236–48. PubMed PMID: 19877649.
20. Samur DN, Arslan R, Aydın S, Bektas N. Valnoctamide: The effect on relieving of neuropathic pain and possible mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2018 May 15; (827): 208–14. PubMed PMID: 29522726.
 21. Praena B, Bello-Morales R, de Castro F, López-Guerrero JA. Amidic derivatives of valproic acid, valpromide and valnoctamide, inhibit HSV-1 infection in oligodendrocytes. *Antiviral Res*. 2019 Aug; (168): 91–99. PubMed PMID: 31132386.
 22. Ornaghi S, Hsieh LS, Bordey A, Vergani P, Paidas MJ, van den Pol AN. Valnoctamide Inhibits Cytomegalovirus Infection in Developing Brain and Attenuates Neurobehavioral Dysfunctions and Brain Abnormalities. *J Neurosci*. 2017 Jul 19; 37 (29): 6877–93. PubMed PMID: 28630251.
 23. Jain AK, Sharma S, Vaidya A, Ravichandran V, Agrawal RK. 1,3,4-Thiadiazole and its Derivatives: A Review on Recent Progress in Biological Activities. *Chem Biol Drug Des*. 2013; (81): 557–76. PubMed PMID: 23452185.
 24. Малыгин А. С. Оценка острой токсичности и нейротоксичности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола. *Медицина*. 2019; (3): 37–46.
 25. Малыгин А. С. Исследование противозепилептической активности нового амидного производного вальпроевой кислоты и 1,3,4-тиадиазола. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2019; 11 (4): 357–63.
 26. Скачилова С. Я., Малыгин А. С., Попов Н. С., Демидова М. А., авторы; Владелец патента: «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ». N-(5-этил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-пропилпентанамид, обладающий противозепилептической и обезболивающей активностями. Патент РФ № 2 672 887. 13.03. 2018.
 27. Asehinde S, Ajayi A, Bakre A, Omorogbe O, Adebesein A, Umukoro S. Effects of Jobelyn® on Isoniazid-Induced Seizures, Biomarkers of Oxidative Stress and Glutamate Decarboxylase Activity in Mice Basic Clin Neurosci. 2018 Nov–Dec; 9 (6): 389–96. PMID: 30719253.
 28. Minns AB, Ghafouri N, Clark RF. Isoniazid-induced status epilepticus in a pediatric patient after inadequate pyridoxine therapy. *Pediatr Emerg Care*. 2010 May; 26 (5): 380–1. PubMed PMID: 20453796.
 29. Bernasconi R, Klein M, Martin P, Portet C, Maître L, Jones RS et al. The specific protective effect of diazepam and valproate against isoniazid-induced seizures is not correlated with increased GABA levels. *J Neural Transm*. 1985; 63 (2): 169–89. PubMed PMID: 3930661.

References

1. Singh A, Trevick S. The epidemiology of global epilepsy. *Neurol Clin*. 2016 Nov; 34 (4): 837–47. PubMed PMID: 27719996.
2. Avakyan GN. Questions modern epileptology. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2015; 7 (4): 16–21. Russian.
3. Avakyan GN, Belousova ED, Burd SG, Vlasov PN, Ermolenko NA, Kissin MY, et al. Current trends in epileptology: priorities, challenges, tasks and solutions. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2019; 11 (4): 395–406. Russian.
4. Kalliani L, Sun X, Pelgrims B, Noack-Rink V, Villanueva V. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*. 2018; 59 (12): 2179–93. PubMed PMID: 30426482.
5. Avakyan GN, Vlasov PN, Zhidkova IA, Karlov VA, Lebedeva AV, Mikhaylovskaya-Karlova EP, et al. Conclusion of the Council of Experts on the use of valproate in patients with epilepsy. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2015; 7 (1): 69. Russian.
6. Tomson T, Battino D, Perucca E. The remarkable story of valproic acid. *Lancet Neurol*. 2016 Feb; 15 (2): 141. PubMed PMID: 28463122.
7. Voronkova KV, Nikitin AE, Rudakova IG, Vlasov PN, Burd SG, Lebedeva AV, et al. Today's choice of antiepileptic therapy: stages and recommendations. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2018; 10 (2): 74–81. Russian.
8. Mukhin KYu, Petrukhin AS, Mironov MB. Sodium valproate (Depakine) in achieving remission in patients with idiopathic generalized epilepsy (long-term follow-up). *Neurological journal*. 2004; (4): 34–39. Russian.
9. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs*. 2012; 16 (10): 695–714.
10. Badalyan OL, Burd SG, Savenkov AA, Avakyan GG, Yutskova EV, Avakyan GN. Comparative evaluation of the efficacy and safety of valproic acid derivatives. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2014; 6 (2): 39–44. Russian.
11. Schneider NA, Dmitrenko DV. Chronic intoxication with valproic acid in epileptology: diagnosis and treatment. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2016; 8 (2): 94–99. Russian.
12. Sztajnkrycer MD. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002; 40 (6): 789–801. PubMed PMID: 12475192.
13. Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol*. 2016 Feb; 15 (2): 210–8. PubMed PMID: 26655849.
14. Pessah N, Yagen B, Hen N, Shimshoni JA, Wlodarczyk B, Finnell RH, Bialer M. Design and pharmacological activity of glycnamide and N-methoxy amide derivatives of analogs and constitutional isomers of valproic acid. *Epilepsy Behav*. 2011 Nov; 22 (3): 461–8. PubMed PMID: 21959082.
15. Sun XY, Wei CX, Deng XQ, Sun ZG, Quan ZS. Evaluation of the anticonvulsant activity of 6-(4-chlorophenoxy)-tetrazolo[5,1-a] phthalazine in various experimental seizure models in mice. *Pharmacological Reports: PR*, 01 Mar 2010, 62 (2): 273–7. PubMed PMID: 20508282.
16. Trojnar MK, Wierchowaska-Cioch E, Krzyzanowski M, Jargiełło M, Czuczwar SJ. New generation of valproic acid. *Pol J Pharmacol*. 2004 May–Jun; 56 (3): 283–8. PubMed PMID: 15215557.
17. Lin YL, Bialer M, Cabrera RM, Finnell RH, Wlodarczyk BJ. Teratogenicity of valproic acid and its constitutional isomer, amide derivative valnoctamide in mice. *Birth Defects Res*. 2019 Aug 15; 111 (14): 1013–23. PubMed PMID: 30325584.
18. Haines KM, Matson LM, Dunn EN, Ardinger CE, Lee-Stubbs R, Bibi D, McDonough JH, Bialer M. Comparative efficacy of valnoctamide and sec-butylpropylacetamide (SPD) in terminating nerve agent-induced seizures in pediatric rats. *Epilepsia*. 2019 Feb; 60 (2): 315–21. PMID: 30615805.
19. Kaufmann D, Bialer M, Shimshoni JA, Devor M, Yagen B. Synthesis and evaluation of antiallosteric and anticonvulsant activity of novel amide and urea derivatives of valproic acid analogues. *J Med Chem*. 2009 Nov 26; 52 (22): 7236–48. PubMed PMID: 19877649.
20. Samur DN, Arslan R, Aydın S, Bektas N. Valnoctamide: The effect on relieving of neuropathic pain and possible mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2018 May 15; (827): 208–14. PubMed PMID: 29522726.
21. Praena B, Bello-Morales R, de Castro F, López-Guerrero JA. Amidic derivatives of valproic acid, valpromide and valnoctamide, inhibit HSV-1 infection in oligodendrocytes. *Antiviral Res*. 2019 Aug; (168): 91–99. PubMed PMID: 31132386.
22. Ornaghi S, Hsieh LS, Bordey A, Vergani P, Paidas MJ, van den Pol AN. Valnoctamide Inhibits Cytomegalovirus Infection in Developing Brain and Attenuates Neurobehavioral Dysfunctions and Brain Abnormalities. *J Neurosci*. 2017 Jul 19; 37 (29): 6877–93. PubMed PMID: 28630251.
23. Jain AK, Sharma S, Vaidya A, Ravichandran V, Agrawal RK. 1,3,4-Thiadiazole and its Derivatives: A Review on Recent Progress in Biological Activities. *Chem Biol Drug Des*. 2013; (81): 557–76. PubMed PMID: 23452185.
24. Malygin AS. Assessment of acute toxicity and neurotoxicity of a

- new amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole. The medicine. 2019 (3): 37–46. Russian.
25. Malygin AS. Study on the antiepileptic activity of the new amide derivative of valproic acid and 1,3,4-thiadiazole. Epilepsy and paroxysmal conditions. 2019; 11 (4): 357–63. Russian.
 26. Skachilova SYa, Malygin AS, Popov NS, Demidova MA, avtory; Vladelets patenta: «Vsesoyuznyy nauchnyy tsentr po bezopasnosti biologicheskii aktivnykh veshchestv». N-(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-propilpentanamid, obladayushchiy protivoepilepticheskoy i obezbolivayushchey aktivnostyami. Patent RU № 2 672 887. 13.03. 2018. Russian.
 27. Bernasconi R, Klein M, Martin P, Portet C, Maître L, Jones RS, et al. The specific protective effect of diazepam and valproate against isoniazid-induced seizures is not correlated with increased GABA levels. J Neural Transm. 1985; 63 (2): 169–89. PubMed PMID: 3930661.
 28. Asehinde S, Ajayi A, Bakre A, Omorogbe O, Adebesin A, Umukoro S. Effects of Jobelyn® on Isoniazid-Induced Seizures, Biomarkers of Oxidative Stress and Glutamate Decarboxylase Activity in Mice Basic Clin Neurosci. 2018 Nov-Dec; 9 (6): 389–96. PMID: 30719253.
 29. Minns AB, Ghafouri N, Clark RF. Isoniazid-induced status epilepticus in a pediatric patient after inadequate pyridoxine therapy. Pediatr Emerg Care. 2010 May; 26 (5): 380–1. PubMed PMID: 20453796.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПУТЕЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ НА УРОВНЕ ПЕРВИЧНОГО ЗВЕНА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

А. Г. Бочкова¹✉, А. С. Доможирова², И. А. Аксенова^{1,3}¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия² Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия³ Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины, Челябинск, Россия

В России более 10 лет в рамках национальных проектов проводят мероприятия, направленные на преобразование первичной и специализированной, в том числе высокотехнологичной медицинской помощи, усиление роли первичного медико-санитарного звена в целях раннего выявления злокачественных новообразований (ЗНО). Целью исследования было оценить результативность работы женских смотровых кабинетов (СК) в улучшении показателей кумулятивной скорректированной выживаемости (СкВ) больных с ЗНО женских половых органов, выявленных активно с 2005 по 2015 гг. на территории Челябинской области (ЧО). На основе базы данных Популяционного ракового регистра (ПРР) ЧО впервые осуществлены расчеты показателей кумулятивной СкВ больных с ЗНО шейки матки (389), тела матки (373) и яичников (161), выявленных активно в СК ЧО (основная группа), и случаи ЗНО шейки матки (395), тела матки (380) и яичников (163), выявленных в ходе самообращений пациенток (группа контроля). Стадийную структуру активно выявленных случаев ЗНО шейки матки в СК за период 2010–2017 гг. характеризует большой удельный вес I-II стадий по сравнению с остальной популяцией заболевших в ЧО — в среднем 50,8 и 46,1% соответственно, в отношении ЗНО тела матки — 85,5 и 82,0% соответственно, для овариальных раков — в среднем 42,0 и 37,4% соответственно. Анализ базы данных ПРР ЧО за 10-летний период позволил установить увеличение 5-летней кумулятивной СкВ для больных с диагнозом ЗНО шейки матки, выявленных активно в СК по сравнению с контрольной группой — 62,3 и 55,8% соответственно ($p = 0,11$). В отношении ЗНО тела матки — 82,0% в основной группе и 70,4% в группе контроля ($p = 0,001$). У больных с ЗНО яичников достоверных различий в показателях 5-летней кумулятивной СкВ не отмечено — 47,5% в основной и 43,2% в группе контроля ($p = 0,49$). Таким образом, СК — одна из эффективных организационных моделей вторичной профилактики рака на территории ЧО.

Ключевые слова: рак женских половых органов, раннее выявление, смотровые кабинеты, вторичная профилактика рака

Вклад авторов: А. Г. Бочкова — планирование исследования, подготовка рукописи, сбор данных, анализ и интерпретация данных, анализ литературы; А. С. Доможирова — планирование исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи; И. А. Аксенова — сбор данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 8 ноября 2018 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Анна Геннадьевна Бочкова
ул. Доватора, д. 23, г. Челябинск, 454091; annabochkova7496@mail.ru

Статья получена: 23.12.2019 **Статья принята к печати:** 08.01.2020 **Опубликована онлайн:** 22.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.003

EFFICIENCY OF THE GYNECOLOGIC MALIGNANCIES IDENTIFICATION MEASURES AT THE LEVEL OF PRIMARY HEALTH CARE

Bochkova AG¹✉, Domozhirova AS², Akseanova IA^{1,3}¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia² Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia³ Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine of Chelyabinsk Region, Chelyabinsk, Russia

In Russia, for more than 10 years, within the framework of national projects, the activities have been carried out aimed at restructuring of the primary and specialized (including high-tech) medical care, as well as strengthening of primary health care directed at early detection of malignant neoplasms. The study was aimed to evaluate the effectiveness of the patient examination rooms for women in improvement of the adjusted cumulative survival of patients with gynecologic malignancies detected actively in 2005–2015 in the Chelyabinsk Region. Using the Population Based Cancer Registry (PBCR) of the Chelyabinsk Region database, the adjusted cumulative survival calculation for patients with cervical cancer (389), uterine corpus cancer (373) and ovarian cancer (161) detected actively in the patient examination rooms of the Chelyabinsk Region (treatment group), as well as for cervical cancer (395), uterine corpus cancer (380) and ovarian cancer (163) detected in patients who sought medical assistance (control group), was performed for the first time. The staging of cervical cancer detected in the examination rooms in 2010–2017 was characterized by the high proportion of I/II stage tumors compared with the rest of patients' population of the Chelyabinsk Region (an average of 50.8 and 46.1% respectively). For uterine corpus cancer the average proportion was 85.5 and 82.0% respectively, and for ovarian cancers it was 42.0 and 37.4% respectively. Analysis of the PBCR of the Chelyabinsk Region for a 10-year period revealed the 5-year adjusted cumulative survival improvement in the actively detected cervical cancer patients compared to the control group (62.3 and 55.8%) respectively ($p = 0.11$). In patients with uterine corpus cancer, it was 82.0% for the main group and 70.4% for the control group ($p = 0.001$). In ovarian cancer patients, no significant differences in the 5-year adjusted cumulative survival were observed (47.5% in the main group, 43.2% in the control group) ($p = 0.49$). Thus, the patient examination rooms are the effective model of the cancer secondary prevention available in the Chelyabinsk Region.

Keywords: gynecologic malignancies, early detection, patient examination rooms, secondary prevention of cancer

Author contribution: Bochkova AG — research planning, manuscript writing, data acquisition, data analysis and interpretation, literature analysis; Domozhirova AS — research planning, data analysis and interpretation, manuscript editing; Akseanova IA — data acquisition, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of South Ural State Medical University (protocol № 9 dated November 8, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna G. Bochkova
Dovatora, 23, Chelyabinsk, 454091; annabochkova7496@mail.ru

Received: 23.12.2019 **Accepted:** 08.01.2020 **Published online:** 22.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.003

Злокачественные новообразования (ЗНО) — одна из основных проблем, стоящих на повестке дня современной медицины, и основная причина смертности населения развитых и развивающихся стран [1, 2]. Экономические потери от онкозаболеваний обусловлены значительными затратами на социальное обеспечение и страхование в связи с высокой стоимостью лечения, профилактических и реабилитационных мероприятий, длительной, часто стойкой, утратой трудоспособности, что по праву относит ЗНО к числу значимых проблем современного общества.

Наибольший удельный вес в структуре онкологической заболеваемости у женщин в РФ занимают ЗНО органов репродуктивной системы (38,9%), из них половину случаев составляют опухоли половых органов.

В 2017 г. в России было зарегистрировано более 26 тыс. новых случаев ЗНО тела матки (3-е место, 7,8%), более 17,5 тыс. случаев опухолей шейки матки (5-е место, 5,3%) и более 14,5 тыс. случаев злокачественных опухолей яичников (9-е место, 4,3%) [3].

Демографический сдвиг, эколого-репродуктивный диссонанс, общее ухудшение состояния здоровья женщин наряду с ростом частоты онкозаболеваний органов репродуктивной системы требуют целенаправленного и безотлагательного принятия решений, касающихся вопросов профилактики, скрининга и ранней диагностики злокачественных новообразований за счет междисциплинарного взаимодействия специалистов из разных областей.

В РФ внедрена в практику трехуровневая система оказания медицинской помощи населению по профилю «Онкология», и первичная медико-санитарная помощь в ней является базовой платформой, на которой реализуется профилактическая направленность системы здравоохранения, формируются основы для выработки у населения мотивации к сохранению и поддержанию высокого уровня здоровья с целью снижения смертности и инвалидизации вследствие заболеваний [4].

Снижение уровня смертности от ЗНО визуальных локализаций женских половых органов всецело зависит от качества и своевременности первичной диагностики [5].

Созданная в начале 1960-х гг. мощная сеть смотровых кабинетов (СК) не раз доказывала свою высокую результативность в активном выявлении ЗНО. Так, удельный вес активно выявленных случаев ЗНО шейки матки среди всех зарегистрированных больных в 1960–70-е гг. достигал 40% [6].

Рентабельность профилактических осмотров неоднократно подвергали анализу, который показал, что профилактические мероприятия, выявление и лечение больных с предопухолевыми заболеваниями и начальными формами рака требуют значительно меньше государственных затрат, чем лечение больных с клинически выраженными формами [7].

Основная задача женского СК — проведение профилактического осмотра всех женщин (старше 18 лет), обратившихся впервые в течение года в медицинские организации в целях раннего выявления хронических, предопухолевых и опухолевых заболеваний визуальных локализаций. Опухоли наружных локализаций, которые можно обнаружить в ходе профилактических осмотров, составляют 30% среди всех злокачественных опухолей у лиц обоего пола и почти 40% — у женщин [8].

Очень важно, чтобы профилактическое обследование в СК носило массовый поточный характер. Так, в популяциях, где качество скрининга и охват населения

были высоки, отмечено значительное снижение случаев инвазивного рака шейки матки [9, 10].

Кроме того, необходимо понимать, что ни современное оснащение СК, ни высокая квалификация и опыт акушерки, проводящей осмотр, не смогут обеспечить высоких конечных результатов работы, если не определен контингент женщин, подлежащих обследованию, не установлена периодичность осмотров, не отрегулирован поток посещений, не отработана система дообследования и маршрутизации выявленных больных. В этом случае становится актуальной активная позиция руководителей медицинских организаций первичного звена здравоохранения, которые осознают важность профилактического обследования в СК и проводят целенаправленную политику по развитию данного направления.

Цель исследования — оценить увеличение выживаемости больных с ЗНО женских половых органов в Челябинской области (ЧО) за счет использования эффективного пути активного выявления онкологических заболеваний в СК.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали материалы компьютерной базы данных Популяционного ракового регистра (ПРР) ЧО о впервые выявленных больных с ЗНО визуальных локализаций женских половых органов, сформированные за период 2005–2017 гг. включительно, а также отчеты о работе СК учреждений здравоохранения муниципальных образований ЧО за указанный период времени.

В основную группу вошли 923 пациентки в возрасте от 20 лет и старше, диагноз ЗНО у которых был выявлен активно в СК ЧО в период с 2005 по 2015 г. включительно. При этом распределение по основным локализациям опухолевого процесса выглядело следующим образом: в 389 (42,1%) наблюдениях были диагностированы ЗНО шейки матки, в 373 (40,4%) случаях — ЗНО тела матки и 161 (17,4%) случае — ЗНО яичников соответственно.

Контрольная группа включала 938 больных в возрасте 22 лет и старше, диагноз ЗНО которых установлен в ходе самообращений пациенток за аналогичный период, а именно: в 395 (42,1%) наблюдениях — рак шейки матки, в 380 (40,5%) и 163 (17,4%) случаях — рак тела матки и яичников соответственно.

Рандомизацию исследуемых групп осуществляли методом стратометрического отбора по совокупности основных прогностических признаков (по возрасту на момент установления диагноза, стадии заболевания, вариантам морфологического строения опухоли) в соответствии с критериями включения и исключения, приведенными ниже.

Критерии включения в группы: 100%-но морфологически верифицированные случаи ЗНО шейки матки, тела матки и яичников, выявленные активно в СК ЧО (для основной группы) либо при самообращении пациенток (для контрольной группы).

Критерии исключения из групп: первично-множественные случаи ЗНО, за исключением случаев сочетания с базально-клеточным раком кожи; отсутствие четких сведений об обстоятельствах выявления онкопатологии; отсутствие сведений о состоянии пациента на конец года; статус «выехавших» пациентов в другие регионы страны по данным ПРР ЧО.

В основной группе с верифицированным диагнозом ЗНО шейки матки преобладали больные с локализованным опухолевым процессом (общее число больных с I–II стадиями

заболевания составило 199 (51,2%) человек, в группе контроля — 199 (50,4%) ($p > 0,05$) (табл. 1).

Стадийное распределение впервые выявленных случаев ЗНО тела матки в обеих исследуемых группах демонстрирует высокий удельный вес выявленных I–II стадий заболеваний: 303 (81,2%) в основной группе и 303 (79,7%) в группе контроля ($p > 0,05$), что можно объяснить особенностями клинической картины заболевания, заставляющей больных рано обращаться к врачам, особенно в пре- и менопаузальном возрасте (табл. 2).

В отношении ЗНО яичников в обеих исследуемых группах доминировало наибольшее процентное соотношение больных с III–IV стадиями заболевания: 96 (59,6%) в основной и 96 (58,9%) в контрольной группах; различия были статистически недостоверными ($p > 0,05$) (табл. 3).

Возраст больных ЗНО шейки матки в основной группе варьировал от 23 до 92 лет, средний возраст составил $51,6 \pm 14,2$ лет, и в группе контроля от 20 до 88 лет, средний возраст — $51,4 \pm 14,0$ лет ($p = 0,81$). Необходимо отметить, что именно женщины возрастной категории 40–59 лет составляют основной контингент обследуемых в СК, тогда как лица 39 лет и младше составляют только одну четвертую часть от общего числа осматриваемых. Такой неудовлетворительный охват молодых пациенток профилактическими осмотрами в итоге отражается в увеличении в 1,5 раза выявления инвазивных форм рака шейки матки на территории ЧО в данной возрастной группе за последние 10 лет.

Возраст больных с диагнозом ЗНО тела матки в основной группе находился в диапазоне 31–86 лет, средний возраст составил $62,2 \pm 9,7$ лет и в диапазоне 35–85 лет в контрольной группе, средний возраст — $61,9 \pm 9,7$ лет; различия по возрастам были статистически недостоверными ($p = 0,72$). Наибольший удельный вес

заболеваемости раком эндометрия пришелся на возрастную когорту женщин 60–69 лет — 130 (34,9%) человек в основной группе и 136 (35,8%) в группе контроля.

Возрастной интервал больных с ЗНО яичников в основной группе составил 20–80 лет, средний возраст $57,3 \pm 13,5$ лет, в группе сравнения — 20–83 лет, средний возраст $57,1 \pm 13,0$ лет ($p = 0,90$).

Прогностически важным фактором в оценке выживаемости онкологических больных является морфологический тип первичной опухоли, который был верифицирован у всех больных сравниваемых групп. При статистическом анализе в обеих группах с диагнозом ЗНО шейки матки, ЗНО тела матки и яичников по основным гистологическим типам опухолей достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$).

На основе базы данных ПРР ЧО впервые осуществлены расчеты показателей СкВ больных с ЗНО шейки матки, тела матки и яичников с учетом обстоятельств их выявления. Расчеты показателей выживаемости проведены по классическим методам анализа данных на популяционном уровне. Для расчета выживаемости на популяционном уровне использовали актуаральный (динамический) метод с учетом вероятной продолжительности жизни и использованием повозрастных таблиц смертности населения на каждый период расчета показателя. За начало отсчета взята дата начала заболевания (дата установления диагноза), рекомендуемая для оценки выживаемости на популяционном уровне. Если показатели наблюдаемой выживаемости рассчитывают с учетом всех причин смерти онкологического пациента, по причине чего они являются ориентировочными, то показатели скорректированной выживаемости учитывают случаи смерти онкологических больных только по основному заболеванию, при этом умершие от интеркуррентных

Таблица 1. Распределение по стадиям заболевания в основной группе (СК) и группе контроля (КГ) случаев ЗНО шейки матки (C53) в соответствии с классификацией FIGO (2009 г.)

Группы сравнения		Стадия заболевания											
		I	IA	IB	II	IIA	IIB	III	IIIA	IIIB	IV	IVA	IVB
СК	Абс.	28	22	33	27	8	81	25	2	141	14	4	4
(n-389)	%	7,2	5,7	8,5	6,9	2,1	20,8	6,4	0,5	36,2	3,6	1	1
КГ	Абс.	30	23	28	33	4	81	32	4	136	16	4	4
(n-395)	%	7,6	5,8	7,1	8,4	1	20,5	8,1	1	34,4	4,1	1	1

Таблица 2. Распределение по стадиям заболевания в основной группе (СК) и группе контроля (КГ) случаев ЗНО тела матки (C54) в соответствии с классификацией FIGO (2009 г.)

Группы сравнения		Стадия заболевания												
		I	IA	IB	II	IIA	IIB	III	IIIA	IIIB	IIIC	IV	IVA	IVB
СК	Абс.	99	52	79	14	45	14	24	12	13	4	2	12	3
(n-373)	%	26,5	13,9	21,2	3,8	12,1	3,8	6,4	3,2	3,5	1,1	0,5	3,2	0,8
КГ	Абс.	95	60	78	12	47	11	26	18	14	1	2	14	2
(n-380)	%	25	15,8	20,5	3,2	12,4	2,9	6,8	4,7	3,7	0,3	0,5	3,7	0,5

Таблица 3. Распределение по стадиям заболевания в основной группе (СК) и группе контроля (КГ) случаев ЗНО яичников (C56) в соответствии с классификацией FIGO (2009 г.)

Группы сравнения		Стадия заболевания												
		I	IA	IB	IC	II	IIA	IIB	IIC	III	IIIA	IIIB	IIIC	IV
СК	Абс.	21	14	1	17	3	2	5	2	26	4	3	31	32
(n-161)	%	13	8,7	0,6	10,6	1,9	1,2	3,1	1,2	16,1	2,5	1,9	19,3	19,9
КГ	Абс.	21	16	1	16	4	2	6	1	25	3	3	34	31
(n-163)	%	12,9	9,8	0,6	9,8	2,5	1,2	3,7	0,6	15,3	1,8	1,8	20,9	19

заболеваний приравниваются к выбывшим из-под наблюдения; все показатели выражают в % [11, 12]. Исчисление показателей выживаемости и их средних ошибок осуществляли с помощью математической части программного обеспечения ПРР ЧО. Разницу считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 2005 по 2017 г. в 27 муниципальных районах и 16 городских округах ЧО активно функционировало 167 СК из 176 развернутых. Общее число женских СК составило 104. Кроме того, в муниципальных районах функция СК возложена и на фельдшерско-акушерские пункты, которые совмещают в себе работу женского и мужского СК.

Работу в женских СК осуществляет средний медицинский персонал (фельдшер, акушерка), прошедший специальную подготовку по онкологии и имеющий соответствующий сертификат, или врач акушер-гинеколог или дерматовенеролог, прошедший повышение квалификации по онкологии в объеме не менее 72 учебных часов. Согласно требованиям, обследование в СК должно нацеливать медицинских работников на выявление ЗНО визуальных локализаций как у мужчин, так и у женщин, и не «носить» выборочного характера обследования по отдельным органам и системам.

Востребованность и эффективность работы этого вида технологий вторичной профилактики ЗНО обусловлены следующими составляющими:

- доступность оказываемой медицинской помощи: работа в две смены, осмотр в первый день посещения лечебно-профилактического учреждения, отсутствие очередей и надобности заблаговременного бронирования талонов для осмотра;

- четкое соблюдение принципов маршрутизации пациентов с выявленной патологией и в случае выявления ЗНО, передача пациента «из рук в руки» в день обращения к врачу соответствующей специальности или онкологу с приоритетом первоочередности обследования;

- обязательный отбор у женщин мазков с цервикального канала и шейки матки и последующее направление в цитологическую лабораторию, их учет и регистрация, а также мониторинг числа неинформативных мазков.

С 2007 по 2017 г. женские СК ЧО посетило более 5 млн. женщин (5 136 098) в возрасте старше 20 лет с целью осмотра и проведения цитологического скрининга для выявления предопухолевых, хронических заболеваний и онкопатологии, т. е. в среднем 49,5% от числа женщин старше 20 лет, проживающих на данной территории. Таким образом, создается некий «резерв» в среднем из 50,5% лиц, которые обращаются за медицинской помощью гораздо реже, чем раз в год, а значит не могут быть в полной мере охвачены профилактическими мероприятиями, в том числе осмотрами в СК.

За время своей работы СК доказали высокую результативность, что находит отражение в активном выявлении не только общего числа ЗНО визуальных локализаций женских половых органов, но и в общем количестве выявленных случаев хронических и предопухолевых заболеваний. Так, в 2017 г. работниками СК диагностировано 97 367 всех случаев заболеваний у женщин, что на 53,7% больше по сравнению с 2007 г. В структуре выявленных заболеваний наибольший удельный вес имеют хронические заболевания: в 2017 г. —

66 805 (68,61%) случаев, в 2007 г. — 40 106 (63,3%); прирост за 10-летний период наблюдения составил 66,6%. Выявляемость хронических заболеваний (% от числа осматриваемых в СК) в среднем составила 11,2%. Второе место по выявляемости в СК занимают предопухолевые заболевания — 29 885 (30,7%) случаев в 2017 г., 22 801 (36,0%) — в 2007 г.; прирост за указанный период составил 31,1%, выявляемость в среднем по области — 5,9% от числа осматриваемых. Третье место по выявляемости в СК занимают ЗНО: в 2017 г. — 677 случаев ЗНО (12,0 на 10 тыс. осматриваемых), что составляет 7,5% от всех выявленных ЗНО у женщин в ЧО, по сравнению с 2007 г. прирост абсолютного числа выявленных случаев ЗНО увеличился в 1,5 раза (на 50,8%).

В период с 2007 по 2017 гг. специалистами СК было выявлено 548 случаев ЗНО тела матки (8,6% от общего числа эндометриоидного рака в области), 567 случаев ЗНО шейки матки (в среднем 12,9% от числа выявленных случаев ЗНО шейки матки в области) и 254 случаев ЗНО яичников (6,4% от общего числа овариальных раков в области). Удельный вес выявленных случаев ЗНО тела матки на I–II стадиях в среднем за период 2010–2017 гг. составил 85,5%, ЗНО шейки матки — 50,8%, а ЗНО яичников — 42,0%, что выше аналогичных показателей по области — 82,0%, 46,1% и 37,4% соответственно (рис. 1–3).

При оценке анализа работы СК большое внимание уделяли показателям мощности работы (загруженности), которые исчисляются, исходя из регламентированной длительности рабочего дня СК — 7 ч (смена) с осмотром не менее четырех пациентов в час 252 рабочих дня в году.

В 2007 г. в период становления работы СК показатель загруженности достигал 51,4% и, начиная с 2009 г., с открытием нового числа СК, отмечено увеличение мощности работы (загруженности) до 77,9% в 2017 г. Нами были произведены расчеты относительно возможного количества выявленных случаев ЗНО при идеальных условиях — 100%-й загрузке СК. Полученные данные позволили сделать заключение о том, что при полной загрузке женских СК в области в период 2007–2017 гг. дополнительно было бы выявлено 3438 случаев ЗНО вместо существующих 6876, т. е. на 50,0% больше от исходного уровня. Из них удельный вес ЗНО I–II стадий оказался бы равным 7448 случаям, вместо 4986 имеющихся. Методом наименьших квадратов аппроксимирована имеющаяся прямая зависимость между количеством осматриваемых пациенток и количеством выявленных случаев ЗНО в СК ЧО за 10-летний период наблюдения, коэффициент детерминации составил 0,591, что демонстрирует высокую корреляцию модели с реальными данными (коэффициент корреляции $r = 0,77$; $p = 0,007$).

С применением цитологического скрининга в СК было обследовано от 79,6% в 2007 г. до 94,7% женщин в 2017 г., при этом охват цитологическими обследованиями должен стремиться к показателю, равному 100%. Общее количество взятых цитологических мазков в период с 2007 по 2017 г. составило более 4,5 млн (в среднем более 410 тыс. мазков в год).

Важнейшим качественным критерием оценки эффективности противораковых мероприятий служит показатель выживаемости онкологических больных, который в том числе отражает адекватность стадирования всех выявленных случаев ЗНО [13].

В ходе исследования удалось показать преимущество в показателях 5-летней кумулятивной СкВ для больных с диагнозом ЗНО шейки матки, выявленных активно в СК по

сравнению с контрольной группой — 62,3 против 55,8% ($p = 0,11$) (рис. 4).

В отношении ЗНО тела матки были получены достоверные различия в показателях 5-летней выживаемости: $82,0 \pm 2,6$ — в основной группе и $70,4 \pm 2,6$ — в группе контроля ($p = 0,001$). На рис. 5 видно, как с течением времени расходятся кривые выживаемости.

У больных с овариальными раками достоверных различий в показателях 5-летней кумулятивной СкВ не отмечено: 47,5% — в основной и 43,2% — в группе контроля ($p = 0,49$) (рис. 6). Многие авторы сходятся во мнении, что несмотря на высокую чувствительность большинства современных методов диагностики их специфичность недостаточна для дифференцировки доброкачественных и злокачественных процессов в яичниках, а проведение диагностических мероприятий всем без исключения женщинам (в том числе не входящим

в группу высокого риска) в итоге оказывает минимальное влияние на показатели летальности [14–16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Совершенствование системы раннего выявления опухолей необходимо начинать с наиболее доступных для этого визуальных локализации рака, диагностика которых не требует специального дорогостоящего диагностического оборудования и углубленных знаний по вопросам онкологии у медицинских работников первичного звена здравоохранения.

Несмотря на то что профилактические осмотры играют значительную роль в диагностике ЗНО, за последние 10 лет в РФ число СК увеличилось на 48% и в 2017 г. составило 4989, т. е. в среднем 58 СК на каждый из 85 существующих субъектов РФ (для сравнения в одной ЧО в 2017 г. число

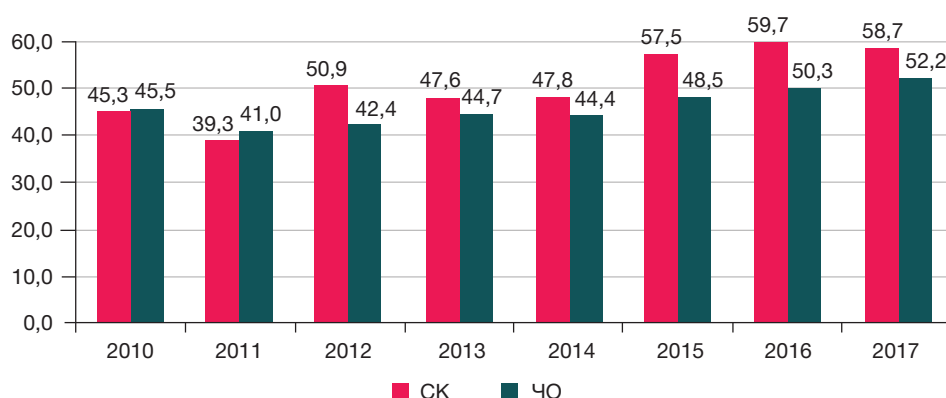


Рис. 1. Динамика удельного веса I-II стадий ЗНО шейки матки (C53), выявленных активно в смотровых кабинетах в сравнении со среднеобластным показателем по ЧО в 2010–2017 гг., в %

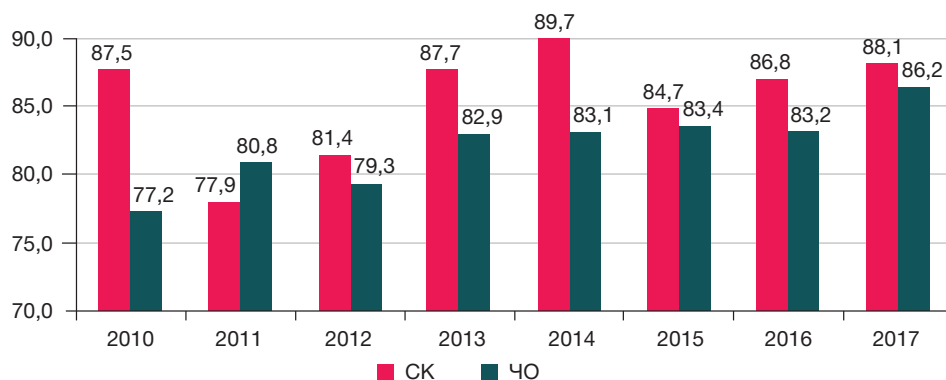


Рис. 2. Динамика удельного веса I-II стадий ЗНО тела матки (C54), выявленных активно в смотровых кабинетах в сравнении со среднеобластным показателем по ЧО в 2010–2017 гг., в %

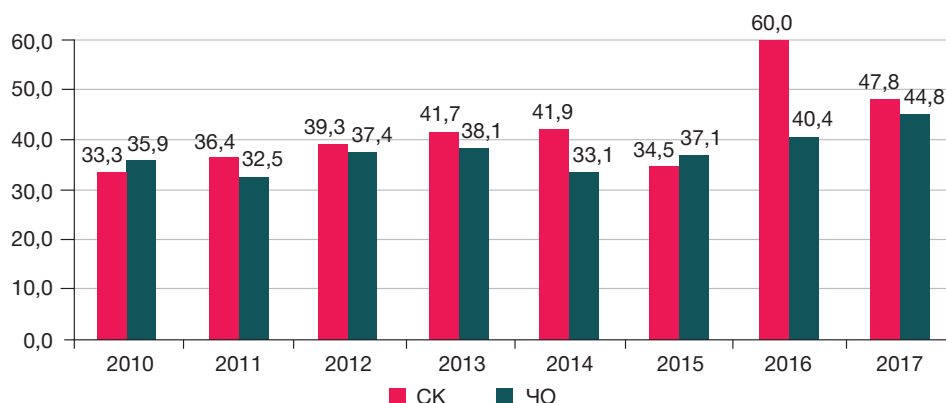


Рис. 3. Динамика удельного веса I-II стадий ЗНО яичников (C56), выявленных активно в смотровых кабинетах в сравнении со среднеобластным показателем по ЧО в 2010–2017 гг., в %

СК достигло 176), при этом количество работающих в две смены оказалось равным только 20%. Недостаточный охват населения профилактическими осмотрами в итоге отражается на низком удельном весе активно выявленных случаев ЗНО в целом — 25,8% в 2017 г. в РФ. Удельный вес ЗНО шейки матки, выявленных активно в РФ, несмотря на визуальную доступную локализацию в 2017 г. был равен 42,2%; значительно ниже доля больных на профилактических осмотрах при раке тела матки (29,1% в 2017 г.) и яичников (18,4% в 2017 г.). Как следствие, каждый второй и третий случаи рака яичников и шейки матки в РФ диагностируют на III–IV стадиях процесса — 58,5 и 32,4% соответственно в 2017 г., что приводит к низким показателям выживаемости в этих группах, несмотря на арсенал задействованных комплексных методов лечения [17]. Именно поэтому в настоящее время назрела настоятельная потребность реализации профилактических программ национального масштаба, направленных на раннее выявление и адекватное лечение предотвратимых форм ЗНО.

Анализ базы данных ПРР ЧО за 10-летний период наблюдения позволил установить, что показатели 5-летней кумулятивной СкВ с ЗНО шейки матки, выявленными

активно в СК, выглядят более выигрышными по сравнению с остальной популяцией заболевших — 62,3 и 55,8% соответственно ($p = 0,11$). Подобная тенденция прослеживается и в отношении опухолей не визуальных локализаций, таких как ЗНО тела матки и яичников — 82,0 против 70,4% ($p = 0,001$) и 47,5 против 43,2% в соответственно ($p = 0,49$).

Такая гетерогенная группа опухолей, как овариальный рак, уже на протяжении более 30 лет ассоциируется с незначительными успехами по отдаленным результатам лечения с показателями 5-летней выживаемости, не превышающими 50%-й порог (48,4%) [18]. Во многом это связано с отсутствием на сегодняшний день надежных скрининговых программ, позволяющих решить вопросы ранней диагностики рака яичника.

В целом, на высокие показатели работы СК оказывает влияние массовый поточный характер проводимых профилактических обследований в них с осмотром не менее четырех пациентов в час на протяжении полного рабочего дня поликлиники, в две смены. Именно такой объем нагрузки позволяет отсортировать из общей массы обследуемых когорту лиц с клинически неманифестными формами патологии для последующего

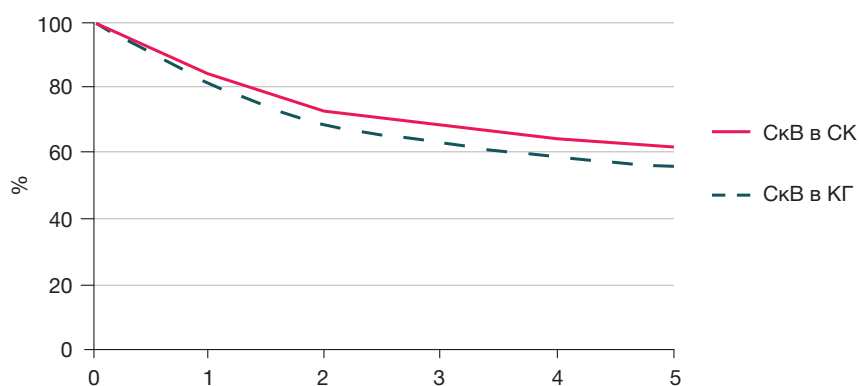


Рис. 4. Кумулятивная скорректированная выживаемость больных с ЗНО шейки матки (C53) в основной и контрольной группах (БД ПРР ЧО, 2005–2015 гг.), в %

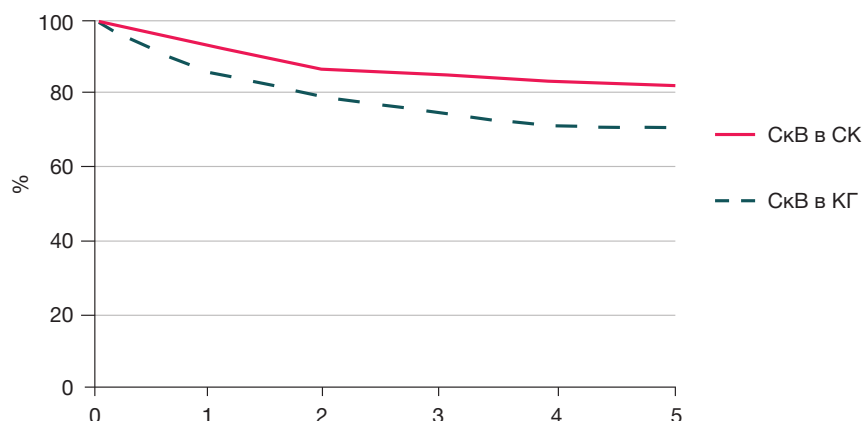
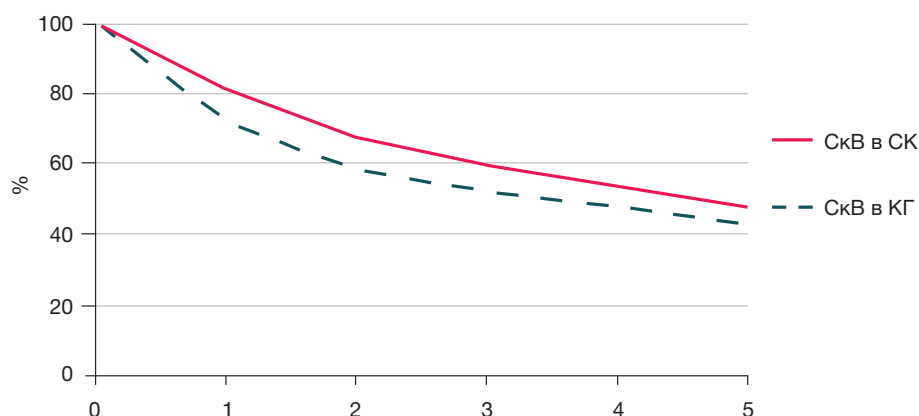


Рис. 5. Кумулятивная скорректированная выживаемость больных с ЗНО тела матки (C54) в основной и контрольной группах (БД ПРР ЧО, 2005–2015 гг.), в %



Выживаемость	Группы	1-й год	2-й год	3-й год	4-й год	5 лет
Скорректированная	СК	80,6	67,2	60,1	54,1	47,5
	КГ	72,2	58,5	52,0	48,5	43,2

Рис. 6. Кумулятивная скорректированная выживаемость больных с ЗНО яичников (С56) в основной и контрольной группах (БД РРР ЧО, 2005–2015 гг.), в %

углубленного обследования. Подобная задача становится невыполнимой для узкого специалиста по причине того, что вследствие особенностей менталитета наши пациенты планируют визит к профильному специалисту лишь с перечнем определенных, присущих квалификации конкретного специалиста вопросов. Усложняет работу и система заблаговременного бронирования талонов к врачам, что заставляет пациентов подстраиваться и выбирать свободное время для этих визитов. В то время как в СК предлагают пройти полноценный осмотр в первый день посещения медицинского учреждения.

По результатам такого осмотра, пациенты с подозрением на онкопатологию с первых шагов попадают в поле пристального внимания специалистов медицинской организации с правом первоочередности углубленного обследования, при этом сроки предполагаемого углубленного обследования должны укладываться в строгие временные рамки, а именно 10 дней с момента

выставления подозрения. Такие пациенты, в отличие от прочих, без задержек попадают в онкологические учреждения в случае диагностирования ЗНО, а значит своевременно получают специализированную онкологическую помощь в полном объеме.

ВЫВОДЫ

Дальнейшая проработка программ по улучшению посещаемости СК области, а также внедрение предложенного тактического алгоритма в работу первичного медико-санитарного звена акушерско-гинекологической службы по раннему выявлению фоновых, предраковых и злокачественных новообразований в будущем позволят повысить показатели выявления ЗНО на более ранних стадиях, а значит минимизировать затраты на дальнейшее лечение и реабилитацию таких пациенток, и самое главное улучшить показатели выживаемости для этой группы больных.

Литература

- Сушинская Т. В., Жордания К. И., Паяниди Ю. Г. Аналитические аспекты онкологических заболеваний женского населения России. Онкогинекология. 2015; (3): 40–3.
- Global Cancer Facts & Figures. 3rd edition. Atlanta, Georgia: American Cancer Society. 2015; 61 p.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 250 с.
- Александрова Л. М., Старинский В. В., Каприн А. Д., Самсонов Ю. В. Профилактика онкологических заболеваний как основа взаимодействия онкологической службы с первичным звеном здравоохранения. Исследования и практика в медицине. 2017; (4): 74–80.
- Мошуров И. П., Кравец Б. Б., Коротких Н. В. Организационные резервы снижения смертности от рака шейки матки. Онкогинекология. 2014; (4): 28–33.
- Кривонос О. В., Чиссов В. И., Старинский В. В., Александрова Л. М. Роль и задачи смотрового кабинета поликлиники как этапа в организации профилактических мероприятий, направленных на совершенствование онкологической помощи населению: методические рекомендации. М., 2010. Доступно по ссылке: http://www.oncology.ru/service/organization/exam_room.pdf (дата обращения: 10.11.2019).
- Доможирова А. С., Важенин А. В. Вторичная профилактика рака в системе регионального здравоохранения. М.: Изд-во РАМН, 2012; 192 с.
- Шубин Б. М., Винокур М. Л., Попова А. А. Выявление опухолевых заболеваний в смотровом кабинете. Ленинград: Медицина, 1980; 208 с.
- ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. Obstet Gynecol. 2012; 120 (5): 1222–38.
- Ronco G, Anttila A. Cervical cancer screening in Europe — changes over the last 9 years. Eur J Cancer. 2009; 45 (15): 2629–31. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.07.021.
- Петрова Г. В., Грецова О. П., Каприн А. Д., Старинский В. В. Характеристика и методы расчета медико-статистических показателей, применяемых в онкологии. М.: ФГБУ МНИОИ им. П. А. Герцена Минздрава РФ, 2014; 40 с.
- Мерабишвили В. М. Онкологическая статистика (традиционные методы, новые информационные технологии): Руководство для врачей. Изд. 2-е, доп. СПб., 2015; 248 с.
- Мерабишвили В. М. Выживаемость онкологических больных. СПб., 2011; 329 с.
- Урманчеева А. Ф., Кутушева Г. Ф., Ульрих Е. А. Опухоли яичника

- (клиника, диагностика и лечение). СПб.: Изд-во Н-Л, 2012; 68 с.
15. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387 (10022): 945–56. PubMed PMID: 26707054.
 16. Johnson N. Two large randomised trials show ovarian cancer screening has minimal impact on survival. *BJOG*. 2016; 125 (5): 524–5.
 17. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 236 с.
 18. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/sections.html.

References

1. Sushinskaya TV, Zhordania KI, Payanidi YuG. Analiticheskie aspekty onkologicheskikh zabolevaniy zhenskogo naseleniya Rossii. *Onkoginekologiya*. 2015; (3): 40–3. Russian.
2. Global Cancer Facts & Figures. 3rd edition. Atlanta, Georgia: American Cancer Society. 2015; 61 p.
3. Kaprin AD, Starinskiy VV, Petrova GV, redaktory. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost'). M.: MNIOL im. P.A. Gertsena — filial FGBU «NMI Cradiologii» Minzdrava Rossii, 2018; 250 s. Russian.
4. Aleksandrova LM, Starinskiy VV, Kaprin AD, Samsonov YuV. Profilaktika onkologicheskikh zabolevaniy kak osnova vzaimodeystviya onkologicheskoy sluzhby s pervichnym zvenom zdravookhraneniya. Issledovaniya i praktika v meditsine. 2017; (4): 74–80. Russian.
5. Moshurov IP, Kravets BB, Korotkikh NV. Organizatsionnye rezervy snizheniya smertnosti ot raka sheyki matki. *Onkoginekologiya*. 2014; (4): 28–33. Russian.
6. Krivonos OV, Chissov VI, Starinskiy VV, Aleksandrova LM. Rol'i zadachi smotrovogo kabineta polikliniki kak etapa v organizatsii profilakticheskikh meropriyatiy, napravlennykh na sovershenstvovanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu: metodicheskie rekomendatsii. M., 2010. Available from: http://www.oncology.ru/service/organization/exam_room.pdf (data obrascheniya: 10.11.2019). Russian.
7. Domozhirova AS, Vazhenin AV. Vtorichnaya profilaktika raka v sisteme regional'nogo zdravookhraneniya. M.: Izd-vo RAMN, 2012; 192 s. Russian.
8. Shubin BM, Vinokur ML, Popova AA. Vyavlenie opukholevykh zabolevaniy v smotrovom kabinete. Leningrad: Meditsina, 1980; 208 s. Russian.
9. ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2012; 120 (5): 1222–38.
10. Ronco G, Anttila A. Cervical cancer screening in Europe — changes over the last 9 years. *Eur J Cancer*. 2009; 45 (15): 2629–31. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.07.021.
11. Petrova GV, Grecova OP, Kaprin AD, Starinskiy VV. Harakteristika i metody rascheta mediko-statisticheskikh pokazatelej, primenyaemykh v onkologii. M.: FGBU MNIOL im. P.A. Gercena Minzdrava RF, 2014; 40 s.
12. Merabishvili VM. Onkologicheskaya statistika (tradicionnye metody, novye informacionnye tekhnologii): Rukovodstvo dlya vrachej. Izd. 2-e, dop. SPb., 2015; 248 s.
13. Merabishvili VM. Vyzhivaemost' onkologicheskikh bol'nyh. SPb., 2011; 329 s.
14. Urmancheeva AF, Kutusheva GF, Ul'rih EA. Opuholi yaichnika (klinika, diagnostika i lechenie). SPb.: Izd-vo N-L, 2012; 68 s.
15. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387 (10022): 945–56. PubMed PMID: 26707054.
16. Johnson N. Two large randomised trials show ovarian cancer screening has minimal impact on survival. *BJOG*. 2016; 125 (5): 524–5.
17. Kaprin AD, Starinskiy VV, Petrova GV, redaktory. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2017 godu. M.: MNIOL im. P.A. Gercena — filial FGBU «NMI Cradiologii» Minzdrava Rossii, 2018; 236 s.
18. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/sections.html.

НЕПЕРЕНОСИМОСТЬ КОНСЕРВАНТОСОДЕРЖАЩИХ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ПРИ ГЛАУКОМЕ: ТРУДНОСТИ ДИАГНОСТИКИ, СЛОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ

М. А. Фролов¹, К. А. Казакова^{1,2}✉, Г. Н. Душина¹, А. М. Фролов¹, П. А. Гончар¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Многопрофильный медицинский холдинг «СМ-Клиника», Москва, Россия

В клинику поступил пациент с диагнозом OD о/у глаукома 1а. OS оперированная о/у глаукома IIa. Состояние глазной поверхности расценено как токсико-аллергический конъюнктивит на фоне применения бримонидина 0,15%. Проведена замена бримонидина 0,15% на неселективный β-блокатор 0,5% и назначены стероиды местно. На фоне отмены стероидов было отмечено частичное возобновление симптомов в виде умеренно выраженных гиперемии и отека конъюнктивы, что было расценено уже как непереносимость консерванта. Было решено заменить β-блокатор на бесконсервантную форму под регулярным контролем уровня ВГД, дополнительно рекомендованы слезозаменители, не содержащие консервантов. При следующем визите отмечено повышение ВГД выше толерантного, назначена бесконсервантная форма комбинированного гипотензивного средства (аналог простагландина 0,005% с неселективным β-блокатором 0,5%) под контролем уровня ВГД. Неправильная постановка диагноза в начале лечения усугубила состояние глазной поверхности. Применение препаратов без консерванта благоприятно влияет на поверхность роговицы и повышает комплаентность пациентов.

Ключевые слова: глаукома, консервант, бесконсервантная форма препарата, бримонидин, аллергическая реакция

Вклад авторов: М. А. Фролов — планирование исследования, анализ и интерпретация данных; К. А. Казакова, Г. Н. Душина, А. М. Фролов, П. А. Гончар — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: пациент подписал добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию данных.

✉ **Для корреспонденции:** Ксения Александровна Казакова
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, г. Москва, 117198; ponomareva_kseni@mail.ru

Статья получена: 26.12.2019 **Статья принята к печати:** 09.01.2020 **Опубликована онлайн:** 26.01.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.005

INTOLERANCE OF PRESERVATIVE-CONTAINING EYE DROPS IN A GLAUCOMA PATIENT: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC CHALLENGES

Frolov MA¹, Kazakova KA^{1,2}✉, Dushina GN¹, Frolov AM¹, Gonchar PA¹

¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Multiprofile Clinic "SM-Clinic", Moscow, Russia

A patient presented to our clinic with stage Ia open-angle glaucoma of the right eye and stage IIa surgically corrected open-angle glaucoma of the left eye. The condition of the ocular surface was interpreted as toxic/allergic conjunctivitis provoked by brimonidine 0.15 %. Brimonidine was substituted with non-selective 0.5%; additionally, topical steroids were prescribed. After steroids were discontinued, some of the symptoms came back, including moderate hyperemia and conjunctival edema, which was interpreted as intolerance to a preservative contained in the eye drops. A decision was made to switch from the β-blocker to its preservative-free formulation; regular IOP monitoring was continued. IOP measured during the next visit was above tolerated, so a preservative-free form of the ocular hypotensive combination drug (an analog of prostaglandin 0.005% with non-selective β-blocker 0.5%) was introduced to the regimen, with further IOP monitoring. Because the initial diagnosis was wrong, damage to the ocular surface had been aggravated by inadequate therapy. Preservative-free hypotensive eye drops are beneficial for the corneal surface and have a positive effect on a patient's adherence to the regimen.

Keywords: glaucoma, preservative, brimonidine, preservative-free form, allergic reactions

Author contribution: Frolov MA — study planning; data analysis and interpretation; Kazakova KA, Dushina GN, Frolov AM, Gonchar PA — study planning; literature analysis; data acquisition, analysis and interpretation; manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the patient gave informed consent to participate in the study and for publication of its results

✉ **Correspondence should be addressed:** Kseniya A. Kazakova
Miklouho-Maclay, 6, Moscow, 117198; ponomareva_kseni@mail.ru

Received: 26.12.2019 **Accepted:** 09.01.2020 **Published online:** 26.01.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.005

Основным методом снижения внутриглазного давления (ВГД) остается местная гипотензивная терапия. До 60–80% пациентов с глаукомой получают местное лечение в виде ежедневных инстилляций гипотензивных препаратов [1]. Такая терапия является длительной, чаще пожизненной, в ряде случаев используют комбинацию нескольких гипотензивных препаратов.

На сегодняшний день выработан определенный алгоритм назначения гипотензивной терапии. Препаратами первого выбора, как правило, являются аналоги PGF_{2α}, так как они наиболее эффективно снижают уровень ВГД от исходного, а также обладают нейропротективными свойствами. При отсутствии достижения индивидуального целевого офтальмотонуса рекомендовано применение

простаминов (биматопроста 0,03%). При недостаточном снижении ВГД возможно добавление ингибиторов карбоангидразы. Следующим этапом лечения, при отсутствии желаемого гипотензивного эффекта, является применение фиксированных комбинаций (ФК), среди которых наиболее результативно сочетание однократной инстилляции биматопроста с тимололом [2].

Таким образом, в арсенале офтальмологов для лечения глаукомы имеется большой выбор гипотензивных препаратов различных фармакологических групп, однако все они могут вызывать те или иные побочные эффекты, которые связаны как непосредственно с активным компонентом гипотензивного средства (действующим веществом), так и с консервантом, входящим в подавляющее большинство глазных капель [3].

В последние годы большое количество отечественных и зарубежных исследований посвящено анализу частоты патологии глазной поверхности у пациентов с первичной глаукомой и изучению воздействию консервантов на поверхность глаза [4, 5–9]. Убедительно доказано, что консерванты приводят к уменьшению плотности бокаловидных клеток и, как следствие, к недостаточности муцинового слоя слезной пленки; нарушают структуру липидного слоя, в результате чего увеличивается испарение влаги и повышается осмолярность прероговичной слезной пленки; оказывают цитотоксический эффект на эпителиоциты конъюнктивы и роговицы, вызывают кератинизацию и воспалительную инфильтрацию в области лимба (влияние консервантов при глаукоме), индуцируют повышение уровня цитокинов и поддерживают иммуно-воспалительную реакцию в конъюнктиве (провоспалительная готовность) [1, 5, 7, 10].

Однако патологические изменения глазной поверхности могут быть вызваны и непосредственным воздействием фармакологического агента гипотензивного препарата. Изучены механизмы развития роговично-конъюнктивального ксероза на фоне инстилляций β -блокаторов — снижение слезопродукции, а также местное анестетическое действие на эпителий, приводящее к снижению стимулирования базальной слезопродукции и продукции муцинов бокаловидными клетками конъюнктивы при повреждении эпителия глазной поверхности [5].

Немаловажно, что токсико-аллергические реакции на применение гипотензивных препаратов могут развиваться как сразу после начала применения, так и в более поздние сроки, что затрудняет диагностику и в ряде случаев служит причиной необоснованного назначения лекарственных средств (антибактериальных, противовирусных, нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и др.), что в свою очередь приводит к дополнительному ухудшению состояния глазной поверхности. Так, в описанных случаях аллергической реакции на селективный α_2 -адреномиметик бримонидин средняя продолжительность терапии до наступления аллергической реакции составила от 4 до 15 месяцев [11].

Лечение пациентов с непереносимостью консервантосодержащих глазных капель сопровождается рядом сложностей:

- непереносимость гипотензивных препаратов вызывает необходимость замены лекарственного средства, часто неоднократной, что требует от пациента дополнительных расходов на лечение;
- при развитии синдрома сухого глаза, спровоцированного консервантами глазных капель, необходимо назначение препаратов искусственной слезы, также не содержащих консерванты;
- при недостаточном снижении ВГД в случаях, когда требуется применение нескольких гипотензивных препаратов, необходимо проведение аллергопроб на сенсibilизацию к глазным каплям [11];
- в случаях развившейся токсико-аллергической реакции, роговично-конъюнктивального ксероза и при невозможности отказа от гипотензивных капель, содержащих консерванты, приходится назначать дополнительную терапию: противоаллергическую системную и местную, стероидные препараты, которые в свою очередь могут вызвать повышение ВГД, репаративные средства. При этом также могут возникать аллергические реакции на консерванты, содержащиеся в назначаемых лекарственных средствах;

– в некоторых случаях из-за поливалентной аллергии подобрать гипотензивный препарат не удастся и приходится прибегать к оперативному лечению.

В настоящее время в РФ зарегистрировано несколько безконсервантных гипотензивных препаратов. Положительное влияние не содержащих консерванта гипотензивных средств на глазную поверхность по сравнению с аналогичными консервантосодержащими препаратами доказано в многочисленных исследованиях отечественных и зарубежных авторов [1, 4, 12–18], однако их широкое применение затруднено рядом факторов:

– в РФ зарегистрировано всего семь гипотензивных глазных капель, не содержащих консервантов;

– большинство гипотензивных препаратов, не содержащих консервант, имеет в своем составе β -блокатор. Известно, что гипотензивный эффект β -блокаторов со временем снижается, что требует назначения дополнительных препаратов. Кроме того, применение неселективных β -блокаторов ограничено их системными побочными эффектами.

Описание клинического случая

Показательно следующее клиническое наблюдение. Пациент К., 67 лет, проживающий в отдаленном регионе РФ, обратился с жалобами на покраснение обоих глаз, жжение, слезотечение в течение полугода (см. рис.).

Из анамнеза: пациент с диагнозом OD о/у глаукома 1a. OS оперированная о/у глаукома 1a. В январе 2017 г. проведена непроникающая глубокая склерэктомия с имплантацией клапанного дренажа Ahmed на левом глазу. Дополнительно назначены инстилляции бримонидина в оба глаза. Данных об уровне ВГД на левом глазу перед операцией нет. В мае 2017 г. обратился к офтальмологу по месту жительства с жалобами на выраженное покраснение обоих глаз. Обследован. Диагностирован блефароконъюнктивит. Посев с конъюнктивы патологической микрофлоры не выявил. Обнаружены клещи рода *Demodex*. Назначены противодемодекозная терапия и субконъюнктивные инъекции гентамицина с дексаметазоном, на фоне которых «покраснение» глаз быстро прошло. Однако в течение следующих нескольких месяцев отмечалось периодическое покраснение глаз. Состояние пациента ухудшилось с начала ноября 2017 г. Многократно обращался к офтальмологам в различные



Рис. Правый глаз. Смешанная инъекция глазного яблока. Фолликулы и умеренная отечность конъюнктивы нижнего века

учреждения по месту проживания и в соседние населенные пункты. Повторно взят посев с конъюнктивы на флору; рост патологической микрофлоры не обнаружен. При повторном исследовании на демодекоз обнаружены единичные имаго. В мазке с конъюнктивы было выявлено много лейкоцитов. Местно назначены: антисептики, антибиотики различных групп, препараты интерферона и индуктор его синтеза, антигистаминные препараты, кортикостероиды, кератопротекторы, гигиена век. Эффекта от лечения отмечено не было.

Состояние пациента при обращении (декабрь 2017 г.): МКОЗ OD = 0,9, МКОЗ OS = 0,8. ВГД (пневмотонометрия) OD — 18–19 мм рт. ст., OS — 20–21 мм рт. ст. При осмотре кожа век гиперемирована, веки отечны, слезные органы не изменены, слезотечение. Выраженная гиперемия конъюнктивы во всех отделах, выраженный отек конъюнктивы в сводах, фолликулы конъюнктивы век и сводов, отделяемое скудное в виде хлопьев. На роговице обоих глаз старые точечные единичные субэпителиальные помутнения. ВГД пальпаторно — в пределах нормы. Состояние глазной поверхности расценено как токсико-аллергический конъюнктивит на фоне применения бримонидина 0,15%.

Обсуждение клинического случая

Замена бримонидина 0,15% на неселективный β -блокатор 0,5% и назначение стероидов местно на короткий срок под контролем ВГД привели к положительной субъективной и объективной динамике, однако на фоне отмены стероидов было отмечено частичное возобновление симптомов в виде умеренно выраженных гиперемии и отека конъюнктивы, что было расценено уже как непереносимость консерванта. Было решено заменить β -блокатор на бесконсервантную форму под регулярным контролем уровня ВГД, дополнительно рекомендованы слезозаменители, не содержащие консервантов. Выбор препарата обусловлен отсутствием в городе проживания пациента каких-либо других бесконсервантных гипотензивных препаратов.

Пациент длительно (более 9 месяцев) на контрольный осмотр не приезжал, ВГД контролировал по месту жительства. Обратился повторно в октябре 2018 г. с жалобами на ухудшение зрения левого глаза. Со слов пациента и согласно имеющимся на руках результатам тонометрии по Маклакову, уровень ВГД на оперированном глазу варьировал от 15 до 23 мм рт. ст. При обращении Vis OS = 0,2, МКОЗ = 0,5. При осмотре веки не изменены, слезотечение отсутствует, конъюнктивита спокойна во всех отделах. При офтальмоскопии OS диск зрительного нерва

значительно осветлен, обнаружена краевая экскавация. По данным автоматической статической периметрии выявлены сужение поля зрения с назальной стороны до 30°, множественные абсолютные скотомы в центральной зоне. Уровень ВГД: OD — 15 мм рт. ст., OS — 24 мм рт. ст.

В связи с отрицательной динамикой остроты зрения левого глаза и повышением ВГД до 24 мм рт. ст. рекомендована повторная антиглаукомная операция, временно усилен гипотензивный режим. Назначена бесконсервантная форма комбинированного гипотензивного средства (аналог простагландина 0,005% с неселективным β -блокатором 0,5%) под контролем уровня ВГД. В связи с отсутствием препарата в аптечной сети по месту проживания пациент вынужден закупать лекарственное средство в другом городе.

Повторное оперативное вмешательство по месту жительства пациента проведено не было. При обращении в январе 2019 г. периметрия и состояние диска зрительного нерва — без отрицательной динамики, ВГД OD — 16 мм рт. ст., OS — 19 мм рт. ст. Однако пациент жаловался на периодическое покраснение глаз, в том числе на фоне применения слезозаменителей, что можно расценивать как побочную реакцию на инстилляцию аналога простагландина. Контроль ВГД по месту жительства показал периодическое его повышение на левом глазу до 22–24 мм рт. ст.

В связи с непереносимостью консервантосодержащих гипотензивных препаратов, отсутствием стойкого гипотензивного эффекта от назначенного лечения, сложностью ведения пациента в связи с проживанием в отдаленном регионе пациенту настоятельно рекомендована повторная антиглаукомная операция.

Выводы

Неправильная трактовка этиологии конъюнктивита/блефароконъюнктивита приводит к полипрагмазии. При этом назначение нескольких лечебных препаратов в дополнение к основному гипотензивному усугубляет состояние глазной поверхности и значительно удорожает процесс лечения. Отсутствие бесконсервантных форм препаратов всех используемых в лечении глаукомы фармакологических групп в ряде случаев может приводить к прогрессированию заболевания. А невозможность отказа от использования консервантосодержащих глазных капель в связи с недостаточным гипотензивным эффектом на фоне применения бесконсервантных форм значительно снижает качество жизни пациента, уровень его комплаентности, а также может служить причиной проведения хирургического вмешательства.

Литература

1. Астахов С. Ю., Ткаченко Н. В. Тафлотан — первый аналог простагландина-F2 α без консервантов: преимущества в лечении больных первичной открытоугольной глаукомой. Офтальмологические ведомости. 2016; 9 (2): 59–68.
2. Егоров А. Е., Глазко Н. Г., Мовсисян А. Б. Гипотензивная и нейротропная терапия глаукомы: реалии и перспективы. Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология. 2019; 19 (3): 128–36.
3. Яни Е. В., Селиверстова К. Е. Токсико-аллергический конъюнктивит у пациентов с первичной глаукомой на фоне медикаментозного гипотензивного лечения. Фарматека. 2016; 20 (333): 12–14.
4. Еричев В. П., Амбарцумян К. Г., Федоров А. А. Клинико-морфологические доказательства влияния консервантов на поверхность глаза при первичной открытоугольной глаукоме. Национальный журнал глаукома. 2014; 13 (4): 13–22.
5. Бржеский В. В., Радхуан М. Глаукома и синдром «сухого глаза». Офтальмологические ведомости. 2014; 7 (2): 37–49.
6. Сафонова Т. Н., Федоров А. А., Забегайло А. О., Егорова Г. Б., Митичкина Т. С. Лечение синдрома «сухого глаза» при первичной глаукоме. Национальный журнал глаукома. 2015; 14 (4): 36–43.

7. Еричев В. П., Амбарцумян К. Г. Особенности гипотензивной терапии больных глаукомой препаратами, не содержащими консервантов. Практическая медицина. 2012; 4 (59): 194–6.
8. Erb C, Gast U, Schremmer D. German register for glaucoma patients with dry eye. I. Basic outcome with respect to dry eye. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008; 246 (11): 1593–601.
9. Leung EW, Medeiros FA, Weinreb RN. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. J Glaucoma. 2008; 17 (5): 350–5.
10. Астахов С. Ю., Грабовецкий В. Р., Нефедова Д. М., Ткаченко Н. В. Преимущества и недостатки гипотензивных капель без консерванта. Офтальмологические ведомости. 2011; 4 (20): 95–7.
11. Штейнер И., Бранчевский С. Проблемы дифференциальной диагностики отсроченной аллергической реакции у пациентов, получающих местное гипотензивное лечение глаукомы. Врач. 2016; (12): 62–4.
12. Алексеев И. Б., Королева И. А. Бесконсервантные гипотензивные препараты: преимущества терапии. Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология. 2019; 19 (3): 137–42.
13. Антонов А. А., Козлова И. В., Митичкина Т. С., Ведмеденко И. И. Бесконсервантная терапия глаукомы у пациентов, перенесших кераторефракционные операции. Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология. 2019; 19 (3): 165–70.
14. Лоскутов И. А., Корнеева А. В. Бесконсервантная форма фиксированной комбинации биматопроста и тимолола в повышении комплаенса и эффективности лечения пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Российский офтальмологический журнал. 2018; 11 (2): 95–101.
15. Онищенко А. Л., Димаксян М. В., Колбаско А. В., Жилина Н. М. Лечение первичной открытоугольной глаукомы β -ксололом без консерванта: оценка гипотензивного эффекта и глазной поверхности. Вестник офтальмологии. 2015; 131 (20): 76–80.
16. Егоров Е. А. Новые формы селективных β -блокаторов в лечении глаукомы. Клиническая офтальмология. 2014; 14 (3): 131–5.
17. Bourne R, Kaarniranta K, Lorenz K, Traverso CE, Vuorinen J, Ropo A. Changes in ocular signs and symptoms in patients switching from bimatoprost-timolol to tafluprost-timolol eye drops: an open-label phase IV study. BMJ Open. 2019; 9 (4).
18. Pillunat LE, Eschstruth P, Häsemeyer S, Thelen U, Foja C, Leaback R, et al. Preservative-free bimatoprost 0.03% in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension in clinical practice. Clin Ophthalmol. 2016; 12 (10): 1759–65.

References

1. Astahov SYu, Tkachenko NV. Taflotan — pervyj analog prostaglandina-F2 α bez konservantov: preimushchestva v lechenii bol'nyh pervichnoj otkrytougol'noj glaukomoj. Oftal'mologicheskie vedomosti. 2016; 9 (2): 59–68.
2. Egorov AE, Glazko NG, Movsisyan AB. Gipotenzivnaya i nejroprotektivnaya terapiya glaukomy: realii i perspektivy. Russkij medicinskij zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya. 2019; 19 (3): 128–36.
3. Yani EV, Seliverstova KE. Toksiko-allergicheskij kon'yunktivit u pacientov s pervichnoj glaukomoj na fone medikamentoznogo gipotenzivnogo lecheniya. Farmateka. 2016; 20 (333): 12–14.
4. Eriчев VP, Ambarcumyan KG, Fedorov A.A. Kliniko-morfologicheskie dokazatel'stva vliyaniya konservantov na poverhnost' glaza pri pervichnoj otkrytougol'noj glaukome. Nacional'nyj zhurnal glaukoma. 2014; 13 (4): 13–22.
5. Brzhetskij VV, Radhuan M. Glaukoma i sindrom "suhogo glaza". Oftal'mologicheskie vedomosti. 2014; 7 (2): 37–49.
6. Safonova TN, Fedorov AA, Zabegajlo AO, Egorova GB, Mitichkina TS. Lechenie sindroma "suhogo glaza" pri pervichnoj glaukome. Nacional'nyj zhurnal glaukoma. 2015; 14 (4): 36–43.
7. Eriчев VP, Ambarcumyan KG. Osobennosti gipotenzivnoj terapii bol'nyh glaukomoj preparatami, ne soderzhashchimi konservantov. Prakticheskaya medicina. 2012; 4 (59): 194–6.
8. Erb C, Gast U, Schremmer D. German register for glaucoma patients with dry eye. I. Basic outcome with respect to dry eye. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008; 246 (11): 1593–601.
9. Leung EW, Medeiros FA, Weinreb RN. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. J Glaucoma. 2008; 17 (5): 350–5.
10. Astahov Syu, Graboveckij VR, Nefedova DM, Tkachenko NV. Preimushchestva i nedostatki gipotenzivnyh kapel' bez konservanta. Oftal'mologicheskie vedomosti. 2011; 4 (20): 95–97.
11. Shtejner I, Branchevskij S. Problemy differencial'noj diagnostiki otsrochennoj allergicheskoy reakcii u pacientov, poluchajushhih mestnoe gipotenzivnoe lechenie glaukomy. Vrach. 2016; (12): 62–4.
12. Alekseev IB, Koroleva IA. Beskonservantnye gipotenzivnye preparaty: preimushchestva terapii. Russkij medicinskij zhurnal. Klinicheskaja oftal'mologija. 2019; 19 (3): 137–42.
13. Antonov AA, Kozlova IV, Mitichkina TS, Vedmedenko II. Beskonservantnaya terapiya glaukomy u pacientov, perenesshih keratorefrakcionnye operacii. Russkij medicinskij zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya. 2019; 19 (3): 165–70.
14. Loskutov IA, Korneeva AV. Beskonservantnaya forma fiksirovannoj kombinacii bimatoprosta i timolola v povyshenii komplaensa i effektivnosti lecheniya pacientov s pervichnoj otkrytougol'noj glaukomoj. Rossijskij oftal'mologicheskij zhurnal. 2018; 11 (2): 95–101.
15. Onishchenko AL, Dimaksyan MV, Kolbasko AV, Zhilina NM. Lechenie pervichnoj otkrytougol'noj glaukomy β -ksololom bez konservanta: oцена gipotenzivnogo efekta i glaznoj poverhnosti. Vestnik oftal'mologii. 2015; 131 (20): 76–80.
16. Egorov EA. Novye formy selektivnyh β -blokatorov v lechenii glaukomy. Klinicheskaya oftal'mologiya. 2014; 14 (3): 131–5.
17. Bourne R, Kaarniranta K, Lorenz K, Traverso CE, Vuorinen J, Ropo A. Changes in ocular signs and symptoms in patients switching from bimatoprost-timolol to tafluprost-timolol eye drops: an open-label phase IV study. BMJ Open. 2019; 9 (4).
18. Pillunat LE, Eschstruth P, Häsemeyer S, Thelen U, Foja C, Leaback R, et al. Preservative-free bimatoprost 0.03% in patients with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension in clinical practice. Clin Ophthalmol. 2016; 12 (10): 1759–65.