

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 Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

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.2020-02

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 30.04.2020
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)
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.2020-02

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 30.04.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
Влияние коронавирусной инфекции (COVID-19) на сердечно-сосудистую систему В. Н. Ларина, М. Г. Головкин, В. Г. Ларин Possible effects of coronavirus infection (COVID-19) on the cardiovascular system Larina VN, Golovko MG, Larin VG	
МНЕНИЕ	14
<hr/>	
О непредсказуемости результатов иммунотерапии и иммунопрофилактики COVID-19 И. В. Чеботарь, Д. А. Шагин On the unpredictability of outcomes of immunotherapy and preventive immunization against COVID-19 Chebotar IV, Shagin DA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	17
<hr/>	
Роль регуляции генов АПФ2/TMPRSS2 изоформами микроРНК кишечника в патогенезе COVID-19 С. А. Нерсисян, М. Ю. Шкурников, А. И. Осипьянц, В. И. Вечорко Role of ACE2/TMPRSS2 genes regulation by intestinal microRNA isoforms in the COVID-19 pathogenesis Nersisyan SA, Shkurnikov MYu, Osipyants AI, Vechorko VI	
МНЕНИЕ	21
<hr/>	
Стратегии дизайна РТ-ПЦР-систем и организация мониторинга SARS-CoV-2 Н. А. Кузнецова, А. А. Почтовый, М. А. Никифорова, В. А. Гушчин Strategies of RT-PCR-based assay design and surveillance of SARS-CoV-2 Kuznetsova NA, Pochtovyy AA, Nikiforova MA, Gushchin VA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	26
<hr/>	
Характеристика генотипа и фенотипа нетоксигенных штаммов <i>Corynebacterium diphtheriae</i> subsp. <i>lausannense</i> , выделенных на территории России О. Ю. Борисова, А. В. Чаплин, Н. Т. Гадуа, А. С. Пименова, И. Н. Алексеева, Г. Ф. Ракицкий, С. С. Афанасьев, Е. Е. Донских, Л. И. Кафарская Characterization of the genotype and the phenotype of nontoxigenic strains of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> subsp. <i>lausannense</i> isolated in Russian residents Borisova OYu, Chaplin AV, Gadua NT, Pimenova AS, Alexeeva IN, Rakitsky GF, Afanasiev SS, Donskikh EE, Kafarskaya LI	
МЕТОД	33
<hr/>	
Синтез линолевой кислоты, меченной ¹³ C и ¹⁴ C, для проведения диагностических дыхательных тестов заболеваний гепатобилиарной системы Я. Я. Тынько, Г. В. Морозова, Ю. К. Бирюкова, Д. А. Сивохин, Н. В. Позднякова, М. В. Зылькова, Е. С. Богданова, М. С. Смирнова, А. Б. Шевелёв Synthesis of ¹³ C- and ¹⁴ C-labeled linoleic acids for use in diagnostic breath tests for hepatobiliary system disorders Tyntio YY, Morozova GV, Biryukova YUK, Sivokhin DA, Pozdniakova NV, Zylkova MV, Bogdanova ES, Smirnova MS, Shevelev AB	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	39
<hr/>	
Трансабдоминальное ультразвуковое сканирование как скрининговый этап диагностики туберкулезного перитонита Д. В. Плоткин, О. В. Кириллова, А. В. Никаноров, М. Н. Решетников, А. О. Штыкно, Е. О. Лошкарева, Е. С. Короткова, М. В. Синицын Transabdominal ultrasound as a screening stage for the diagnosis of tuberculous peritonitis Plotkin DV, Kirillova OV, Nikanorov AV, Reshetnikov MN, Shtykhno AO, Loshkareva EO, Korotkova ES, Sinitsyn MV	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

46

Оптимизация переноса одного эмбриона у пациенток с хорошим овариальным резервом

Н. В. Сараева, Н. В. Спиридонова, М. Т. Тугушев, О. В. Шурыгина, А. И. Синецкая, А. О. Корчагин

Optimization of a single-embryo transfer in patients with good ovarian reserve

Saraeva NV, Spiridonova NV, Tugushev MT, Shurygina OV, Sinitsyna AI, Korchagin AO

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Пограничные опухоли яичников у беременных

А. А. Герасимова, М. В. Шамараква, П. А. Клименко

Borderline ovarian tumors in pregnancy

Gerasimova AA, Shamarakova MV, Klimenko PA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

61

Ультразвуковые аспекты и скрининг опухолей и опухолевидных образований яичников у пациенток репродуктивного возраста

Н. В. Спиридонова, А. А. Демур, В. О. Катюшина

Ultrasonography features and screening of ovarian masses in reproductive-age women

Spiridonova NV, Demura AA, Katyushina VO

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

67

Реактивность μ -ритма ЭЭГ у детей при имитации движений визуальных образов биологического и небиологического происхождения

А. И. Кайда, А. А. Михайлова, Е. В. Эйсмонт, Л. Л. Джаппарова, В. Б. Павленко

EEG μ -rhythm reactivity in children during imitation of biological and non-biological motion

Kaida AI, Mikhailova AA, Eismont EV, Dzhabbarova LL, Pavlenko VB

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

76

Изменение суточного ритма содержания ингибирующего лейкемию фактора в крови больных эссенциальной гипертензией

О. А. Радаева, А. С. Симбирцев, Е. В. Громова, М. С. Искандярова, С. В. Беляева

Circadian rhythms of leukemia inhibitory factor in the blood of patients with essential hypertension

Radaeva OA, Simbirtsev AS, Gromova EV, Iskandiarova MS, Belyaeva SV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

81

Медикаментозная профилактика сахарного диабета 2-го типа у пациентов с ранними нарушениями углеводного обмена:**эффективность и клинические исходы при длительном наблюдении**

В. В. Боева, А. Н. Завьялов

Preventive pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus in patients with early carbohydrate metabolism disorders:**long-term efficacy and clinical outcomes**

Boeva VV, Zavyalov AN

ВЛИЯНИЕ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ (COVID-19) НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

В. Н. Ларина ✉, М. Г. Головкин, В. Г. Ларин

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

Острые вирусные инфекции дыхательных путей могут увеличить вероятность прогрессирования имеющейся сопутствующей патологии, в том числе сердечно-сосудистого происхождения. Появление жизнеугрожающих осложнений на фоне коронавируса 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, или SARS-CoV-2), вызывающего коронавирусную болезнь 2019 (Coronavirus disease 2019, или COVID-19), обуславливает необходимость изучения кардиоваскулярных эффектов COVID-19 с целью оказания рациональной медицинской помощи пациентам, особенно старшего возраста. В статье представлен обзор литературных данных, посвященных анализу клинико-функциональных особенностей пациентов с COVID-19, в том числе имевших неблагоприятный прогноз. Уделено внимание патофизиологическим особенностям, происходящим на фоне инфекционного процесса в сердечно-сосудистой системе, факторам риска и предикторам летальности при COVID-19. Обсуждается вопрос о возможности продолжения приема ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента или антагонистов рецепторов ангиотензина II большинством пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и COVID-19.

Ключевые слова: коронавирус, сердечно-сосудистые заболевания, инфекция, тяжелый острый респираторный синдром, коронавирусная болезнь 2019, ангиотензин-превращающий фермент, SARS-CoV-2, COVID-19

Благодарности: член-корреспондент РАН, профессору, д. м. н., профессору кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России Геннадия Васильевича Порядина за ценные критические замечания.

Вклад авторов: В. Н. Ларина — разработка концепции, планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, написание текста; М. Г. Головкин и В. Г. Ларин — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Вера Николаевна Ларина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; larinav@mail.ru

Статья получена: 03.04.2020 **Статья принята к печати:** 17.04.2020 **Опубликована онлайн:** 18.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.020

POSSIBLE EFFECTS OF CORONAVIRUS INFECTION (COVID-19) ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

Larina VN ✉, Golovko MG, Larin VG

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Acute viral respiratory infections can increase the risk of progression of a pre-existing condition, including a cardiovascular pathology. Life-threatening complications of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) necessitate research into the cardiovascular effects of COVID-19 crucial for developing adequate treatment strategy for infected patients, especially those of advanced age. This article reviews the literature on the clinical and functional characteristics of patients with COVID-19, including those with poor outcomes. The article looks at the pathophysiological processes occurring in the cardiovascular system in the setting of SARS-CoV-2 infection, risk factors and death predictors. It also discusses continuation of therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in patients with COVID-19.

Keywords: coronavirus, cardiovascular diseases, infection, severe acute respiratory syndrome, coronavirus infection 2019, angiotensin-converting enzyme, SARS-CoV-2, COVID-19

Acknowledgements: the authors thank Gennady V. Poryadin, Professor at the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology (the Faculty of General Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University), DMSc and the correspondent member of RAS, for his invaluable critical comments on this paper.

Author contribution: Larina VN conceived and planned the study, analyzed the literature, interpreted the literature data, and revised the manuscript; Golovko MG and Larin VG planned the study, analyzed the literature, interpreted the literature data, and wrote the draft of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vera N. Larina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; larinav@mail.ru

Received: 03.04.2020 **Accepted:** 17.04.2020 **Published online:** 18.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.020

Коронавирусы — семейство вирусов, включающее на январь 2020 г. 40 видов РНК-содержащих вирусов, объединенных в два подсемейства, которые поражают человека и животных. Геном коронавирусов (CoV) представлен одноцепочечными (+)РНК, обладающими способностью к быстрой мутации и рекомбинации. Название семейства связано со строением вируса, шиповидные отростки которого напоминают солнечную корону. Назначение «короны» у коронавирусов связано с их специфическим механизмом проникновения через мембрану клетки путем имитации «фальшивыми молекулами» молекул, на которые реагируют трансмембранные рецепторы клеток. После того как рецептор захватывает фальшивую молекулу с «короны», он продавливается вирусом в клетку, и за ним следует РНК вируса.

Острые инфекции дыхательных путей, включая грипп, респираторно-синцитиальную инфекцию, бактериальные

пневмонии, являются общепризнанными триггерами сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), а имеющиеся исходно ССЗ в свою очередь ассоциированы с другой сопутствующей патологией и могут увеличить вероятность развития и прогрессирования инфекционного процесса.

Появление тяжелого острого респираторного синдрома на фоне коронавируса 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, или SARS-CoV-2), вызывающего коронавирусную болезнь 2019 (Coronavirus disease 2019, или COVID-19), быстро переросло в пандемию, и, как сообщалось, значительная часть пораженных вирусом пациентов имеет ССЗ [1].

Проспективное когортное обсервационное исследование ARIC (atherosclerosis risk in communities study) показало, что пациенты имеют высокую вероятность развития ишемической болезни сердца (ИБС) и

инсульта, особенно спустя 90 дней после перенесенного инфекционного процесса. Проанализировано 1312 пациентов с развитием ИБС и 712 — с инсультом, у которых в анамнезе был зафиксирован факт наличия инфекционного процесса в течение предшествующих одного-двух лет. Средний возраст пациентов составил 75 лет, среди пациентов с обострением ИБС было 57,4% мужчин, с инсультом — 54,1% женщин. Среди 1312 пациентов с ИБС 119 (9,1%) имели в анамнезе госпитальную инфекцию, 366 (27,9%) — инфекцию, развившуюся в амбулаторных условиях. Превалировали инфекции мочевыводящих путей (29%), пневмония или респираторная инфекция (27%), инфекция кожного покрова или подкожной клетчатки (11%) и сепсис (8%). Госпитальная инфекция оказалась более мощным триггером сердечно-сосудистых событий на протяжении всего периода наблюдения после перенесенной инфекции (14-й день — ОШ 12,83; 30-й день — ОШ 8,39; 42-й день — ОШ 6,24; 90-й день — ОШ 4,48) по сравнению с амбулаторной инфекцией ($p < 0,05$). Таким образом, категория госпитализированных пациентов с инфекционным заболеванием в анамнезе требует пристального внимания со стороны врачей и проведения своевременных мероприятий по вторичной профилактике ИБС и инсульта [2].

В связи с этим несомненный интерес вызывают патофизиологические изменения, происходящие в сердечно-сосудистой системе, в результате потенциальных эффектов коронавируса. Поскольку сведения о механизмах действия COVID-19 пока ограничены, анализ данных предыдущих исследований вспышек вирусной пневмонии и острого респираторного синдрома на Ближнем Востоке (middle east respiratory syndrome coronavirus, или MERS-CoV), а также сезонного гриппа поможет получить более полное представление о механизме действия коронавируса на сердечно-сосудистую систему. Понимание кардиоваскулярных эффектов COVID-19 имеет важное значение для разработки и оказания своевременной комплексной медицинской помощи пациентам, особенно старшего возраста с ССЗ.

Действие коронавируса на организм человека

Коронавирусы, получившие свое название из-за характерных особенностей строения (коронаподобные шипы на поверхности вируса), относят к подсемейству Coronaviridae, имеющего четыре группы: α , β , γ и δ CoVs по филогенетической кластеризации, из которых α и β вызывают инфекцию у человека. Коронавирусы содержат четыре основных структурных белка: белок шипа (S) (обеспечивает прикрепление к рецептору клетки хозяина и последующее слияние вируса с клеточной мембраной), белок нуклеокапсида (N), белок мембраны (M) и белок оболочки (E).

Впервые коронавирус был идентифицирован у человека (HCoV) в 1965 г. в культивируемых тканях трахеи человеческого эмбриона и до 2003 г. были распознаны лишь два вида HCoV: HCoV-229E и HCoV-OC43.

В настоящее время установлено, что семь разных штаммов CoV инфицируют человека, включая HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 и HCoV-HKU1, которые обычно вызывают саморазрешающиеся симптомы. Кроме того, коронавирус может вызывать у человека тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), средневосточный респираторный синдром (MERS-CoV) и летальный острый респираторный синдром, который вызывает недавно идентифицированный SARS-CoV-2.

Эндемичность коронавируса

Четыре типа HCoV, включая HCoV-229E (α -CoV), HCoV-NL63 (α -CoV), HCoV-OC43 (β -CoV) и HCoV-HKU1 (β -CoV), эндемичны для человека и обычно вызывают легкую респираторную инфекцию с саморазрешающимися симптомами, на долю которой приходится 15–30% острых респираторных заболеваний (ОРЗ). Как правило, данный вид инфекции встречается у лиц молодого возраста, но в старшем возрасте, особенно у пациентов, имеющих сердечно-сосудистую и бронхолегочную патологию, может служить причиной госпитализации, в том числе и экстренной [3].

Тяжелый острый респираторный синдром, вызываемый коронавирусами

Впервые вспышка SARS-CoV произошла в провинции Гуандун в южном Китае в ноябре 2002 г. [4]. Вскоре, после выделения SARS-CoV, SARS-подобные CoV были обнаружены у гималайских пальмовых цивет и енотовидных собак, причем их нуклеотидный состав на 99,8% соответствовал составу SARS-CoV, выделенных у человека [5].

SARS-CoV принадлежит к группе β -CoV и связывается с цинковой пептидазой ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2) — поверхностной молекулой для проникновения в клетку хозяина. АПФ широко распространен в организме и представляет собой интегральный белок плазматической мембраны эндотелиальных, специализированных эпителиальных, нейроэпителиальных клеток, клеток нервных окончаний и репродуктивной системы. Физиологические функции АПФ не ограничены его ролью в регуляции функций сердечно-сосудистой системы. Он участвует в метаболизме ряда биологических активных пептидов и в гематопоезе [6].

Следует отметить, что АПФ2 локализуется в эндотелиальных клетках артерий и вен, гладкой мускулатуре артериальной стенки, эпителии респираторного тракта, эпителии тонкой кишки и иммунных клетках. Подавление экспрессии АПФ2 при инфицировании SARS-CoV предположительно лежит в основе патологических изменений легочной ткани, что способствует развитию тяжелой пневмонии и острой дыхательной недостаточности.

Последующие исследования, в том числе проведенные на диких животных, доказали, что SARS-CoV мог развиваться у летучих мышей, после того как SARS-подобный CoV был идентифицирован у китайских летучих мышей семейства подковоносых, имеющих высокое сходство нуклеотидных последовательностей с таковыми у SARS-CoV, выделенных от человека (87–92%). Предположительно пальмовые циветы и енотовидные собаки выступали в роли промежуточного хозяина для амплификации SARS-CoV перед передачей его другим животным в процессе контакта с ними на рынке. Передача SARS-CoV происходит главным образом от человека к человеку при тесном контакте, механизм — воздушно-капельный (аэрозольно-аэрогенный).

Существует мнение о существовании и фекально-орального механизма передачи SARS-CoV-2, поскольку пациенты, зараженные SARS и MERS во время их вспышки, часто имели гастроинтестинальные симптомы в виде диареи и боли в животе, а РНК SARS-CoV была обнаружена в фекалиях у 14,6% пациентов с SARS и MERS [7]. У некоторых пациентов заболевание начиналось

с лихорадки и диареи до развития выраженных респираторных симптомов [8]. Исследования, проводимые *in vitro*, показали, что MERS-CoV может инфицировать и реплицировать в кишечном эпителии человека, действуя через рецептор дипептидилпептидазы-4. Исследования *in vivo* обнаружили развитие воспаления и эпителиальной дегенерации в тонком кишечнике с последующим развитием пневмонии, подтвердив, что легочная инфекция MERS-CoV была вторичной по отношению к кишечной инфекции [9].

Инкубационный период от момента контакта с заболевшим SARS-CoV-2 составляет 2–11 дней, в среднем — 5,2 (95% ДИ 4,1–7,0) дней согласно одним данным [10], до 14 дней — согласно другим данным [11].

SARS-CoV может выделяться в окружающую среду и передаваться через руки пациентов и медицинских работников, в связи с чем необходима санитарная обработка и защита носа, рта и глаз от возможного попадания инфекции [12].

Способность зараженного пациента передавать вирус другим людям определяют по базовой оценке размножения R_0 . R_0 для SARS-CoV составляет около 3, т. е. человек с SARS-CoV, вероятно, заразит трех других человек в восприимчивой популяции, для сравнения средняя R_0 для сезонного гриппа (свиной грипп, H1N1) составляет около 1,3 [13] (табл. 1).

На сегодняшний день не существует вакцины или эффективного лекарственного препарата против SARS-CoV. Лечение ТОРС включает поддерживающую симптоматическую терапию и назначение антимикробных препаратов широкого спектра действия для лечения вторичной бактериальной инфекции. Старший возраст (особенно 60 лет и старше), мультиморбидность (сахарный диабет, ССЗ, онкологические заболевания, ХОБЛ), высокий уровень лактатдегидрогеназы служат предикторами смертности при наличии SARS-CoV. Ряд авторов отмечают отсутствие значимой заболеваемости и летальности среди детей и подростков во время предыдущих вспышек SARS-CoV [14].

В то же время предварительные данные о 4226 пациентах с подтвержденным диагнозом COVID-19 в США свидетельствуют о высоком уровне смертности в группе пациентов в возрасте 85 лет и старше (10–27%). В группе пациентов в возрасте 65–84 лет смертность составляет 3–11%, в возрасте 55–64 лет — 1–3%, в возрасте 20–54 лет — менее 1%, у лиц 19 лет и моложе летальных исходов установлено не было. Однако показатели общей госпитализации и госпитализации в отделение интенсивной терапии не соответствуют статистическим данным по смертности. Госпитализации были подвержены и лица более молодого возраста и 20% смертей произошли в возрастной группе 20–64 лет, из которых 20% составили госпитализированные пациенты 20–44 лет [15].

В настоящее время существуют лишь единичные работы, в которых освещены данные о факторах риска и предикторах летальности при COVID-19. Результаты исследования за период с 25 декабря 2019 г. по 26 января

2020 г., с участием 201 пациента, медиана возраста которых составила 51 (43–60) год (среди них 63,7% мужчин), показали, что 32,8% человек имели выраженную сопутствующую патологию. Медиана длительности госпитализации составила 13 (10–16) дней, 33% пациентам потребовалась искусственная вентиляция легких (ИВЛ), а медиана времени от момента госпитализации до развития ТОРС составила 2 (1–4) дня. У большинства пациентов были выявлены отклонения со стороны лабораторных показателей: повышение уровня лактатдегидрогеназы у 98%, С-реактивного белка (СРБ) у 85,6%, интерлейкина-6 у 48,8%, D-димера у 23,3%. Возраст 65 лет и старше, нейтрофилия, органная недостаточность и нарушение гемостаза ассоциировались с развитием ТОРС и летальностью. Среди пациентов, у которых развился ТОРС, назначение метилпреднизолона ассоциировалось с более низкой летальностью (46%), чем отсутствие данного вида лечения (61,8%) (ОШ 0,38) [16].

Клинические проявления COVID-19

Среди главных симптомов COVID-19 — лихорадка, кашель, чувство нехватки воздуха (одышка, учащенное дыхание). Реже встречаются миалгии, анорексия, тошнота, слабость, боль в горле, заложенность носа, головная боль. Симптомы могут появиться через 2 дня или к 14-му дню после контакта с заболевшим. Обнаруживаемая вирусная нагрузка одинакова у пациентов с симптомами и без симптомов COVID-19, что позволяет предполагать потенциальную возможность передачи вируса от бессимптомного или малосимптомного пациента другому человеку. Наибольшая вирусная нагрузка отмечена в области носа по сравнению с глоткой. Диагноз подтверждается с помощью полимеразной цепной реакции, материалом для которой служит соскоб со слизистой верхних и нижних дыхательных путей. Случай COVID-19 считается подтвержденным при положительном результате лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 независимо от клинических проявлений. Новые серологические тесты, которые удобно и возможно использовать в домашних условиях, вероятно появятся в ближайшее время.

Потенциальные механизмы воздействия коронавирусной инфекции на сердечно-сосудистую систему

Опасность ОРВИ связана с тем, что в период эпидемий значительно возрастает смертность от хронических соматических заболеваний, особенно в группе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Данные систематического обзора 2009 г., в который вошло 42 публикации, а также 39 клинических исследований свидетельствуют о повышении риска развития инфаркта миокарда (ОШ 4,95; 95% ДИ 4,4–5,5) и инсульта (ОШ 3,2; 95% ДИ 2,8–3,6) в первые дни после возникновения ОРВИ с последующим его снижением с течением времени [17].

Таблица 1. Характеристика видов коронавирусов

Вид коронавируса	Рецептор	Инкубационный период (дни)	R_0	Наличие ССЗ, %	Уровень смертности, %
SARS-CoV	АПФ2	2–11	3	10	10
SARS-CoV-2	АПФ2	2–14	2–3	от 3,4* до 40**	0,7–8***

Примечание: * — в целом у пациентов; ** — у госпитализированных пациентов; *** — в зависимости от времени, территории, условий оказания медицинской помощи.

Гипотеза о том, что грипп может выступать в качестве провоцирующего фактора острых сердечно-сосудистых событий и летального исхода, была предложена в 1930-х гг. Тогда впервые отметили связь между сезонной активностью вируса гриппа и более высокой смертностью от всех причин, включая бронхолегочную патологию, туберкулез легких, сахарный диабет, органическую патологию сердца и геморрагический инсульт [18].

В 2004 г. был показан широкий спектр жизнеугрожающих клинических проявлений коронавирусной инфекции, включая и смерть на фоне инфаркта миокарда, который был причиной двух из пяти летальных исходов, что свидетельствует о необходимости принятия неотложных мер по лечению пациентов с ССЗ во время эпидемии вирусных инфекций [19].

Уроки предыдущих эпидемий, обусловленных коронавирусами, позволяют предположить, что вирусные инфекции могут провоцировать развитие острого коронарного синдрома, аритмий, декомпенсации сердечной недостаточности, тромбоэмболических осложнений главным образом из-за сочетания значительного системного воспалительного ответа и локализованного воспаления сосудистой стенки.

Не является исключением в этом отношении и COVID-19, который, вероятно, может изменить клинические проявления текущих ССЗ и привести к развитию дополнительных жизнеугрожающих осложнений [20].

Тяжесть и степень клинических проявлений, краткосрочные и долгосрочные сердечно-сосудистые изменения на фоне COVID-19, наряду с эффектами специфического лечения, в настоящее время не известны и подлежат тщательному изучению. Следует отметить, что во время эпидемий гриппа большинство пациентов чаще умирает именно от сердечно-сосудистых проблем, а не от вызванной вирусом пневмонии. Учитывая мощнейшую воспалительную нагрузку, вызванную COVID-19, и ранее представленные клинические данные по другим коронавирусным инфекциям, можно ожидать значительные сердечно-сосудистые осложнения на фоне COVID-19, распространенность и выраженность которых, вероятно, будет ниже у амбулаторных, негоспитализированных пациентов.

Согласно некоторым данным [21], среди 41 госпитализированного пациента с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 в 73% случаев были лица мужского пола, у 32% была сопутствующая патология в виде сахарного диабета (20%), артериальной гипертензии (АГ) (15%), других ССЗ (15%). Медиана возраста составила 49 (41–58) лет. Наиболее частыми симптомами COVID-19 оказались лихорадка (98%), кашель (76%) с выделением мокроты у 28% пациентов, миалгия или усталость (44%), головная боль (8%), кровохарканье (5%), диарея (3%). Лимфопения выявлена у 63%, одышка — у 55% пациентов. Медиана времени от начала болезни до появления одышки составила 8 (5–13) дней. Среди осложнений, помимо ТОРС (29%), отмечено острое поражение сердца воспалительного характера (12%).

Исследование с участием 1099 госпитализированных пациентов и амбулаторных пациентов, которым лабораторно был подтвержден диагноз COVID-19 (медиана возраста 47 лет, из них 42% женщин), показало, что наиболее частой сопутствующей патологией у пациентов были АГ (14,9%), сахарный диабет (7,4%) и ИБС (2,5%). Наиболее серьезными осложнениями стали ТОРС (у 3,4%) и септический шок (у 1,1%) [22].

Вирусная инфекция и вирус-индуцированные иммунные реакции в большинстве случаев лежат в основе воспалительного процесса при миокардите. Инвазия в клетку-мишень вирусной частицы, обладающей тропностью к миокарду, прямое цитопатогенное действие вируса и включение неспецифических механизмов противовирусной защиты (реализуемых макрофагами и NK-клетками) являются ведущими механизмами повреждения миокарда в острой фазе заболевания. Активированные макрофаги и другие клетки иммунной системы посредством продукции хемокинов привлекают в очаг воспаления Т- и В-лимфоциты. Последние реализуют механизмы клеточноопосредованного цитолиза и обеспечивают выработку противовирусных антител — запускается механизм апоптоза кардиомиоцитов с дальнейшей систолической дисфункцией миокарда.

Спорадические случаи аутопсии и сообщения о случаях тяжелого миокардита с систолической дисфункцией левого желудочка после перенесенного COVID-19 позволяют предположить возможность инфильтрации миокарда интерстициальными мононуклеарными воспалительными клетками [23]. Исследования кардиальных биомаркеров указывают на высокую распространенность повреждения миокарда у госпитализированных пациентов, являющегося важнейшим прогностическим фактором при COVID-19 [24].

Миокардит представляет собой полиэтиологическое заболевание. Его причиной могут быть вирусные и бактериальные агенты, а также неинфекционные факторы. Более чем в 50% случаев развитие миокардита обусловлено вирусами, среди которых особой кардиотропностью обладают парвовирусы В19, энтеровирусы Коксаки А и В, ЭCHO-вирусы, вирус краснухи, аденовирусы, вирус герпеса человека типа 6, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирус гриппа и др. [25].

Клиническая картина миокардитов разнообразна и неспецифична, а их диагностика основана на триаде анамнестических данных: остром начале заболевания, связи дебюта/обострений клинических проявлений/аритмий с инфекцией, давности менее года. К дополнительным критериям относят системные иммунные проявления, сочетание нарушений ритма и проводимости сердца, положительный эффект от стероидной терапии [26].

Опубликованы результаты наблюдения за 416 госпитализированными пациентами с COVID-19, у 57 (13,7%) из которых развился летальный исход [27]. Среди этих пациентов у 10,6% была выявлена ИБС, у 5,3% — цереброваскулярная болезнь, у 4,1% — сердечная недостаточность, у каждого пятого пациента (20%) — повышение уровня высокочувствительного тропонина. Пациенты с высоким уровнем тропонина были старше, имели больше коморбидных состояний, более высокий уровень лейкоцитов, натрийуретического пептида, СРБ, прокальцитонина и лимфопению, по сравнению с пациентами с нормальным значением тропонина. У пациентов с острым повреждением сердца воспалительного генеза, в отличие от лиц без острой кардиальной патологии, чаще возникал ТОРС (58,5% и 14,7% соответственно; $p < 0,001$) и наступала смерть (51,2% против 4,5% соответственно; $p < 0,001$). Скорректированный многофакторный анализ подтвердил остро возникшую дисфункцию сердца (ОШ 4,26) и ТОРС (ОШ 7,89) в качестве предикторов неблагоприятного прогноза пациентов с COVID-19.

Аналогичные данные представлены в другом исследовании [24], согласно которому из 187 пациентов



Рис. 1. Эффекты вирусной инфекции на сердечно-сосудистую систему и миокард

с подтвержденным диагнозом COVID-19 у 27,8% развились острые сердечно-сосудистые осложнения, приведшие к кардиальной дисфункции и нарушениям ритма, а сочетание сердечно-сосудистых осложнений с повышением высокочувствительного тропонина было связано с высокой летальностью.

Хотя точные патофизиологические механизмы, лежащие в основе миокардиального повреждения на фоне COVID-19, изучены недостаточно, существующие данные свидетельствуют о наличии генома SARS-CoV в миокарде у 35% пациентов с ТОРС. Эти данные повышают вероятность возможного прямого повреждения кардиомиоцитов вирусами. SARS-CoV-2 может иметь тот же механизм действия, что и SARS-CoV, поскольку эти два вида вирусов очень близки, но не идентичны по геному. Наличие тесной связи высокого уровня тропонина с уровнем СРБ указывает на воспалительный генез повреждения миокарда по мере прогрессирования заболевания. Вирусные частицы, распространяясь через слизистую респираторного тракта и проникая в клетки организма, могут вызвать цитокиновый шторм за счет нарушения баланса Th1 и Th2 и серии иммунных реакций, приводящих к повреждению миокарда. Высвобождение цитокинов на фоне инфекции может вызывать снижение коронарного кровотока, доставки кислорода, дестабилизацию атеросклеротических бляшек и микротромбообразование (рис. 1).

Миокардит нередко манифестирует нарушениями ритма сердца с явлениями прогрессирующей сердечной недостаточности и внезапной сердечной смертью, способных возникнуть на любом этапе заболевания.

К первым проявлениям миокардита относят слабость, повышенную утомляемость, миалгии, изредка субфебрилитет, которые обусловлены не собственно поражением миокарда, а проявлением инфекционно-воспалительного процесса. Внезапная сердечная смерть вследствие желудочковой тахикардии или фибрилляции

желудочков в результате поражения миокарда в области проводящей системы сердца, тромбоэмболические осложнения, синкопальные состояния, кардиогенный шок и острая сердечная недостаточность также относят к проявлениям миокардита. Первые клинические симптомы могут возникать на фоне или спустя несколько дней после начала ОРВИ.

Современная диагностика вирусного миокардита имеет ряд трудностей. Основным диагностическим критерием миокардита являются связь кардиальных симптомов с перенесенной инфекцией и наличие признаков воспаления. В этом случае помогает комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование пациента, а также проведение эндомиокардиальной биопсии по определенным показаниям для исключения воспалительной природы поражения сердца [28].

К сожалению, в настоящее время не существует доказательной базы в отношении эффективности ряда противовирусных препаратов и вакцин для COVID-19. Поскольку у пациентов с исходно имеющимися ССЗ высока вероятность развития их осложнений, более тяжелого течения заболевания и неблагоприятного исхода, целесообразна стратификация пациентов с COVID-19 в зависимости от основного ССЗ и его тяжести для выбора приоритетной стратегии лечения. Электрокардиографическое исследование, определение биомаркеров сердца, таких как NT-proBNP могут быть использованы в качестве инструментов контроля за клиническим состоянием и лечением.

Противоречивым остается вопрос о продолжении приема ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) или антагонистов рецепторов ангиотензина II (АПФ-2) большинством пациентов с ССЗ. Опасения по поводу этих групп лекарственных препаратов обусловлены тем, что протеазный домен АПФ-2 служит потенциальной мишенью для проникновения SARS-CoV и SARS-CoV-2 в клетки хозяина, а повышенная экспрессия АПФ-2 может



Рис. 2. Взаимодействие SARS-CoV-2 и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Инвазия белка-шипа SARS-CoV-2 в клетки (в частности, альвеоциты II порядка), происходит за счет связывания с функциональным рецептором АПФ2. После эндцитоза вирусного комплекса меняется экспрессия АПФ2, что приводит к накоплению мощнейшего вазоконстриктора ангиотензина II, и, возможно, ослаблению вазодилатирующего эффекта ангиотензина (1–7). Локальная активация системы ренин-ангиотензин-альдостерон может опосредовать реакцию повреждения легких на вирусные поражения, а повышенная экспрессия АПФ2 — усугубить повреждение легких у пациентов с COVID-19. Функция АПФ2 заключается в превращении ангиотензина I в ангиотензин (1–9) (функции изучаются) и ангиотензина II — в ангиотензин (1–7). При этом происходят инактивация ангиотензина II и синтез ангиотензина I (1–7) (способствует вазодилатации, уменьшению оксидативного стресса, фиброза). АПФ — ангиотензин-превращающий фермент; ИАПФ — ингибиторы АПФ; АРАТ-II — антагонисты рецепторов ангиотензина II; ГМК — гладкомышечные клетки

усугубить повреждение легких у пациентов с COVID-19 (рис. 2) (адаптировано из [29]).

Существует две формы АПФ2: в виде структурного трансмембранного белка с внеклеточным доменом, который служит мишенью для S-белка SARS-CoV-2, и растворимой — циркулирующего АПФ2. Инвазия SARS-CoV-2 в клетки, прежде всего альвеоциты II типа, происходит за счет связывания с протеазным доменом АПФ2. После эндоцитоза вирусного комплекса меняется экспрессия АПФ2, что приводит к усиленному накоплению мощнейшего вазоконстриктора ангиотензина II. Локальная активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) может опосредовать реакцию повреждения легких на вирусное поражение [30].

Ангиотензин (1–7) — субстрат N-домена АПФ, тормозит активность С-домена АПФ, ограничивая прессорное, вазоконстрикторное и другие действия АПГ.

Клиническая роль этого процесса в развитии осложнений COVID-19 и любой эффект от возможной модуляции рецептора АПФ2 не совсем ясны и должны быть проверены в клинических исследованиях как человеческого рекомбинантного АПФ2 (NCT04287686), так и других препаратов.

Показано, что в группе пациентов с COVID-19 и высоким уровнем тропонина продолжение приема ИАПФ/АПРАТ-II в связи с исходно имеющимися ССЗ не влияло на уровень смертности пациентов [22]. В другом исследовании был получен положительный эффект ИАПФ/АПРАТ-II у пациентов с вирусной пневмонией, поскольку они значительно уменьшали воспалительную реакцию и выброс провоспалительных цитокинов, вызванных вирусной инфекцией [31]. Благоприятный эффект ИАПФ/АПРАТ-II также может быть связан с компенсаторным увеличением АПФ2. Данных об использовании ИАПФ/АПРАТ-II у пациентов с COVID-19 пока нет и необходимы более масштабные клинические исследования.

В настоящее время, согласно позиции экспертов Европейского общества кардиологов [32], Американской ассоциации сердца [33] и Российского кардиологического общества [34], пациентам с COVID-19, ранее использовавшим ИАПГ/АРА по показаниям, необходимо продолжить их прием ввиду отсутствия доказательной базы по их неэффективности у этой категории пациентов.

В настоящее время нет экспериментальных или клинических данных, демонстрирующих положительные или отрицательные результаты применения ИАПФ/АПАР-II или других антагонистов РААС у пациентов с COVID-19 или у пациентов с COVID-19 с ССЗ в анамнезе. В случае если у пациентов с ССЗ диагностирован COVID-19, решение о лечении должно быть принято в соответствии с индивидуальными особенностями клинической картины и гемодинамики.

Активация РААС играет важнейшую роль в патогенезе многих ССЗ. Долгосрочные эффекты повышенной продукции ренина, ангиотензина II и активности симпатической нервной системы включают развитие гипертрофии миокарда левого желудочка, дислипидемии, нарушений ритма сердца, гиперкоагуляции, дисфункции эндотелия, инсулинорезистентности, метаболического синдрома. ИАПФ и АРАТ-II, изучаемые и с успехом применяемые в клинической практике на протяжении многих лет, являются препаратами первого выбора при лечении хронической сердечной недостаточности, АГ, заболеваний почек и сахарного диабета [35, 36].

Зависимое от АПФ2 проникновение SARS-CoV-2 в клетки хозяина можно блокировать мезилатом камостата, ингибитором сериновой протеазы TMPRSS2, которая используется SARS-CoV-2 для прайминга белка S. Мезилат камостата является многообещающим средством для дальнейшего тестирования [37].

Среди противовирусных препаратов оселтамивир не влияет на SARS-CoV-2, хотя предварительные

Таблица 2. Избранные клинические исследования лекарственных препаратов для профилактики и лечения пациентов с COVID-19

Препарат	Начало изучения	Предполагаемая дата завершения	Исследование ClinicalTrials.gov
Ремдесивир	Февраль 21, 2020	Апрель 1, 2023	NCT04280705
Рекомбинантный человеческий АПФ2	Февраль 2020	Апрель 2020	NCT04287686
Ремдесивир	Март 2020	Май 2020	NCT04292899
Инъекции и инфузии вакцины LV-SMENP-DS и антиген-специфичных Т-киллеров	Февраль 24, 2020	Декабрь 31, 2024	NCT04276896
Финголимод	Февраль 22, 2020	Июль 1, 2020	NCT04280588
Мезенхимальные стволовые клетки человека	Февраль 24, 2020	Февраль 1, 2021	NCT04293692
Карримизин	Февраль 23, 2020	Февраль 28, 2021	NCT04286503
Метилпреднизолон	Февраль 14, 2020	Май 30, 2020	NCT04273321
Трансплантация микробиоты	Февраль 2, 2020	Апрель 16, 2020	NCT04251767
Лозартан	Март 16, 2020	Апрель 1, 2021	NCT04312009
Вакцина 2019-nCoV (mRNA-1273)	Март 3, 2020	Июнь 1, 2021	NCT04283461
Лопинавир/ритонавир в таблетках+инъекции xiyangping	Март 14, 2020	Апрель 14, 2021	NCT04295551

исследования показали некоторую пользу от использования фавипиравира. В табл. 2 представлены некоторые препараты, изучаемые в настоящее время или находящиеся на стадии планирования их изучения у пациентов с COVID-19.

ВЫВОДЫ

Существующие данные свидетельствуют о высокой встречаемости сопутствующей патологии у пациентов с COVID-19 среднего и старшего возраста. Среди сердечно-сосудистых заболеваний преобладают АГ (около 15%), сахарный диабет (7,4–20%) и ИБС (около 2,5%). Пациенты с COVID-19 и сердечно-сосудистой коморбидностью имеют высокую вероятность развития ТОРС, септического

шока и летального исхода. Остро возникшая дисфункция сердца и ТОРС рассматриваются в качестве предикторов неблагоприятного прогноза пациентов с COVID-19.

Необходимо дальнейшее изучение особенностей скрининга, диагностики, клинических проявлений, профилактики и лечения у пациентов с COVID-19. По мере распространения болезни и появления новых данных целесообразно определить факторы риска развития сердечно-сосудистых осложнений у таких пациентов.

Возможно, что ведение регистра пациентов с COVID-19 и систематическая регистрация клинических параметров, сердечно-сосудистых и иных осложнений позволят определить современные особенности пациентов, подходы к лечению и профилактике для разработки модели риска развития осложнений.

Литература

1. Fauci AS, Lane HC, Redfield RR. Covid-19: navigating the uncharted. *N Engl J Med*. 2020. DOI: 10.1056/NEJMe2002387.
2. Cowan LT, Lutsey PL, Pankow JS, Matsushita K, Ishigami J, Lakshminarayan K. Inpatient and outpatient infection as a trigger of cardiovascular disease: the ARIC study. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7 (22): e009683-e009683. DOI: 10.1161/JAHA.118.009683.
3. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*. 2016; 24 (6): 490–502. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
4. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102 (7) 2430–2435; DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
5. Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses*. 2015; 7 (3): 996–1019. DOI: 10.3390/v7030996.
6. Nagai T, Nitta K, Kanasaki M, Kova D, Kanasaki K. The biological significance of angiotensin-converting enzyme inhibition to combat kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol*. 2015; 19 (1): 65–74.
7. Yeo C, Kaushal S, Yeo D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020; 5 (4): 335–7. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30048-0.
8. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2013; (13): 752–61.
9. Zhou J, Li C, Zhao G, et al. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Sci Adv*. 2017; (3): eaao4966.
10. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 514–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
11. Backer JA, Klinkenberg D, Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20–28 January 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25 (5): 2000062. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.2000062.
12. Otter JA, Donskey C, Yezli S, Douthwaite S, Goldenberg SD, Weber DJ. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect*. 2016; 92 (3): 235–50. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.08.027.
13. Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol*. Published online March 27, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1286.
14. Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses*. 2015; 7 (3): 996–1019. DOI: 10.3390/v7030996.
15. US Centers for Disease Control and Prevention COVID-19 Response Team. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): United States, February 12–March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Published

- online March 18, 2020. DOI: 10.15585/mmwr.mm6912e2.
16. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020 Mar 13. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>.
 17. C. Warren-Gash, et al. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9 (10): 601–10.
 18. Collins S. Excess mortality from causes other than influenza and pneumonia during influenza epidemics. *Public Health Rep.* 1932; (47): 2159–89.
 19. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. HKU/UCH SARS Study Group. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* 2003; 361 (9371): 1767–72. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13412-5.
 20. Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N Engl J Med.* 2018; 378 (4): 345–53. DOI: 10.1056/NEJMoa1702090.
 21. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395 (10223): 497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
 22. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
 23. Inciardi RM, Lupi L, Zacccone G, et al. Cardiac involvement 1 with coronavirus 2019 (COVID-19) infection. *JAMA Cardiol.* 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1096.
 24. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Association of cardiovascular disease and myocardial injury with outcomes of patients hospitalized with 2019-coronavirus disease (COVID-19). *JAMA Cardiol.* Published online March 27, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.
 25. Благова О. В., Недоступ А. В. Современные маски миокардита (от клинических синдромов к диагнозу). *Российский кардиологический журнал.* 2014; (5): 13–22. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-5-13-22>.
 26. Благова О. В., Недоступ А. В., Коган Е. А., Седов В. П., Донников А. Е., Кадочникова В. В., и др. ДКМП как клинический синдром: результаты нозологической диагностики с применением биопсии миокарда и дифференцированного лечения у вирус- положительных и вирус-негативных больных. *Российский кардиологический журнал.* 2016; (1): 7–19. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2016-1-7-19>.
 27. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Cardiac injury in patients with corona virus disease 2019. *JAMA Cardiol.* Published online March 25, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
 28. Cooper L, Baughman K, Feldman A, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology.* 2007; 50 (19): 1914–31.
 29. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel M, McMurray J, Pfeffer M, Solomon S. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. March 30, 2020; DOI: 10.1056/NEJMs2005760.
 30. Bavishi C, Maddox TM, Messerli FH. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection and Renin Angiotensin System Blockers. *JAMA Cardiol.* Published online April 03, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1282
 31. Henry C, Zaizafoun M, Stock E, Ghamande S, Arroliga AC, White HD. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2018; 31 (4): 419–23. DOI: 10.1080/08998280.2018.1499293
 32. de Simone G. Position Statement of the ESC Council on Hypertension on ACE-Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers. [https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-\(CHT\)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang](https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-(CHT)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang).
 33. HFSA/ACC/AHA Statement Addresses Concerns Re: Using RAAS Antagonists in COVID-19. <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2020/03/17/08/59/hfsa-acc-aha-statement-addresses-concerns-re-using-raas-antagonists-in-covid-19>.
 34. Шляхто Е. В., Конради А. О., Арутюнов Г. П., Арутюнов А. Г., Баутин А. Е., Бойцов С. А., и др. Руководство по диагностике и лечению болезней системы кровообращения в контексте пандемии ООУЮ-19. *Российский кардиологический журнал.* 2020; 25 (3): 3801. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3-3801.
 35. Halliday BP, Wassall R, Lota AS, et al. Withdrawal of pharmacological treatment for heart failure in patients with recovered dilated cardiomyopathy (TRED-HF): an open-label, pilot, randomised trial. *Lancet.* 2019; (393): 61–73.
 36. Thomsen M, Lewinter C, Køber L. Varying effects of recommended treatments for heart failure with reduced ejection fraction: meta-analysis of randomized controlled trials in the ESC and ACCF/AHA guidelines. *ESC Heart Failure.* 2016; (3): 235–44.
 37. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020; (181): 1–10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

References

1. Fauci AS, Lane HC, Redfield RR. Covid-19: navigating the uncharted. *N Engl J Med.* 2020. DOI: 10.1056/NEJMe2002387.
2. Cowan LT, Lutsey PL, Pankow JS, Matsushita K, Ishigami J, Lakshminarayan K. Inpatient and outpatient infection as a trigger of cardiovascular disease: the ARIC study. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7 (22): e009683-e009683. DOI: 10.1161/JAHA.118.009683.
3. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016; 24 (6): 490–502. DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
4. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005; 102 (7) 2430–2435; DOI: 10.1073/pnas.0409608102.
5. Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses.* 2015; 7 (3): 996–1019. DOI: 10.3390/v7030996.
6. Nagai T, Nitta K, Kanasaki M, Kova D, Kanasaki K. The biological significance of angiotensin-converting enzyme inhibition to combat kidney fibrosis. *Clin Exp Nephrol.* 2015; 19 (1): 65–74.
7. Yeo C, Kaushal S, Yeo D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5 (4): 335–7. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30048-0.
8. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; (13): 752–61.
9. Zhou J, Li C, Zhao G, et al. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Sci Adv.* 2017; (3): eaao4966.
10. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet.* 2020; 395 (10223): 514–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
11. Backer JA, Klinkenberg D, Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20–28 January 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25 (5): 2000062. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.2000062.
12. Otter JA, Donskey C, Yezli S, Douthwaite S, Goldenberg SD, Weber DJ. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and

- influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect.* 2016; 92 (3): 235–50. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.08.027.
13. Madjid M, Safavi-Naeini P, Solomon SD, Vardeny O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. *JAMA Cardiol.* Published online March 27, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1286.
 14. Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses.* 2015; 7 (3): 996–1019. DOI: 10.3390/v7030996.
 15. US Centers for Disease Control and Prevention COVID-19 Response Team. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): United States, February 12–March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* Published online March 18, 2020. DOI: 10.15585/mmwr.mm6912e2.
 16. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020 Mar 13. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>.
 17. C. Warren-Gash, et al. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9 (10): 601–10.
 18. Collins S. Excess mortality from causes other than influenza and pneumonia during influenza epidemics. *Public Health Rep.* 1932; (47): 2159–89.
 19. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. HKU/UCH SARS Study Group. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet.* 2003; 361 (9371): 1767–72. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13412-5.
 20. Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N Engl J Med.* 2018; 378 (4): 345–53. DOI: 10.1056/NEJMoa1702090.
 21. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395 (10223): 497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
 22. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
 23. Inciardi RM, Lupi L, Zaccone G, et al. Cardiac involvement 1 with coronavirus 2019 (COVID-19) infection. *JAMA Cardiol.* 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1096.
 24. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Association of cardiovascular disease and myocardial injury with outcomes of patients hospitalized with 2019-coronavirus disease (COVID-19). *JAMA Cardiol.* Published online March 27, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.
 25. Blagova OV, Nedostup AV. Contemporary masks of the myocarditis (from clinical signs to diagnosis). *Russian Journal of Cardiology.* 2014; (5): 13–22. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2014-5-13-22>. Russian.
 26. Blagova OV, Nedostup AV, Kogan EA, Sedov VP, Donnikov AV, Kadochnikova VV, et al. DCMP as a clinical syndrome: results of nosological diagnostics with myocardial biopsy and differentiated treatment in virus-positive and virus-negative patients. *Russian Journal of Cardiology.* 2016; (1): 7–19. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2016-1-7-19>. Russian.
 27. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Cardiac injury in patients with corona virus disease 2019. *JAMA Cardiol.* Published online March 25, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
 28. Cooper L, Baughman K, Feldman A, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology.* 2007; 50 (19): 1914–31.
 29. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel M, McMurray J, Pfeffer M, Solomon S. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. March 30, 2020; DOI: 10.1056/NEJMSr2005760.
 30. Bavishi C, Maddox TM, Messerli FH. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection and Renin Angiotensin System Blockers. *JAMA Cardiol.* Published online April 03, 2020. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1282
 31. Henry C, Zaizafoun M, Stock E, Ghamande S, Arroliga AC, White HD. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2018; 31 (4): 419–23. DOI: 10.1080/08998280.2018.1499293
 32. de Simone G. Position Statement of the ESC Council on Hypertension on ACE-Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers. [https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-\(CHT\)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang](https://www.escardio.org/Councils/Council-on-Hypertension-(CHT)/News/position-statement-of-the-esc-council-on-hypertension-on-ace-inhibitors-and-ang).
 33. HFSA/ACC/AHA Statement Addresses Concerns Re: Using RAAS Antagonists in COVID-19. <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2020/03/17/08/59/hfsa-acc-aha-statement-addresses-concerns-re-using-raas-antagonists-in-covid-19>.
 34. Shlyakho EV, Konradi AO, Arutyunov GP, Arutyunov AG, Bautin AE, Boytsov SA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of circulatory diseases in the context of the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Cardiology.* 2020; 25 (3): 3801. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3-3801. Russian.
 35. Halliday BP, Wassall R, Lota AS, et al. Withdrawal of pharmacological treatment for heart failure in patients with recovered dilated cardiomyopathy (TRED-HF): an open-label, pilot, randomised trial. *Lancet.* 2019; (393): 61–73.
 36. Thomsen M, Lewinter C, Køber L. Varying effects of recommended treatments for heart failure with reduced ejection fraction: meta-analysis of randomized controlled trials in the ESC and ACCF/AHA guidelines. *ESC Heart Failure.* 2016; (3): 235–44.
 37. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020; (181): 1–10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

О НЕПРЕДСКАЗУЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОТЕРАПИИ И ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

И. В. Чеботарь , Д. А. Шагин

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

В работе проведен анализ возможности использования иммунотерапии и иммунопрофилактики в борьбе с COVID-19. Результаты, к которым может привести профилактическое или терапевтическое применение препаратов, содержащих антитела против вируса SARS-CoV-2, на наш взгляд, неоднозначны, а взаимодействие антител с коронавирусными антигенами (S-протеинами) может повлечь за собой не только нейтрализацию вируса, но и усиление его способности проникать в клетку хозяина. В работе сделан акцент на необходимости научного доказательства эффективности и безопасности планируемых к применению методов терапии и профилактики COVID-19.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, антитела, иммунопрофилактика, иммунотерапия

Вклад авторов: авторы внесли равный вклад в написание статьи.

 **Для корреспонденции:** Игорь Викторович Чеботарь
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; nizarnn@yandex.ru

Статья получена: 21.04.2020 **Статья принята к печати:** 28.04.2020 **Опубликована онлайн:** 30.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.025

ON THE UNPREDICTABILITY OF OUTCOMES OF IMMUNOTHERAPY AND PREVENTIVE IMMUNIZATION AGAINST COVID-19


Chebotar IV , Shagin DA

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

This article analyzes the possibility of employing immunotherapy and preventive immunization to fight COVID-19. The authors think that treatment and prevention of the infection with anti-SARS-CoV-2 antibodies can have unpredictable outcomes. Although these antibodies can neutralize virus antigens (S-proteins), they also have the ability to enhance virus entry into the host cell. The article emphasizes the importance of solid evidence of efficacy and safety for candidate anti-COVID-19 therapies and protective measures.

Keywords: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, antibodies, preventive immunization, immunotherapy

Author contribution: the authors equally contributed to the manuscript

 **Correspondence should be addressed:** Igor V. Chebotar
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; nizarnn@yandex.ru

Received: 21.04.2020 **Accepted:** 28.04.2020 **Published online:** 30.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.025

На сегодняшний день одной из основных задач медицинской науки является поиск путей терапии и профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19. Среди перспективных вариантов управления коронавирусной инфекцией ученые рассматривают множество подходов. Очевидно, что самые эффективные инструменты должны быть нацелены на прямую нейтрализацию вирусной активности, включая проникновение вируса в клетку и размножение. В качестве подавляющих репликацию препаратов рассматривают субстанции, разработанные ранее для ингибирования вируса иммунодефицита человека (ритонавир, лопинавир) или вируса Эбола (ремдесивир) [1, 2]. Следует отметить, что вне зависимости от регистрации в качестве лекарственных средств (ремдесивир еще не прошел клинической апробации) их клиническая эффективность в отношении COVID-19 не имеет достоверных подтверждений [3]. Эффективность антикоронавирусных хинолинов с неясным механизмом действия также требует дополнительных доказательств.

Другое перспективное направление противодействия COVID-19 может быть связано с иммунотерапией и иммунопрофилактикой. Казалось бы, эффективность этого подхода подтверждается историей успешного применения сывороток и вакцин в борьбе со многими инфекциями, включая вирусные. Однако особенности возбудителя COVID-19 — вируса SARS-CoV-2 — требуют предельной осторожности в использовании пассивных и активных способов иммунизации.

Ниже мы попытались обосновать неоднозначность результатов, к которым может привести профилактическое или терапевтическое применение препаратов, содержащих антитела против вируса SARS-CoV-2.

Взаимодействие с вирусными S-протеинами

История изучения коронавирусов показывает, что среди поверхностных белков вириона главной мишенью для нейтрализации антителами служат открытые для взаимодействия S-протеины (spike-glycoproteins), отвечающие за соединение с рецепторами клеток-мишеней. Возможность их связывания и нейтрализации антителами была продемонстрирована на клеточных культурах и на животных в моделях тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [4, 5]. Было замечено, что применение анти-S-IgG для нейтрализации MERS-Cov приводило к закреплению в вирусной популяции клонов с мутациями генов, кодирующих S-протеин, и, как следствие, — утрате способности антител к распознаванию S-протеинов и нейтрализации коронавируса [6].

Феномен усиления проникновения вируса в клетку

К сожалению, появление нераспознаваемых антителами клонов не стало единственным недостатком пассивной

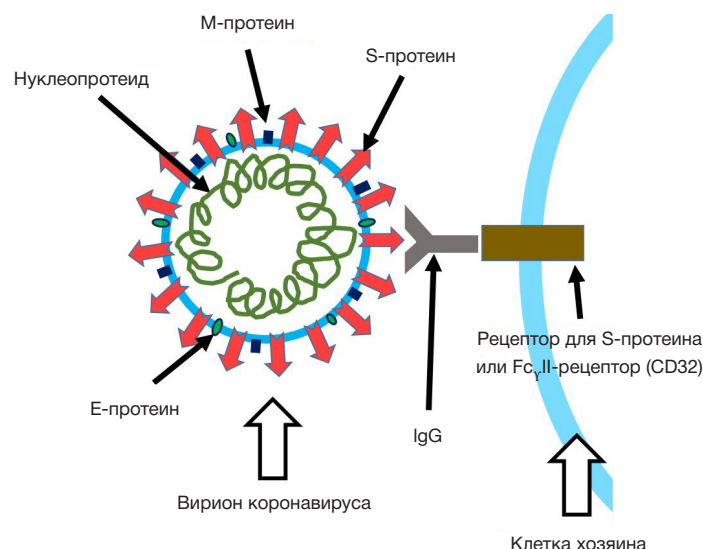


Рис. Схематичное изображение антитело-зависимого усиления проникновения коронавируса в клетку хозяина

иммунотерапии/иммунопрофилактики. Катастрофические последствия применения антител против коронавирусов проявились в форме феномена «антитело-зависимого усиления вирусного проникновения в клетку» (antibody-dependent enhancement of virus entry). Суть феномена заключается в том, что некоторые варианты IgG-антител способны ускорять процесс заражения коронавирусом за счет связывания своими Fab-фрагментами с S-протеином вириона SARS-CoV, а другими доменами (Fc либо неуставленными сайтами) — с рецепторами (ангиотензин-превращающий фермент 2, дипептидиллептидаза 4, Fcγ-рецептор) клеток хозяина (см. рис.). Такая способность антител была продемонстрирована на моделях нескольких коронавирусных инфекций, включая SARS и MERS [7, 8]. Учитывая патогенетическое сходство SARS, MERS и COVID-19, с высокой долей вероятности можно предположить, что явление IgG-зависимого усиления проникновения вируса в клетку будет иметь место также и в случае с SARS-CoV-2. Существует мнение, что IgG-усиление проникновения коронавирусов происходит не только в эпителиальные, но и в другие клетки, в том числе в иммунocyты через рецепторы для иммуноглобулинов FcγII (CD32) [9]. IgG-зависимое поражение клеток иммунной системы может быть причастно к патогенезу неконтролируемой иммуностимуляции и «цитокинового шторма» при SARS.

Считается, что далеко не всегда антитела способны усиливать проникновение коронавируса в клетку. Результат зависит от конкретного сайта связывания антитела на молекуле S-протеина, от субкласса IgG, от концентрации IgG и от уровня экспрессии клеточных рецепторов. Такую непредсказуемость необходимо учитывать, она не позволяет необдуманно использовать сыворотку переболевших COVID-19 пациентов либо искусственно полученные анти-S-антитела в качестве терапевтического средства. Все сказанное выше о неоднозначности

использования IgG-антител для борьбы с SARS-CoV-2 можно проецировать и на вакцинопрофилактику этой инфекции. После вакцинации не исключена возможность продукции поликлональных антител, среди которых будут присутствовать варианты, индуцирующие антитело-зависимое усиление заражения клеток вирусами SARS-CoV-2.

На фоне стремительного распространения COVID-19 среди ученых-разработчиков появилась негативная тенденция — любой ценой опередить конкурентов в создании средств диагностики, терапии и профилактики новой коронавирусной инфекции. Подобную ситуацию наблюдали в СССР вскоре после появления вируса иммунодефицита человека. Стремясь опередить зарубежных конкурентов, некоторые медицинские коллективы Советского Союза приняли решение лечить пациентов со СПИД иммуностимуляторами. Врачи исходили из формальной и ошибочной логики: поскольку у человека развился иммунодефицит, нужно стимулировать иммунную систему пациента. Тогда жертвами врачебных амбиций стали десятки пациентов, поскольку иммуностимулирующая терапия необратимо ускоряла прогрессирование заболевания. Хочется надеяться, что подобная история не повторится в случае с COVID-19, а используемые для лечения препараты будут применять на основе достаточной доказательной базы.

ВЫВОДЫ

1. Антитела против S-протеинов коронавирусов могут вызывать не только нейтрализацию вирионов, но и усиление вирусного проникновения в клетки хозяина.
2. Несмотря на диктуемую эпидемиологической ситуацией срочность создания эффективных мер борьбы с COVID-19, внедрение методов терапии и профилактики COVID-19 необходимо осуществлять только на основе их научно доказанной эффективности и безопасности.

Литература

1. Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Лекарственная терапия острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ)

в амбулаторной практике в период эпидемии COVID-19». Версия 5 (08.04.2020). Доступно по ссылке: <https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/986/>

- original/09042020_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_v5.pdf.
2. Cao YC, Deng QX, Dai SX. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: an evaluation of the evidence. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 2: 101647. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101647.
 3. Centers for Disease Control and Prevention. Information for Clinicians on Investigational Therapeutics for Patients with COVID-19. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov>.
 4. Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A, Hernandez HJ, Thomas WD Jr, Coccia JA, et al. Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J Infect Dis.* 2005; 191 (4): 507–14. DOI: 10.1086/427242.
 5. Chen Z, Bao L, Chen C, Zou T, Xue Y, Li F, et al. Human Neutralizing Monoclonal Antibody Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in the Common Marmoset. *J Infect Dis.* 2017; 215 (12): 1807–15. DOI: 10.1093/infdis/jix209.
 6. Kleine-Weber H, Elzayat MT, Wang L, Graham BS, Müller MA, Drosten C, et al. Mutations in the Spike Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmitted in Korea Increase Resistance to Antibody-Mediated Neutralization. *J Virol.* 2019; 93 (2): pii: e01381-18. DOI: 10.1128/JVI.01381-18.
 7. Yang ZY, Werner HC, Kong WP, Leung K, Traggiai E, Lanzavecchia A, et al. Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 (3): 797–01. DOI: 10.1073/pnas.0409065102.
 8. Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol.* 2020; 94 (5): pii: e02015-19. DOI: 10.1128/JVI.02015-19.
 9. Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J.* 2016; 22 (3 Suppl 4): 25–31.

References

1. Vremennye metodicheskie rekomendatsii Ministerstva zdavookhraneniya Rossiyskoy Federatsii «Lekarstvennaya terapiya ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy (ORVI) v ambulatornoy praktike v period epidemii COVID-19». Versiya 5 (08.04.2020). Available from: https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/986/original/09042020_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_v5.pdf.
2. Cao YC, Deng QX, Dai SX. Remdesivir for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 causing COVID-19: an evaluation of the evidence. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 2: 101647. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101647.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Information for Clinicians on Investigational Therapeutics for Patients with COVID-19. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov>.
4. Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A, Hernandez HJ, Thomas WD Jr, Coccia JA, et al. Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J Infect Dis.* 2005; 191 (4): 507–14. DOI: 10.1086/427242.
5. Chen Z, Bao L, Chen C, Zou T, Xue Y, Li F, et al. Human Neutralizing Monoclonal Antibody Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in the Common Marmoset. *J Infect Dis.* 2017; 215 (12): 1807–15. DOI: 10.1093/infdis/jix209.
6. Kleine-Weber H, Elzayat MT, Wang L, Graham BS, Müller MA, Drosten C, et al. Mutations in the Spike Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmitted in Korea Increase Resistance to Antibody-Mediated Neutralization. *J Virol.* 2019; 93 (2): pii: e01381-18. DOI: 10.1128/JVI.01381-18.
7. Yang ZY, Werner HC, Kong WP, Leung K, Traggiai E, Lanzavecchia A, et al. Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 (3): 797–01. DOI: 10.1073/pnas.0409065102.
8. Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol.* 2020; 94 (5): pii: e02015-19. DOI: 10.1128/JVI.02015-19.
9. Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J.* 2016; 22 (3 Suppl 4): 25–31.

РОЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ АПФ2/TMPRSS2 ИЗОФОРМАМИ микроРНК КИШЕЧНИКА В ПАТОГЕНЕЗЕ COVID-19

С. А. Нерсисян^{1,2}✉, М. Ю. Шкурников³, А. И. Осипьянц^{3,4}, В. И. Вечорко⁵

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии, Москва, Россия

⁴ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

⁵ Городская клиническая больница № 15 имени О. М. Филатова, Москва, Россия

Коронавирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, проникает в клетку, связываясь с поверхностными белками: ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2) и сериновой протеазой 2 (TMPRSS2). Экспрессия данных белков значительно различается в отдельных органах и тканях организма человека. Одним из механизмов регуляции их экспрессии является активность молекул микроРНК — коротких некодирующих РНК, важнейшей функцией которых является посттранскрипционная негативная регуляция экспрессии генов. Целью работы было выявить механизмы взаимодействия изоформ микроРНК и генов АПФ2 / TMPRSS2 в тканях толстого кишечника, известных высоким уровнем экспрессии указанных ферментов. Поиск взаимодействий был осуществлен средствами корреляционного анализа на публично доступной выборке данных парного мРНК / микроРНК-секвенирования тканей кишечника. В числе находок оказались такие микроРНК, как miR-30c и miR-200c, известные своей ролью в патогенезе коронавирусной инфекции и острого респираторного дистресс-синдрома. Таким образом, были установлены новые потенциальные механизмы регуляции ферментов АПФ2 и TMPRSS2 и их возможная функциональная активность в клетке, инфицированной коронавирусом.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, АПФ2, TMPRSS2, микроРНК, изоформа микроРНК, острый респираторный дистресс-синдром, коронавирус

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEFI61618X0092).

Вклад авторов: С. А. Нерсисян, М. Ю. Шкурников, А. И. Осипьянц, В. И. Вечорко — разработка концепции; С. А. Нерсисян, М. Ю. Шкурников — биоинформатический анализ; С. А. Нерсисян, М. Ю. Шкурников, А. И. Осипьянц, В. И. Вечорко — интерпретация результатов; С. А. Нерсисян — написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Ашотович Нерсисян
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117312; s.a.nersisyan@gmail.com

Статья получена: 17.04.2020 **Статья принята к печати:** 28.04.2020 **Опубликована онлайн:** 29.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.024

ROLE OF ACE2/TMPRSS2 GENES REGULATION BY INTESTINAL microRNA ISOFORMS IN THE COVID-19 PATHOGENESIS

Nersisyan SA^{1,2}✉, Shkurnikov MYu³, Osipyants AI^{3,4}, Vechorko VI⁵

¹ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center, branch of the National Medical Research Radiology Center, Moscow, Russia

⁴ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

⁵ City Clinical Hospital № 15 named after O. M. Filatov, Moscow, Russia

Coronavirus SARS-CoV-2, the cause of the COVID-19 pandemic, enters the cell by binding the cell surface proteins: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2). The expression of these proteins varies significantly in individual organs and tissues of the human body. One of the proteins' expression regulation mechanisms is based on the activity of the microRNA (miRNA) molecules, small non-coding RNAs, the most important function of which is the post-transcriptional negative regulation of gene expression. The study was aimed to investigate the mechanisms of the interactions between miRNA isoforms and ACE2/TMPRSS2 genes in the colon tissues known for the high level of expression of the described enzymes. The search for interactions was performed using the correlation analysis applied to the publicly available paired mRNA/miRNA sequencing data of colon tissues. Among the others, such miRNAs as miR-30c and miR-200c were identified known for their involvement in the coronavirus infection and acute respiratory distress syndrome pathogenesis. Thus, new potential mechanisms for the ACE2 and TMPRSS2 enzymes regulation were ascertained, as well as their possible functional activity in a cell infected with coronavirus.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, ACE2, TMPRSS2, miRNA, isomiR, acute respiratory distress syndrome, coronavirus

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation grant (project RFMEFI61618X0092).

Author contribution: Nersisyan SA, Shkurnikov MYu, Osipyants AI, Vechorko VI — study concept; Nersisyan SA, Shkurnikov MYu — bioinformatics analysis; Nersisyan SA, Shkurnikov MYu, Osipyants AI, Vechorko VI — interpretation of results; Nersisyan SA — manuscript writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan A. Nersisyan
Vavilova, 7, Moscow, 117312; s.a.nersisyan@gmail.com

Received: 17.04.2020 **Accepted:** 28.04.2020 **Published online:** 29.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.024

Быстрое и прогрессирующее распространение коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, глубоко повлияло на здоровье сотен тысяч людей, создав серьезный вызов

системам здравоохранения и глобальной экономической стабильности. Характеристики SARS-CoV-2, особенно отличающие это заболевание от гриппа, заключаются в более высокой скорости инфицирования в сочетании с

повышенным риском тяжелого течения и летальности, главным образом из-за возникновения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [1]. Механизм инфицирования клетки активно изучают во многих лабораториях. В частности, уже известно, что вирусная оболочка SARS-CoV-2 экспрессирует белок SPIKE (белок S), который содержит рецепторсвязывающий домен, взаимодействующий с внеклеточным доменом ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2) с высокой аффинностью. Дальнейшее расщепление белка S сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) для генерирования субъединиц S1 и S2 является критической стадией для слияния мембран и вирусной интернализации путем эндоцитоза с АПФ2 в легочном эпителии. Предполагается, что большую вирулентность SARS-CoV-2 по сравнению с другими коронавирусами можно объяснить тем фактом, что взаимодействие белка S1 с АПФ2 имеет заметно более сильную аффинность. Такой механизм попадания SARS-CoV-2 приводит к потере АПФ2 на поверхности клетки, тем самым способствуя хронической потере легочной функции и усилению фиброза тканей [2].

МикроРНК — это короткие некодирующие одноцепочечные РНК, состоящие в среднем из 22 нуклеотидов. Одна из важнейших внутриклеточных функций микроРНК — негативная регуляция экспрессии генов, осуществляемая путем связывания молекулы микроРНК с мРНК-мишенью по принципу комплементарности, что приводит к деградации мРНК или блокировке ее трансляции [3]. МикроРНК образуются из более длинных молекул-шпилек пре-микроРНК в результате обработки ферментами Droscha и Dicer, осуществляющими разрезание шпильки [4]. Неточность в позиции разреза приводит к появлению изоформ микроРНК, различающихся несколькими нуклеотидами на концах молекулы. Показано, что для многих микроРНК их каноническая форма экспрессирована значительно слабее, чем некоторая альтернативная изоформа [5]. Крайне важно, что у различных изоформ одной микроРНК могут быть совершенно разные гены-мишени. Это объясняется тем, что наиболее важную роль при связывании с мРНК-мишенью играет участок микроРНК со 2 по 7 нуклеотид (seed-регион) на 5'-конце молекулы [6].

Известно, что функциональные нарушения микроРНК и их изоформ связаны с большим количеством патологических состояний, в том числе с онкологическими, неврологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями [7]. Большое число работ посвящено исследованию роли микроРНК в патогенезе вирусных инфекций: одни из них направлены на изучение возможности прямого терапевтического микроРНК-воздействия на вирус [8], тогда как другие нацелены на изучение потенциальных взаимодействий микроРНК и белков, играющих ключевую роль в процессах жизнедеятельности вируса [9]. Однако вопрос о микроРНК-регуляции экспрессии АПФ2 и TMPRSS2 при COVID-19 остается малоизученным. Целью работы было выявить механизмы взаимодействия изоформ микроРНК и генов АПФ2 / TMPRSS2 в тканях толстого кишечника, известных высоким уровнем экспрессии указанных ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска изоформ микроРНК, взаимодействующих с ферментами АПФ2 и TMPRSS2, проводили интегрированный анализ парного профиля экспрессии

мРНК и микроРНК в выборке нормальных тканей толстого кишечника, в котором данный фермент экспрессирован наиболее сильно. На выбор данной ткани повлиял также тот факт, что модели кишечника зачастую используют для исследований вирусов *in vitro* [10, 11]. Так, была использована публично доступная выборка, полученная в рамках проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD), проанализированная методами мРНК- и микроРНК-секвенирования нового поколения [12]. Данные представляют из себя матрицы экспрессии тысяч мРНК и изоформ микроРНК в восьми образцах, единица экспрессии — двоичный логарифм количества ридов, попавших на соответствующий транскрипт, нормированный на верхнюю квартиль всего распределения (FPKM-UQ). Для поиска потенциальных регуляторных взаимодействий изоформ микроРНК и TMPRSS2 рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена между экспрессиями 25% самых высокоэкспрессированных изоформ с экспрессиями соответствующей мРНК, с последующей фильтрацией по *p*-value на уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия АПФ2 и TMPRSS2 на уровне мРНК оказалась очень большой: TMPRSS2 попал в список 1% наиболее экспрессированных генов, тогда как экспрессия АПФ2 располагалась между 93-м и 94-м процентилями, что полностью согласуется с литературными данными [13] (см. рис.). Применение корреляционного анализа позволило выявить микроРНК miR-21, значимо отрицательно коррелирующую с экспрессией гена АПФ2, и следующие семейства микроРНК, регулирующие TMPRSS2: let-7a / let-7d, miR-30a, miR-30c, miR-127, miR-194, miR-200c, miR-361 и miR-423. При этом микроРНК let-7a была представлена изоформой hsa-let-7a-5p, отличающейся от канонической добавлением аденина к 5'-концу молекулы, а miR-194 была представлена изоформой hsa-miR-194-3p, у которой отсутствует первый нуклеотид с 5'-конца. Отсутствие в этом списке соответствующих канонических форм микроРНК подчеркивает важность рассмотрения профиля всех изоформ микроРНК, а не только канонических.

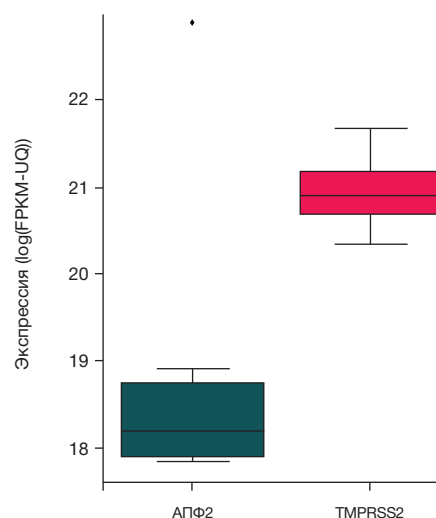


Рис. Распределение экспрессии АПФ2 и TMPRSS2 в тканях кишечника. Границы ящиков соответствуют нижнему и верхнему квартилям, вертикальный отрезок внутри ящика отображает значение медианы. Черным ромбом показан выброс

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Некоторые из найденных микроРНК уже были обнаружены в вирусологических исследованиях. Так, было показано, что экспрессия miR-30c в легких мыши значительно меняется при заражении вирусом SARS-CoV [14], что дает основание выдвинуть гипотезу о задействовании данной микроРНК в развитии болезни, вызванной вирусом. Огромный интерес представляет также микроРНК miR-200c. В 2017 г. была опубликована работа, показавшая, что эта микроРНК играет ключевую роль в патогенезе ОРДС вирусной этиологии [15]. Авторы выявили, что вирус птичьего гриппа H5N1 промотирует экспрессию miR-200c, мишенью которой служит рецептор АПФ2. Более того, были найдены вирусные белки, непосредственно отвечающие за повышение экспрессии микроРНК. Обнаружение возможности

взаимодействия данной микроРНК с ферментом TMPRSS2 подчеркивает необходимость исследований по изучению роли miR-200c в патогенезе COVID-19.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о наличии множества регуляторных взаимодействий между изоформами микроРНК и ферментами АПФ2 / TMPRSS2. Такая информация крайне актуальна ввиду ключевой функции ферментов в механике инфицирования клетки коронавирусом SARS-CoV-2. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения и экспериментальной валидации находок. В частности, возможно открытие новых направлений в терапии, основанных на контроле экспрессии АПФ2 и TMPRSS2 через микроРНК.

Литература

1. Munster VJ, Koopmans M, van Doremalen N, van Riel D, de Wit E. A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20; 382 (8): 692–4.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Mar 4. pii: S0092-8674(20)30229-4.
3. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007 May; 23 (5): 243–9.
4. Makarova JA, Shkurnikov MU, Turchinovich AA, Tonevitsky AG, Grigoriev AI. Circulating microRNAs. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Sep; 80 (9): 1117–26.
5. Lohr P, Londin ER, Rigoutsos I. IsomiR expression profiles in human lymphoblastoid cell lines exhibit population and gender dependencies. *Oncotarget*. 2014 Sep 30; 5 (18): 8790–802.
6. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007 Jun; 12 (11–12): 452–8.
7. Osip'yants AI, Knyazev EN, Galatenko AV, Nyushko KM, Galatenko VV, Shkurnikov MY, et al. Changes in the Level of Circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA Are Associated with Generalization of Prostate Cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2017 Jan; 162 (3): 379–82.
8. Leon-Icaza SA, Zeng M, Rosas-Taraco AG. microRNAs in viral acute respiratory infections: immune regulation, biomarkers, therapy, and vaccines. *ExRNA*. 2019 Feb; 1.
9. Mallick B, Ghosh Z, Chakrabarti J. MicroRNome analysis unravels the molecular basis of SARS infection in bronchoalveolar stem cells. *PLoS One*. 2009 Nov 13; 4 (11): e7837.
10. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo2 cells in microfluidic chip. *BioChip J*. 2016 Jul; 10: 215–20.
11. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol*. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19.
12. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18; 487 (7407): 330–7.
13. Vaarala MH, Porvari KS, Kellokumpu S, Kyllönen AP, Vihko PT. Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues. *J Pathol*. 2001 Jan; 193 (1): 134–40.
14. Peng X, Gralinski L, Ferris MT, Frieman MB, Thomas MJ, Proll S, et al. Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection. *mBio*. 2011 Nov 15; 2 (6).
15. Liu Q, Du J, Yu X, Xu J, Huang F, Li X, Zhang C, Li X, et al. miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell Discov*. 2017 Jun 27; 3: 17021.

References

1. Munster VJ, Koopmans M, van Doremalen N, van Riel D, de Wit E. A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20; 382 (8): 692–4.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Mar 4. pii: S0092-8674(20)30229-4.
3. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007 May; 23 (5): 243–9.
4. Makarova JA, Shkurnikov MU, Turchinovich AA, Tonevitsky AG, Grigoriev AI. Circulating microRNAs. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Sep; 80 (9): 1117–26.
5. Lohr P, Londin ER, Rigoutsos I. IsomiR expression profiles in human lymphoblastoid cell lines exhibit population and gender dependencies. *Oncotarget*. 2014 Sep 30; 5 (18): 8790–802.
6. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007 Jun; 12 (11–12): 452–8.
7. Osip'yants AI, Knyazev EN, Galatenko AV, Nyushko KM, Galatenko VV, Shkurnikov MY, et al. Changes in the Level of Circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA Are Associated with Generalization of Prostate Cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2017 Jan; 162 (3): 379–82.
8. Leon-Icaza SA, Zeng M, Rosas-Taraco AG. microRNAs in viral acute respiratory infections: immune regulation, biomarkers, therapy, and vaccines. *ExRNA*. 2019 Feb; 1.
9. Mallick B, Ghosh Z, Chakrabarti J. MicroRNome analysis unravels the molecular basis of SARS infection in bronchoalveolar stem cells. *PLoS One*. 2009 Nov 13; 4 (11): e7837.
10. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo2 cells in microfluidic chip. *BioChip J*. 2016 Jul; 10: 215–20.
11. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems

- biology. BMC Syst Biol. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19.
12. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012 Jul 18; 487 (7407): 330–7.
13. Vaarala MH, Porvari KS, Kellokumpu S, Kyllönen AP, Vihko PT. Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues. J Pathol. 2001 Jan; 193 (1): 134–40.
14. Peng X, Gralinski L, Ferris MT, Frieman MB, Thomas MJ, Proll S, et al. Integrative deep sequencing of the mouse lung transcriptome reveals differential expression of diverse classes of small RNAs in response to respiratory virus infection. mBio. 2011 Nov 15; 2 (6).
15. Liu Q, Du J, Yu X, Xu J, Huang F, Li X, Zhang C, Li X, et al. miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. Cell Discov. 2017 Jun 27; 3: 17021.

СТРАТЕГИИ ДИЗАЙНА РТ-ПЦР-СИСТЕМ И ОРГАНИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА SARS-COV-2

Н. А. Кузнецова¹✉, А. А. Почтовый^{1,2}, М. А. Никифорова¹, В. А. Гушчин^{1,2}¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Высокая плотность населения в городах с хорошо развитыми транспортными путями сообщения и туризмом может привести к распространению вирусных инфекций по всему миру в считанные дни. Новый коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной заболевания COVID-19 уже более 2 000 000 человек и унес жизни более 156 000 человек по всему миру. Одной из основных причин такого стремительного развития пандемии послужило отсутствие диагностических тест-систем для выявления SARS-CoV-2. Применение молекулярно-биологических методов дает возможность быстро обнаруживать РНК вируса SARS-CoV-2 в клинических образцах, что позволяет уточнять диагноз у пациентов с тяжелыми формами течения болезни, а также выявлять людей с бессимптомным течением заболевания или находящихся в инкубационном периоде. Наиболее доступным, высокочувствительным и специфичным методом идентификации НК SARS-CoV-2 в биологических образцах является ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Текущая вспышка COVID-19 в России требует наличия как можно большего количества ПЦР-РВ-тест-систем для проведения масштабных скрининговых исследований с целью выявления инфицированных лиц, своевременное выявление которых является крайне важным условием успешного предотвращения распространения вируса.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, диагностика, РТ-ПЦР, тест-системы, коронавирус**Вклад авторов:** авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.✉ **Для корреспонденции:** Надежда Анатольевна Кузнецова
ул. Гамалеи, д. 16, стр. 1, г. Москва, 123098; nadyakuznetsova0@gmail.com**Статья получена:** 21.04.2020 **Статья принята к печати:** 28.04.2020 **Опубликована онлайн:** 30.04.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.026

STRATEGIES OF RT-PCR-BASED ASSAY DESIGN AND SURVEILLANCE OF SARS-COV-2

Kuznetsova NA¹✉, Pochtovyy AA^{1,2}, Nikiforova MA¹, Gushchin VA^{1,2}¹ Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow² Lomonosov Moscow State University, Moscow

High population density in the cities with bustling transportation systems and a thriving tourism industry can promote the global spread of a viral infection in a matter of days. The novel SARS-CoV-2 coronavirus has already infected over 2,000,000 people worldwide and caused upwards of 156,000 deaths. One of the factors driving the rapid unfolding of the pandemic is the absence of diagnostic tests for SARS-CoV-2 detection. Molecular techniques allow SARS-CoV-2 RNA to be quickly detected in clinical samples, aiding the differential diagnosis in severely ill patients and facilitating identification of asymptomatic carriers or presymptomatic individuals. Real-time PCR with fluorescent hybridization is the most available, highly sensitive and specific technique for SARS-CoV-2 RNA detection in biological samples. More RT-PCR assay kits are needed for mass screening, which will help to identify infected individuals and contain the current outbreak of COVID-19 in Russia.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnostics, RT-PCR, assay kits, coronavirus**Author contribution:** the authors equally contributed to the manuscript.✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda A. Kuznetsova
Gamalei, 16, str. 1, Moscow, 123098; nadyakuznetsova0@gmail.com**Received:** 21.04.2020 **Accepted:** 28.04.2020 **Published online:** 30.04.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.026

Появление и быстрое распространение нового коронавируса SARS-CoV-2 стало причиной пандемии заболевания COVID-19 [1]. Менее чем за три месяца с момента проникновения инфекции за пределы Китая подтверждено более 2 млн инфицированных и более 150 тыс. людей скончались [2]. В условиях полного отсутствия средств специфической профилактики и лечения изоляция и карантин стали единственно доступными средствами противодействия новой инфекции [3]. Способность коронавируса к передаче в инкубационном периоде сделала методы молекулярной диагностики на основе амплификации нуклеиновых кислот основным инструментом мониторинга и контроля над ситуацией [4]. Так, КНР, Сингапур, Южная Корея и Германия, сумевшие наладить широкое тестирование граждан и своевременное выявление носителей SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР), добились стабилизации эпидемической ситуации и сохранили резервы системы

здравоохранения для лечения наиболее тяжелобольных. В свою очередь Италия, Швеция и США, запоздавшие с внедрением массового скрининга или отрицавшие его действенность на первом этапе, в настоящий момент испытывают серьезные трудности.

Молекулярно-биологические методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и позволяют не только быстро обнаружить РНК вируса у тяжелобольных пациентов, но и выявлять людей с бессимптомным течением заболевания, что особенно важно для предотвращения распространения вируса [5, 6]. Китайские ученые и ВОЗ оперативно распространили свои рекомендации с указанием последовательностей праймеров и зондов для выявления SARS-CoV-2, разработанные на основе первых полногеномных секвенсов, однако в последующие месяцы были получены тысячи полных геномов, благодаря которым уже разработано множество вариантов ПЦР-тест-систем. В этой работе рассмотрены основные подходы к

дизайну ПЦР систем и особенности их использования для обнаружения SARS-CoV-2.

Основой качественной диагностики является правильно собранный и информативный биологический материал. При выборе типа материала критичными являются знания тканевой тропности вируса. Так, на успешность выявления SARS-CoV-2 методом ПТ-ПЦР влияют источник и способ сбора биологического материала. Исследования показывают, что информативность биологического материала для выявления SARS-CoV-2 можно расположить по убыванию в следующем порядке: образцы жидкости бронхоальвеолярного лаважа, мокрота, мазки из носа, биопсия, мазки из глотки, кал и кровь (1% случаев) [7]. Однако для скрининговых исследований самым доступным и информативным типом материала являются мазки из носа и ротоглотки [8, 9]. Правильное взятие мазка не только позволяет получить качественный материал для исследования, но и обеспечивает безопасность медицинского персонала [10].

Основным методом молекулярно-генетического анализа, позволяющего выявлять SARS-CoV-2, является ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [6, 11, 12]. Это наиболее доступный, высокочувствительный и специфичный метод. Использование ПЦР-тест-систем помогает проводить масштабные скрининговые исследования с целью выявления инфицированных лиц, а также определять вирусную нагрузку у каждого пациента.

Подходы к созданию тест-систем

На сегодняшний день опубликовано уже несколько десятков работ исследователей разных стран с описанием олигонуклеотидов и ПЦР-РВ-тест-систем для идентификации SARS-CoV-2. Анализ данных работ показывает, что существуют разные подходы к созданию ПЦР-РВ-тест-систем для выявления SARS-CoV-2. Наиболее простой и доступный вариант дизайна — это моноплексные тесты, в которых олигонуклеотиды выбраны на один ген вируса. Более сложные модификации позволяют создавать мультиплексные варианты, в которых олигонуклеотиды

выбраны на разные гены. В последнем случае праймеры и зонды могут иметь разную специфичность или позволяют дискриминировать SARS-CoV-2 от родственных коронавирусов и других респираторных инфекций. Для выбора праймеров и зондов на SARS-CoV-2 чаще всего используют гены вирусного нуклеокапсида (*N1* и *N2*), ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (*RdRP*) и ген Е белка оболочки SARS-CoV-2. Так, для выявления пациентов с COVID-19 CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Центр по контролю и профилактике заболеваний США) рекомендует сначала провести скрининг на наличие гена Е, нуклеотидная последовательность которого не отличается от таковой у вируса SARS, а затем дифференцировать SARS от SARS-CoV-2 при помощи олигонуклеотидов на ген *RdRP* [13]. В соответствии с протоколом ВОЗ образцы тестируют на наличие генов *N* и *Orf1b*, но предлагаемые олигонуклеотиды не позволяют различать SARS-CoV-2 и SARS, поэтому для окончательной идентификации вирусов рекомендуется использовать секвенирование [14]. В табл. 1 приведены открытые для всех желающих последовательности праймеров и зондов, рекомендуемые ВОЗ и CDC.

Особенности использования существующих тест-систем

Высокая востребованность привела к появлению в России большого разнообразия различных коммерческих тест-систем, многие из которых уже получили регистрационное удостоверение изделия медицинского назначения (табл. 2). На сегодняшний день на российском рынке уже более десятка ПЦР-РВ-тестов и у каждого есть свои особенности. Так, для моноплексных вариантов характерна более высокая чувствительность (до 500 ГЭ/мл) по сравнению с мультиплексными вариантами (от 1000 до 10000 ГЭ/мл), тогда как мультиплексные наборы (несколько генов SARS-CoV-2) позволяют избежать появления ложноотрицательных результатов, обусловленных вариативностью вируса (появление мутаций на месте посадки олигонуклеотидов). Необходимо также отметить, что иногда результаты, полученные при помощи тест-систем, выявляющих несколько

Таблица 1. Олигонуклеотиды, рекомендованные ВОЗ и CDC для диагностики COVID-19

	Локус	Олигонуклеотиды	Детектируют
ВОЗ	ORF1b-nsp14	HKU-ORF1b-nsp14F TGGGGYTTTACRGGTAACCT HKU-ORF1b-nsp14R AACRCGCTTAACAAGCACTC HKU-ORF1b-nsp141P FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	N gene	HKU-NF TAATCAGACAAGGAAGTATTA HKU-NR CGAAGGTGTGACTTCCATG HKU-NP FAM-GCAAATTGTGCAATTTCGG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
CDC	envelope protein	E_Sarbeco_F ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT E_Sarbeco_R ATATTGCAGCAGTACGCACACA E_Sarbeco_P1 FAM-ACACTAGCCATCTTACTGCGCTTCG-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	N gene	N_Sarbeco_F CACATTGGCACCCGCAATC N_Sarbeco_R GAGGAACGAGAAGAGGCTTG N_Sarbeco_P FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2
	RdRP gene	RdRp_SARSr-F GTGARATGGTCATGTGTGGCGG RdRp_SARSr-R CARATGTTAAASACACTATTAGCATA RdRp_SARSr-P1 FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BHQ1 RdRp_SARSr-P2 FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ1	SARS coronavirus BetaCoV/bat Bat SARS-like coronavirus SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 BetaCoV/bat

Таблица 2. Наборы для выявления РНК SARS-CoV-2

Регистрационный номер и дата регистрации	Наименование медицинского изделия	Производитель	Заявленная чувствительность (ГЭ/мл)	Длительность амплификации
РЗН 2020/10088 от 17.04.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени	ООО «ЭВОТЭК-МИРАЙ ГЕНОМИКС»	10 000	25 мин
РЗН 2020/10064 от 16.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX-SARS-CoV-2»	ООО «Система-БиоТех»	1000	1 ч 40 мин
РЗН 2020/9957 от 02.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»	АО «ГЕНЕРИУМ»	1000	25 мин
РЗН 2020/9948 от 01.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и РВ-ПЦР (SARS-CoV-2/SARS-CoV)	ООО «ДНК-Технология ТС»	1000	50 мин
РЗН 2020/10032 от 14.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SARS-CoV-2-ПЦР»	ООО «МедипалТех»	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9904 от 27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «ПОЛИВИР SARS-CoV-2»	ООО НПФ «Литех»	1000	1 ч 30 мин
РЗН 2020/9765 от 27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом ПЦР «АмплиТест SARS-CoV-2»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9896 от 27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеплБест РНК SARS-CoV-2»	АО «Вектор-Бест»	1000	1 ч 20 мин
41956 РЗН 2014/1987 от 25.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov родственных вирусов (Severe acute respiratory syndrome coronavirus, Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2), в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CoVs-Bat-FL» по ТУ 9398-224-01897593-2013	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	1000	1 ч 20 мин
РЗН 2020/9845 от 20.03.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени	ООО «СМАРТЛАЙФКЕА»	10 000	25 мин
41390 РЗН 2020/9700 от 14.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS/COVID-19 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	нет данных	нет данных
41240 РЗН 2020/9677 от 11.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРв-2019-nCoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	нет данных	нет данных

вирусных генов, довольно сложно интерпретировать, что может быть связано с недостаточной оптимизацией олигонуклеотидного состава. Тем не менее заявленная чувствительность всех российских коммерческих наборов составляет 1000 ГЭ/мл. Кроме того, независимо от количества специфичных вирусных мишеней в тест-системе, обязательно наличие внутреннего контроля, он может быть как эндогенным (ДНК человека), так и экзогенным (например, РНК-фар). Внутренний контроль позволяет контролировать все этапы протокола от экстракции нуклеиновых кислот до ПЦР.

Несмотря на очевидную необходимость внутреннего контроля не все системы его включают. По техническим причинам такого контроля лишены наборы, основанные на изотермической амплификации, например петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, или LAMP). Основные преимущества таких тестов — быстрота получения ответа (до 40 мин), отсутствие необходимости в хорошо оборудованной лаборатории и возможность проводить тестирование у постели больного (не требуется термоциклер). Чувствительность тестов на основе LAMP может достигать 1–3 копий РНК

в реакцию [15]. Однако существующие коммерческие образцы не «дотягивают» до заявленной чувствительности (см. табл. 2).

Полногеномное секвенирование

Наиболее информативным методом молекулярно-генетического анализа остается секвенирование. Особенностью пандемии, вызванной SARS-CoV-2, стало наличие самого большого количества последовательностей полного генома коронавируса, полученных за короткий период времени. Полногеномное секвенирование никогда не было так близко к клиническому применению, как в случае пандемии COVID-19. Существует несколько подходов для полногеномного секвенирования SARS-CoV-2. Классический метод — экстракция нуклеиновых кислот из носоглоточных и/или ротоглоточных мазков и дальнейшее истощение рибосомной РНК-хозяина с приготовлением библиотек и последующим секвенированием по стандартным протоколам производителя. Однако данный метод требует достаточного количества РНК вируса и большого количества прочтений. При малой вирусной

нагрузке возможна наработка вируса на культурах клеток. Для этого проводят пассирование вируса с использованием клеточных линий Vero V, Vero E6, LLC-MK2 и ряда других. Данный подход был успешно применен в некоторых лабораториях, в том числе в Референс-центре по коронавирусной инфекции (код доступа к базе GISAID: EPI_ISL_421275).

Подходом, альтернативным культивированию на клеточных линиях, является полногеномная амплификация вируса SARS-CoV-2. На сегодняшний день было разработано несколько целевых панелей, позволяющих проводить полногеномное секвенирование SARS-CoV-2. Одна из них — Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel (Thermo Fisher Scientific; США). Данная панель состоит из двух пулов праймеров для амплификации фрагментов длиной 125–275 пар оснований [16].

Другая панель была разработана Paragon Genomics Inc (США), она включает два пула праймеров и позволяет амплифицировать фрагменты длиной 99 пар оснований [17]. Потенциальная эффективность обнаружения SARS-CoV-2 с помощью панели от Paragon Genomics Inc — 1,15 копии вируса (с вероятностью 95%). Совместное использование двух перекрывающихся пулов праймеров позволит обеспечить полное покрытие всего генома вируса, и расчетный предел обнаружения составляет 0,29 копии (с вероятностью 95%). Информация о пределе обнаружения SARS-CoV-2 с использованием панели AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel пока отсутствует.

Еще один из методов — протокол для пробоподготовки и биоинформатического анализа от ARTIC [18]. Он разработан для секвенирования на платформе Oxford Nanopore и позволяет получить результаты в течение 8 ч.

ВЫВОДЫ

Методы, основанные на молекулярно-генетическом анализе нуклеиновых кислот, позволяют организовать мониторинг и надзор за распространением SARS-CoV-2, что является важной составляющей борьбы с пандемией COVID-19. Главное их преимущество по сравнению с термометрией или выявлением симптомов — возможность выявлять бессимптомных носителей и инфицированных в инкубационный период. Несмотря на большое разнообразие дизайнов, классическая ПЦР-РВ остается наиболее предпочтительным методом. Совершенствование изотермических способов позволит сделать молекулярные методы анализа еще более доступными и эффективными для мониторинга и контроля над биологическими угрозами в будущем. Секвенирование генома вируса позволяет накопить информацию о его изменениях и использовать ее при оптимизации праймеров для ПЦР-РВ, разработки вакцин, изучения эволюции вируса, а также для реконструкции эпидемиологических процессов, способствующих развитию эпидемии. Используя различные платформы для секвенирования, можно проводить анализ не только в стенах лаборатории, но и непосредственно в клиниках и получать более оперативную информацию.

Литература

- Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020; 382: 1199–207.
- Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
- Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020; eabb5793.
- He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020; Apr 13: [Epub ahead of print]. DOI: 10.7326/M20-1301.
- Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-Maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*. 2020 Mar 1. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-pharmaceutical-analysis>.
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020 Mar 11.
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr; 20 (4): 411–2.
- Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19; 382 (12): 1177–9.
- Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen April 17, 2020. DOI: 10.1056/NEJMvcm2010260.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Apr; 13.
- Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Feb 26; 9 (3): pii E623.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan; 25 (3).
- Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4.
- R Lu, X Wu, Z Wan, Y Li, L Zuo, J Qin, et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica*. 2020; c. 1.
- Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/microbial-sequencing/microbial-identification-ion-torrent-next-generation-sequencing/viral-typing/coronavirus-research.html>.
- Li C, et al. High sensitivity detection of coronavirus SARS-CoV-2 using multiplex PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic method. *bioRxiv*. 2020.
- Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/article-network-provides-protocol-rapid-accurate-sequencing-novel-coronavirus-ncov-2019>.

References

1. Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020; 382: 1199–207.
2. Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
3. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science*. 2020; eabb5793.
4. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
5. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020; Apr 13: [Epub ahead of print]. DOI: 10.7326/M20-1301.
6. Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-Maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*. 2020 Mar 1. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-pharmaceutical-analysis>.
7. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020 Mar 11.
8. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr; 20 (4): 411–2.
9. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19; 382 (12): 1177–9.
10. Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen April 17, 2020. DOI: 10.1056/NEJMvcm2010260.
11. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2020 Apr; 13.
12. Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Feb 26; 9 (3): pii E623.
13. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan; 25 (3).
14. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4.
15. R Lu, X Wu, Z Wan, Y Li, L Zuo, J Qin, et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virologica Sinica*. 2020; c .1.
16. Available from: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/microbial-sequencing/microbial-identification-ion-torrent-next-generation-sequencing/viral-typing/coronavirus-research.html>.
17. Li C, et al. High sensitivity detection of coronavirus SARS-CoV-2 using multiplex PCR and a multiplex-PCR-based metagenomic method. *bioRxiv*. 2020.
18. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/article-network-provides-protocol-rapid-accurate-sequencing-novel-coronavirus-ncov-2019>.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПА И ФЕНОТИПА НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* SUBSP. *LAUSANNENSE*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

О. Ю. Борисова^{1,2}✉, А. В. Чаплин^{1,2}, Н. Т. Гадуа¹, А. С. Пименова¹, И. Н. Алексеева³, Г. Ф. Ракицкий³, С. С. Афанасьев¹, Е. Е. Донских², Л. И. Кафарская²

¹ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского, Москва, Россия

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

³ Краевая клиническая психиатрическая больница, Хабаровск, Россия

В 2018 г. на основании полногеномных данных появились публикации о наличии двух монофилетических кластеров внутри вида *C. diphtheriae*, что позволяет дифференцировать этот вид на два подвида: *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* и *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. Целью работы было описать генотип и фенотип двух нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2017–2018 гг. с профилактической целью, которые на основании совокупности результатов множества методов могут быть отнесены к *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. В исследовании использовали микробиологические и молекулярно-генетические методы, а также биоинформатический поиск подвид-специфичных генов в публично доступных геномах *C. diphtheriae*. Выделенные штаммы имели характерные для *C. diphtheriae* морфо-культуральные свойства и биохимическую характеристику. В МЛСТ штаммы принадлежали к сиквенс-типу ST199, входящему в клональный комплекс, ассоциированный с subsp. *lausannense*. С использованием ПЦР были показаны наличие *ptsl* (гена, кодирующего фосфоенолпируват-белок фосфотрансферазы) и отсутствие *narG* (гена, кодирующего синтез субъединиц нитратредуктазы) у двух исследуемых штаммов *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* и противоположная картина — у штаммов *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae*. Была экспериментально подтверждена способность выделенных штаммов подвида *lausannense* обрабатывать N-ацетилглюкозамин. Полученные результаты расширяют представления о биологическом разнообразии вида *C. diphtheriae* и свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований по оценке распространенности этих микроорганизмов и изучению их патогенного потенциала.

Ключевые слова: дифтерия, нетоксигенные *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *lausannense*, мультилокусное секвенирование, филогенетический анализ

Вклад авторов: О. Ю. Борисова — молекулярно-генетические исследования, анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи; А. В. Чаплин — филогенетический анализ, анализ данных, подготовка рукописи; Н. Т. Гадуа и А. С. Пименова — микробиологические исследования, подготовка рукописи; И. Н. Алексеева и Г. Ф. Ракицкий — обследование пациентов и первичная идентификация, подготовка рукописи; С. С. Афанасьев — молекулярно-генетические исследования, подготовка рукописи; Е. Е. Донских — анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи; Л. И. Кафарская — анализ данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Ольга Юрьевна Борисова
ул. Адмирала Макарова, д. 10, г. Москва, 125212; olgaborisova@mail.ru

Статья получена: 09.02.2020 Статья принята к печати: 28.02.2020 Опубликовано онлайн: 18.03.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.015

CHARACTERIZATION OF THE GENOTYPE AND THE PHENOTYPE OF NONTOXIGENIC STRAINS OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* SUBSP. *LAUSANNENSE* ISOLATED IN RUSSIAN RESIDENTS

Borisova OYu^{1,2}✉, Chaplin AV^{1,2}, Gadua NT¹, Pimenova AS¹, Alexeeva IN³, Rakitsky GF³, Afanasiev SS¹, Donskikh EE², Kafarskaya LI²

¹ G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Regional Clinical Psychiatric Hospital, Khabarovsk, Russia

In 2018, a few sequencing studies were published revealing the existence of two monophyletic clusters within the *C. diphtheriae* species, meaning that this species can be divided into two subspecies: *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* and *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. The objective of our study was to describe the genotype and the phenotype of 2 nontoxigenic *C. diphtheriae* strains isolated in Russia in 2017–2018, which were classified by us as *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* based on the aggregated data yielded by a variety of techniques, including microbiological and molecular genetic techniques, as well as a bioinformatic search for subspecies-specific genes in the publicly available genomes of *C. diphtheriae*. The isolated strains had morphological and biochemical characteristics of *C. diphtheriae*. The strains were assigned to the MLST type ST199 included in the clonal complex associated with subsp. *lausannense*. PCR revealed that both analyzed strains of *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* carried the *ptsl* gene encoding phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase and did not carry the *narG* gene encoding the synthesis of nitrate reductase subunits, whereas the strains of *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* had the *narG* gene and did not have *ptsl*. We experimentally proved the ability of *lausannense* strains to ferment N-acetylglucosamine. Our findings expand the knowledge of the biological diversity of *C. diphtheriae* and indicate the need for estimating the spread of these microorganisms in Russia, as well as their pathogenic potential.

Keywords: diphtheria, nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium diphtheriae* subsp. *lausannense*, multilocus sequence typing, phylogenetic analysis

Author contribution: Borisova OYu carried out molecular genetic tests, analyzed the literature and the obtained data, contributed to manuscript preparation; Chaplin AV performed phylogenetic analysis, analyzed the experimental data and contributed to manuscript preparation; Gadua NT, Pimenova AS carried out microbiological tests and contributed to manuscript preparation; Alexeeva IN, Rakitsky GF examined the patients on admission and contributed to manuscript preparation; Afanasiev SS conducted molecular genetic tests and contributed to manuscript preparation; Donskikh EE analyzed the literature and the experimental data and contributed to manuscript preparation; Kafarskaya LI analyzed the experimental data and contributed to manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Informed consent was obtained from all participants.

✉ Correspondence should be addressed: Olga Yu. Borisova
Admiral Makarova, 10, Moscow, 125212; olgaborisova@mail.ru

Received: 09.02.2020 Accepted: 28.02.2020 Published online: 18.03.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.015

Возбудителем дифтерии являются токсигенные штаммы *Corynebacterium diphtheriae*, в геном которых интегрирована ДНК бактериофага, содержащая ген токсина. Передача возбудителя происходит, как правило, воздушно-капельным путем от человека к человеку с развитием классической дифтерии зева и/или носа.

Благодаря программам массовой иммунизации заболеваемость дифтерией в мире за последнее столетие резко снизилась [1]. В России в настоящее время в условиях поддержания высокого уровня привитости (95% и более) достигнута стабилизация заболеваемости [2]. В 2017 г. случаи заболевания дифтерией не регистрировали, выявлено два случая бактерионосительства; в 2018 г. зарегистрировано четыре случая заболевания и три случая бактерионосительства; за 9 месяцев 2019 г. — три случая заболевания и два случая бактерионосительства [3]. При этом за последние годы не было зарегистрировано как вторичных случаев в очагах, так и летальных исходов. В структуре клинических форм преобладают легкие локализованные формы дифтерии.

Однако актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев заболеваний по сей день сохраняется, так как утрачивается опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии; сохраняется резервуар возбудителя в форме бактерионосительства; эпидемический процесс протекает среди привитого населения [3].

В последнее время можно наблюдать рост инфекций, вызванных нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*, с атипичными клиническими проявлениями, включая фарингит, инфекции дыхательных путей, эндокардит, остеомиелит, септический артрит или кожные инфекции [4–8].

На основе биохимического фенотипического тестирования *C. diphtheriae* исторически классифицировали на четыре биовара: *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti* [9, 10]. Однако штаммы *C. diphtheriae* в пределах определенного биовара могут быть генетически более отдаленными [11, 12]. Поэтому геномика не поддерживает использование биоваров для надежной классификации штаммов *C. diphtheriae* [13]. Кроме того, отсутствует корреляция между определением биовара и патогенностью [14]. Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), основанное на аллельном определении семи генов «домашнего хозяйства», позволило разделить существующее разнообразие штаммов на две эволюционные линии: lineage-1 (включает в себя большинство штаммов) и lineage-2 (включает только штаммы биовара *belfanti*) [14].

В 2018 г. появилась публикация об описании трех нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* [15]. Один из них был выделен в Швейцарии от пациента с трахеобронхитом с множественными поражениями дистальной трахеи и главных бронхов, два других штамма — из мазков из носа и зева от пациентов в Великобритании и Индии. Сравнительные геномные исследования с общедоступными геномами *C. diphtheriae* показали, что выделенные штаммы имеют более низкую среднюю идентичность нуклеотидов (от 95,24 до 95,39%) с эталонным геномом *C. diphtheriae* NCTC 11397, чем остальные ранее опубликованные геномы *C. diphtheriae* (> 98,15%). Реконструкция филогении на основании полногеномных данных подтвердила наличие двух монофилетических кластеров внутри вида, соответствующих lineage-1 и lineage-2. На основании этих результатов было предложено классифицировать вид *C. diphtheriae* на два подвида: *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* и *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*.

Цель данного исследования — описать генотип и фенотип нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2017–2018 гг., которые на основании совокупности множества методов можно отнести к *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальную часть исследования было включено два нетоксигенных штамма *C. diphtheriae*, выделенных в период 2017–2018 гг. в бактериологической лаборатории Краевой клинической психиатрической больницы г. Хабаровска; контрольный токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенинск»), а также свежее выделенные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* № 66–19, 98–19 (биовара *gravis*), № 55–19, № 56–19 (биовара *mitis*); нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* № 57–19, 67–19 (биовара *gravis*), № 60–19, № 91–19 (биовара *mitis*), присланные в Референс-центр по мониторингу возбудителей кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского из субъектов РФ.

Изучение штаммов *C. diphtheriae* проводили согласно МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засеивали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2%-го агара (ГРМ-агар, ГНЦПМБ; Оболенск, Россия) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота («Лейтран»; Россия) и теллурита калия (ГНЦПМБ; Оболенск, Россия) и термостатировали в течение 24–48 ч при температуре 37 °С. Выросшие колонии *C. diphtheriae* оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам. Токсигенность штаммов *C. diphtheriae* оценивали в реакции преципитации в агаре с использованием питательного агара «Коринетоксагар» (ГНЦПМБ; Оболенск, Россия) с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота («Лейтран»; Россия) и дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином («Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия). Один диск с антитоксином содержал 5 ± 1 МЕ дифтерийного антитоксина (согласно МУК 4.2.3065-13). Биохимические свойства выделенных культур изучали по оценке цистиназной, уреазной, сахаролитической и нитратредуктазной активностей на средах, приготовленных в лабораторных условиях, а также с использованием биохимической тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» («Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия).

Для определения возможности сбраживания N-ацетилглюкозамина в основу Гисса *ex tempore* был добавлен N-ацетилглюкозамин (Sigma-Aldrich; США). Далее в приготовленный раствор объемом 3 мл внесли полную бактериологическую петлю суточных культур *C. diphtheriae*, выращенных на сывороточном агаре. Культуры инкубировали 24–48 ч при температуре 37 °С. Интерпретацию результатов проводили по изменению цвета раствора. Контролем служили два токсигенных штамма биовара *gravis*, два нетоксигенных штамма биовара *gravis*, два токсигенных штамма биовара *mitis* и два нетоксигенных штамма биовара *mitis*.

Для изучения опубликованных геномных последовательностей использовали 204 генома *C. diphtheriae* подвидов *diphtheriae* и *lausannense*, представленных в базе данных NCBI Refseq. Выборку дополнили тремя

геномами *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* из базы данных NCBI Genbank и одним геномом *Corynebacterium ulcerans* BR-AD22 в качестве внешнего представителя для филогенетической реконструкции. Итоговый объем выборки составил 208 геномов.

Белок-кодирующие области в геномах в соответствии с представленными в базах данных аннотациями кластеризовали в группы ортологов с использованием программного обеспечения OrthoMCL [16] со стандартными настройками (индекс инфляции составил 1.5, порог схожести белковых последовательностей — 50%, порог e-value — 10⁻⁵). Для реконструкции филогении использовали группы ортологов, в которые входили гены, присутствовавшие во всех геномах в одной копии. Нуклеотидные последовательности выравнивали с использованием MUSCLE [17] и конкатенировали. Реконструкцию филогении осуществляли по алгоритму Maximum Likelihood, реализованному в программном обеспечении FastTree [18], с использованием модели GTR+CAT. Отношения опубликованных геномных последовательностей к сиквенс-типам по методу MLST предсказывали на основе данных из базы PubMLST. Формирование клональных комплексов производили с помощью алгоритма goeBURST на уровне SLV в программе PhyloViz 2.0 [19].

Тотальную ДНК выделяли стандартным методом кипячения из 24-часовой культуры *C. diphtheriae*, выращенной на ГРМ-агаре (ГНЦПМБ; Оболенск, Россия) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота («Лейтран»; Москва) и последующим центрифугированием.

Фрагменты гена *tox* у нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* выявляли в соответствии с опубликованным протоколом [20]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 0,1 мМ прямого и обратного праймеров, 200 мМ каждого dNTP и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific; США). В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665. Генотипирование штаммов *C. diphtheriae* с помощью МЛСТ проводили согласно международному протоколу [14] на основе секвенирования фрагментов семи генов «домашнего хозяйства» — *atpA*, *dnaE*, *dnaK*, *fusA*, *leuA*, *odhA* и *rpoB*. Секвенирование проводили согласно общепринятому методу Сенгера в ЗАО «Евроген» (Москва). Идентификацию аллелей осуществляли согласно международной базе данных PubMLST.

ПЦР для выявления фрагментов гена *dtxR* у штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием одной пары праймеров, охватывающей всю область гена *dtxR*: GGGACTACAACGCAACAAGAA и TCATCTAATTTGCGCCGCTTTA согласно [20, 21]. Подвид-специфичную ПЦР проводили с праймерами *ptsl_F*: ACTTTCGGAACCTGCCATCC и *ptsl_R*: GTGTACTCTCTCGTCTGCTC. *narG_F*: CTGACCACTGGGGCGAGG и *narG_R*: GAGTTGTCATAACGCCACTG.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы *C. diphtheriae* В-8759 и В-8760 были выделены из зева двух пациентов (26 и 77 лет), госпитализированных в различные отделения психиатрического стационара, которые были обследованы профилактически при поступлении с целью выявления бактерионосительства (согласно п. 3.4 Методических указаний 3.1.3018-12 «Эпидемиологический надзор за дифтерией»). Нами была проведена идентификация выделенных штаммов по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно Методическим указаниям 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». На кровяно-теллуритовом агаре наблюдали серо-черные шероховатые колонии с легкой краевой исчерченностью, с приподнятым центром; при соприкосновении колонии крошились. Токсигенность определяли с помощью дисков, пропитанных дифтерийным антитоксином, по методу Фельдмана. У выделенных культур через 24 и 48 ч инкубации отсутствовали специфичные линии преципитации при наличии специфичных линий преципитации у контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, что свидетельствовало об отсутствии у них токсигенности. Проведение ПЦР для выявления фрагмента гена *tox* показало, что у исследуемых штаммов ген дифтерийного токсина отсутствует.

Биохимические свойства выделенных культур изучали с оценкой цистиназной, уреазной, сахаролитической и нитратредуктазной активности. Так, выделенные культуры *C. diphtheriae* обладали цистиназной активностью с образованием «коричневого облака» по ходу укола в среду Пизу, ферментировали глюкозу, мальтозу, фруктозу и галактозу, не ферментировали сахарозу и крахмал, не обладали уреазной и нитратредуктазной активностью (табл. 1). В результате проведенной идентификации выделенные культуры были предварительно отнесены к *C. diphtheriae* биовар *belfanti*, что характерно для представителей подвида *lausannense*.

Таблица 1. Характеристика исследованных культур *C. diphtheriae*

Признак	Штаммы <i>C. diphtheriae</i>		
	№ 665 (контроль)	В-8759	В-8760
Сбраживание глюкозы	+	+	+
Сбраживание сахарозы	–	–	–
Сбраживание мальтозы	+	+	+
Сбраживание фруктозы	+	+	+
Сбраживание галактозы	+	+	+
Сбраживание крахмала	+	–	–
Уреаза	–	–	–
Нитратредуктаза	+	–	–
Проба Пизу	+	+	+
Токсигенность (метод Фельдмана)	+	–	–
Наличие гена <i>tox</i>	+	–	–

На следующем этапе работы было проведено исследование ранее опубликованных геномов *C. diphtheriae* с целью подтверждения четкого разделения данного вида на подвиды и поиска видоспецифичных белок-кодирующих генов.

Реконструкция филогенетического дерева (рис. 1) подтвердила на большей выборке ранее полученные данные о том, что представители вида *C. diphtheriae* формируют две клады, соответствующие подвидам *diphtheriae* и *lausannense*. Она указала также на то, что представители данных подвидов относятся к непересекающимся группам сиквенс-типов. По результатам кластеризации описанных в PubMLST MLST-типов с помощью goeBURST (рис. 2), все представители подвида *lausannense* с просеквенированным геномом имеют сиквенс-типы ST106, ST360, ST409, а также один неописанный тип, отличающийся одним аллелем от ST359, входящие в один клональный комплекс.

Можно предположить, что все остальные сиквенс-типы (например, ST35, ST37, ST69, ST81), представленные

в данном клональном комплексе, тоже относятся к *lausannense*. Дополнительным подтверждением тому может служить тот факт, что почти все изоляты из сиквенс-типов данного клонального комплекса описаны в базе данных PubMLST как относящиеся к биовару *belfanti*, характерному для подвида *lausannense*.

Анализ групп ортологов показал существование локусов, специфичных для подвидов *C. diphtheriae*. Так, все штаммы подвида *lausannense* имели регион (вероятно, оперон), содержащий гены фосфотрансферазной системы, предполагаемым субстратом которой служит N-ацетилглюкозамин. Под ген фосфоенолпируват-белка, кодирующего фосфотрансферазу, были подобраны праймеры: *ptsI_F*: ACTTTCCGAACCTGCCATCC и *ptsI_R*: GTGTACTCCTTCGTCTGCTC (ожидаемая длина продукта — 489 пн). В то же время только среди геномов подвида *diphtheriae* был обнаружен локус, кодирующий синтез субъединиц нитратредуктазы. Под ген ее α -субъединицы (присутствующий в геномной сборке 201 штамма

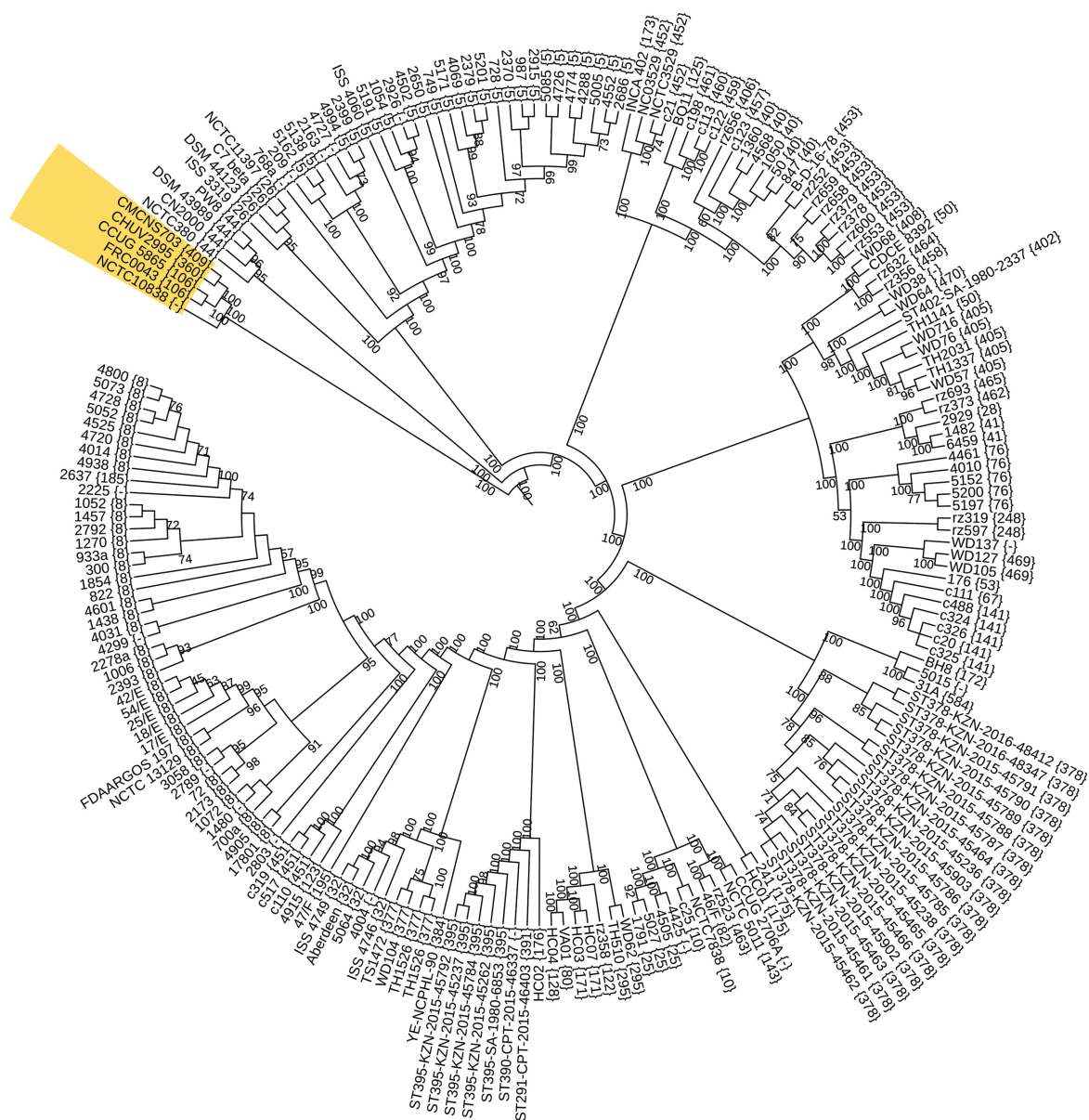


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе штаммов *C. diphtheriae* с публично доступными просеквенированными геномами. Длины ветвей и использованный для укоренения геном *C. ulcerans* BR-AD22 не отображены. Числа на ветвях отображают уровни локальной поддержки. Серым цветом обозначены штаммы *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. Числа в скобках обозначают предсказанные сиквенс-типы по номенклатуре PubMLST (прочерки соответствуют неописанным сиквенс-типам)

из 202, относящихся к данному подвиду в исследуемой выборке) были подобраны праймеры *narG_F*: CTGACCACT GGGGCGAGG и *narG_R*: GAGTTGTCATAACGCCACTG (ожидаемая длина продукта — 691 пн).

Проведение ПЦР с праймерами для амплификации фрагментов генов *ptsI* и *narG* (рис. 3) показало, что в образцах, содержащих ДНК изучаемых штаммов В-8759 и В-8760, присутствует ген *ptsI* и отсутствует ген *narG*, в то время как с классическими штаммами *C. diphtheriae* наблюдалась обратная картина. Не было случаев, когда у одного штамма обнаруживали одновременно два локуса или ни одного локуса.

В совокупности с данными биохимической идентификации это позволило нам сделать заключение, что изученные штаммы *C. diphtheriae* относятся к виду *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. Дополнительно этот вывод был подтвержден тем, что выделенные штаммы принадлежали к сиквенс-типу ST199, входящему в клональный комплекс, предположительно характерный

для представителей данного подвида (см. рис. 2). Еще одним подтверждением служила последовательность гена *dtxR*, которая совпадала с последовательностями, имеющимися в геномах представителей подвида *lausannense*.

Учитывая, что у штаммов *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* присутствует ген, кодирующий фосфоенолпируват-белок фосфотрансферазы, входящей в фосфотрансферазную систему, для, вероятно, N-ацетилглюкозамина, мы провели эксперименты по оценке фенотипического проявления этого гена. Эксперименты показали, что оба изученных штамма, отнесенных к *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*, сбраживали N-ацетилглюкозамин в рамках предложенной системы, в отличие от штаммов *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* (рис. 4).

Изученные штаммы, определенные по результатам данного исследования как *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*, депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk».

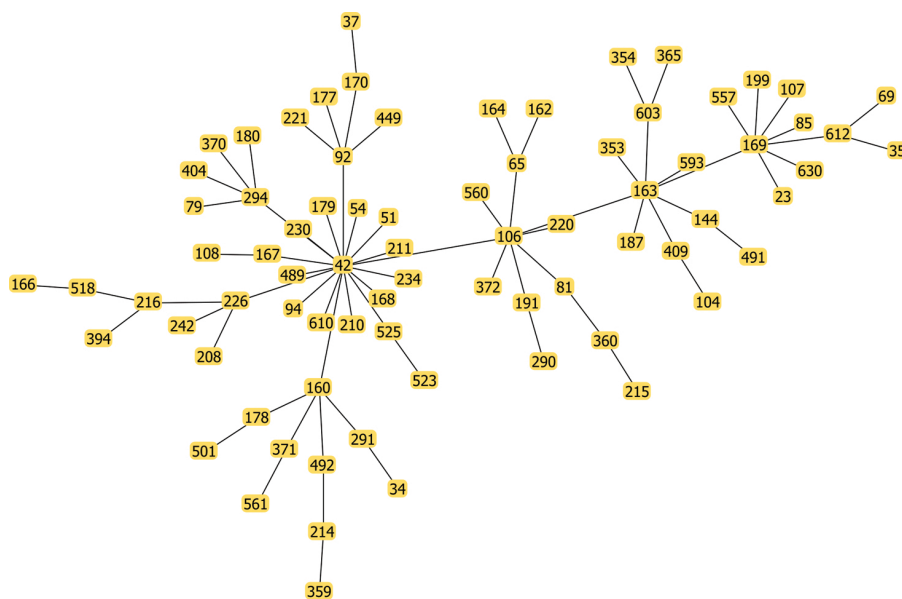


Рис. 2. Клональный комплекс, реконструированный на основе данных PubMLST, к которому относятся штаммы подвида *lausannense* с публично доступными просеквенированными геномами

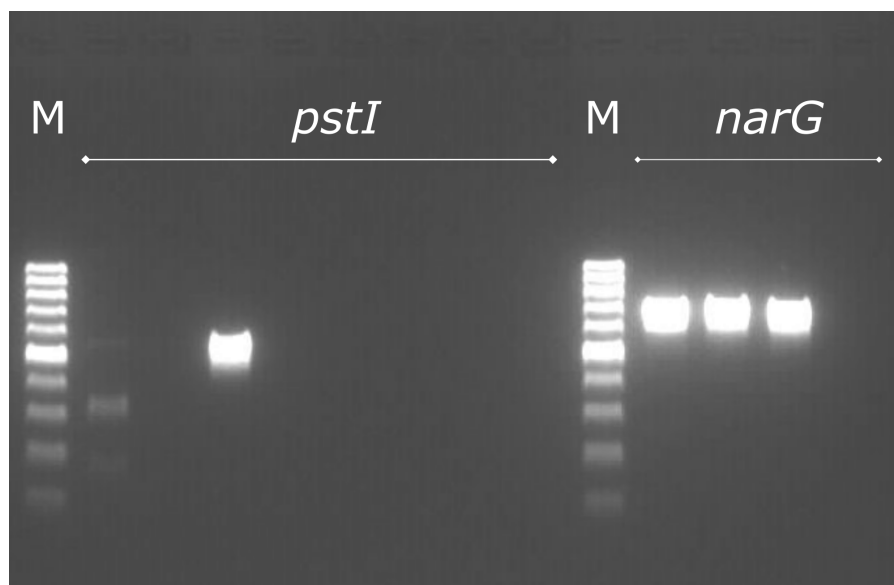


Рис. 3. Пример гель-электрофореза результатов ПЦР с праймерами *ptsI_F* — *ptsI_R* и *narG_F* — *narG_R*. М — маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific; США)

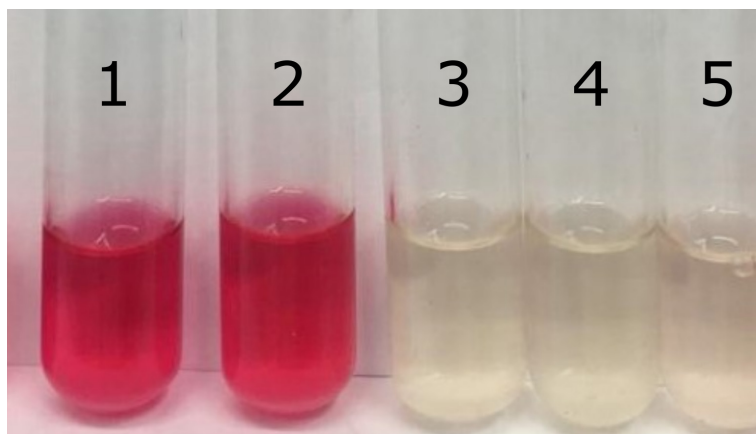


Рис. 4. Сахаролитическая активность штаммов *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* — способность сбраживать N-ацетилглюкозамин. Положительный результат соответствует окрашиванию среды в малиновый цвет. 1, 2 — выделенные штаммы *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*; 3 — штамм *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* биовара *gravis*; 4 — штамм *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* биовара *mitis*; 5 — отрицательный контроль

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нам удалось на территории России идентифицировать нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*, что наряду с данными зарубежных исследований [14, 22] свидетельствует об их повсеместной циркуляции. Выделенные штаммы принадлежали к сиквенс-типу ST199, входящему в кластер lineage-2, характерный для подвида *lausannense*, и несли последовательность гена *dtxR*, характерную для представителей данного подвида. Анализ групп ортологов позволил нам установить существование локусов, специфичных для подвигов *C. diphtheriae*: региона, содержащего гены N-ацетилглюкозамин-фосфотрансферазной системы, — для подвида *lausannense* и локус, кодирующий синтез субъединиц нитратредуктазы, — для подвида *diphtheriae*. Последнее подтверждает более

ранние геномные исследования подвида *lausannense* [15] и исследования биохимических свойств биовара *belfantii* [9, 10]. Сконструированные под эти гены праймеры и проведение ПЦР позволили нам подтвердить идентификацию исследуемых двух штаммов как *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*.

ВЫВОДЫ

В результате данного исследования на территории России были идентифицированы нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* subsp. *lausannense*. Полученные результаты расширяют представления о биологическом разнообразии вида *C. diphtheriae* и свидетельствуют о необходимости проведения исследований по оценке распространенности этих микроорганизмов на территории нашей страны и их патогенного потенциала.

Литература

1. World Health Organization. Diphtheria reported cases. Available from: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidence/diphtheria.html.
2. Якимова Т. Н., Маркина С. С., Максимова Н. М. Дифтерия сегодня. ЗНиСО. 2013; 249 (12): 18–9.
3. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо № 02/14390-2019-27 от 10.10.2019. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Russian.
4. Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. J Clin Microbiol. 2006 May; 44 (5): 1625–9.
5. Hirata J, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. Brazilian J Med Biol Res. 2008; 41 (11): 986–91.
6. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An Outbreak of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection: Single Bacterial Clone Causing Invasive Infection Among Swiss Drug Users. Clin Infect Dis. 1998 Nov; 27 (5): 1295–8.
7. FitzGerald RP, Rosser AJ, Perera DN. Non-toxicogenic penicillin-resistant cutaneous *C. diphtheriae* infection: A case report and review of the literature. J Infect Public Health. 2015 Jan 1; 8 (1): 98–100.
8. Edwards B, Hunt AC, Hoskisson PA. Recent cases of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Scotland: Justification for continued surveillance. Journal of Medical Microbiology. 2011; (60): 561–2.
9. Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of *Corynebacterium* bacteria. Clinical Microbiology Reviews. 1997; (10): 125–59.
10. Bernard KA, Funke G. *Corynebacterium*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015; p. 1–70.
11. Trost E, Blom J, de Soares SC, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. J Bacteriol. 2012; 194 (12): 3199–215.
12. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2014; 21 (November): 54–7.
13. Sangal V, Hoskisson PA. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. Infect Genet Evol. 2016; (43): 364–70.
14. Bolt F, Cassidy P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol. 2010; 48 (11): 4177–85.
15. Tagini F, Pillonel T, Croxatto A, Bertelli C, Koutsokera A, Lovis A, et al. Distinct genomic features characterize two clades of *Corynebacterium diphtheriae*: Proposal of *Corynebacterium*

- diphtheriae Subsp. diphtheriae Subsp. nov. and *Corynebacterium diphtheriae* Subsp. lausannense Subsp. nov. *Front Microbiol.* 2018 Aug 17; (9): 1743.
16. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 2003; 13 (9): 2178–89.
 17. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (5): 1792–7.
 18. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 — Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010 Mar 10; 5 (3).
 19. Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carriço JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics.* 2017; 33 (1): 128–9.
 20. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, by direct sequencing. *Res Microbiol.* 1997; 148 (1): 45–54.
 21. Chagina IA, Perevarova YuS, Perevarov VV, Chaplin AV, Borisova OYu, Kafarskaya LI, et al. Polymorphism of the dtxR gene in the currently existing strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Bulletin of RSMU.* 2017; (1): 31–37.
 22. Farfour E, Badell E, Dinu S, Guillot S, Guiso N. Microbiological changes and diversity in autochthonous non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated in France. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (10): 980–7.
- References**
1. World Health Organization. Diphtheria reported cases. Available from: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidence/diphtheria.html.
 2. Yakimova TN, Markina SS, Maksimova NM. Difteriya segodnya. *ZhISO.* 2013; 249 (12): 18–9. Russian.
 3. O zabolevaemosti difteriei i sostoyanii antitoksicheskogo protivodifteriynogo immuniteta naseleniya Rossii. Information letter № 02/14390-2019-27 from 10.10.2019. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor). Russian.
 4. Romney MG, Roscoe DL, Bernard K, Lai S, Efstratiou A, Clarke AM. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol.* 2006 May; 44 (5): 1625–9.
 5. Hirata J, Pereira GA, Filardy AA, Gomes DLR, Damasco PV, Rosa ACP, et al. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2008; 41 (11): 986–91.
 6. Gubler J, Huber-Schneider C, Gruner E, Altwegg M. An Outbreak of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection: Single Bacterial Clone Causing Invasive Infection Among Swiss Drug Users. *Clin Infect Dis.* 1998 Nov; 27 (5): 1295–8.
 7. FitzGerald RP, Rosser AJ, Perera DN. Non-toxigenic penicillin-resistant cutaneous *C. diphtheriae* infection: A case report and review of the literature. *J Infect Public Health.* 2015 Jan 1; 8 (1): 98–100.
 8. Edwards B, Hunt AC, Hoskisson PA. Recent cases of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Scotland: Justification for continued surveillance. *Journal of Medical Microbiology.* 2011; (60): 561–2.
 9. Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of *Corynebacterium* bacteria. *Clinical Microbiology Reviews.* 1997; (10): 125–59.
 10. Bernard KA, Funke G. *Corynebacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015; p. 1–70.
 11. Trost E, Blom J, de Soares SC, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J Bacteriol.* 2012; 194 (12): 3199–215.
 12. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, Edwards B, Blom J, Hoskisson PA. A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing. *Infect Genet Evol.* 2014; 21 (November): 54–7.
 13. Sangal V, Hoskisson PA. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. *Infect Genet Evol.* 2016; (43): 364–70.
 14. Bolt F, Cassiday P, Tondella ML, DeZoysa A, Efstratiou A, Sing A, et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (11): 4177–85.
 15. Tagini F, Pillonel T, Croxatto A, Bertelli C, Koutsokera A, Lovis A, et al. Distinct genomic features characterize two clades of *Corynebacterium diphtheriae*: Proposal of *Corynebacterium diphtheriae* Subsp. diphtheriae Subsp. nov. and *Corynebacterium diphtheriae* Subsp. lausannense Subsp. nov. *Front Microbiol.* 2018 Aug 17; (9): 1743.
 16. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 2003; 13 (9): 2178–89.
 17. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (5): 1792–7.
 18. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 — Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010 Mar 10; 5 (3).
 19. Nascimento M, Sousa A, Ramirez M, Francisco AP, Carriço JA, Vaz C. PHYLOViZ 2.0: Providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics.* 2017; 33 (1): 128–9.
 20. Nakao H, Mazurova IK, Glushkevich T, Popovic T. Analysis of heterogeneity of *Corynebacterium diphtheriae* toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, by direct sequencing. *Res Microbiol.* 1997; 148 (1): 45–54.
 21. Chagina IA, Perevarova YuS, Perevarov VV, Chaplin AV, Borisova OYu, Kafarskaya LI, et al. Polymorphism of the dtxR gene in the currently existing strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Bulletin of RSMU.* 2017; (1): 31–37.
 22. Farfour E, Badell E, Dinu S, Guillot S, Guiso N. Microbiological changes and diversity in autochthonous non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated in France. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (10): 980–7.

СИНТЕЗ ЛИНОЛЕОВОЙ КИСЛОТЫ, МЕЧЕННОЙ ^{13}C И ^{14}C , ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Я. Я. Тыньо¹✉, Г. В. Морозова², Ю. К. Бирюкова³, Д. А. Сивохин⁴, Н. В. Позднякова⁵, М. В. Зылькова³, Е. С. Богданова³, М. С. Смирнова³, А. Б. Шевелёв^{3,6}

¹ Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Россия

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

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

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

⁶ Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова, Москва, Россия

В настоящее время для диагностики заболеваний печени и билиарной системы требуется разработка простого неинвазивного теста с высокой чувствительностью и специфичностью. Соединения, меченные изотопом углерода, уже имеют широкое применение в диагностике различных заболеваний методами дыхательных тестов, безопасны и способны достоверно выявлять метаболические нарушения или дефицит специфических ферментов в органах. Целью работы было получить линолеовую кислоту, меченную ^{13}C и ^{14}C , по степени очистки пригодную для проведения дыхательных тестов в целях диагностики заболеваний гепатобилиарной системы. В предложенном способе химический выход реакции синтеза ^{13}C -линолевой кислоты по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 86,4%, по ^{13}C -карбонату бария — 96,0%. Химический выход реакции синтеза ^{14}C -линолевой кислоты по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 87,39%, по ^{14}C -карбонату бария — 97,1%. Удельная радиоактивность ^{14}C -линолевой кислоты составила $45,36 \pm 0,02$ мКи/г. Радиохимический выход реакции — 96,0%. Способ удобен для серийного выпуска готового продукта.

Ключевые слова: дыхательный тест, линолеовая кислота, ^{13}C , ^{14}C , гепатобилиарная система, заболевания печени

Вклад авторов: Я. Я. Тыньо — идея, общее руководство; Г. В. Морозова — синтез конечных соединений путем карбоксилирования реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C , материальный баланс всей схемы синтеза; Ю. К. Бирюкова — ЯМР-анализ конечного продукта синтеза; Д. А. Сивохин — обзор литературы, подготовка рукописи к печати; Н. В. Позднякова — обзор литературы; М. В. Зылькова — определение уровня радиоактивности атомов углерода в исходных веществах, полупродуктах синтеза и конечных соединениях; Е. С. Богданова — расшифровка ЯМР-спектра конечных продуктов синтеза; М. С. Смирнова — определение температуры плавления конечного соединения; А. Б. Шевелёв — материально-техническое снабжение работы и обеспечение доступа к оборудованию, редактирование перевода рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ярослав Ярославович Тыньо
Сиреневый бульвар, д. 4, г. Москва, 105122; ytytnio@mail.ru

Статья получена: 31.03.2020 **Статья принята к печати:** 15.04.2020 **Опубликована онлайн:** 25.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.022

SYNTHESIS OF ^{13}C - AND ^{14}C -LABELED LINOLEIC ACIDS FOR USE IN DIAGNOSTIC BREATH TESTS FOR HEPATOBILIARY SYSTEM DISORDERS

Tynio YY¹✉, Morozova GV², Biryukova YuK³, Sivokhin DA⁴, Pozdniakova NV⁵, Zylkova MV³, Bogdanova ES³, Smirnova MS³, Shevelev AB^{3,6}

¹ Russian State University of Physical Education, Sport, Youth and Tourism, Moscow, Russia

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁵ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

⁶ Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, Russia

At present, there is a need for a simple, noninvasive, highly specific and sensitive diagnostic test for hepatobiliary system disorders. Compounds labeled with carbon isotopes are widely used in various diagnostic breath tests; they are safe and can reliably detect a metabolic disorder or enzyme deficiency. The aim of this study was to synthesize ^{13}C - and ^{14}C -labeled linoleic acids suitable for use in hepatobiliary breath tests in terms of purity. In the synthesis of ^{13}C -labeled linoleic acid, the chemical yield for 1-bromo-8,11-heptadecadien was 86.4% and the chemical yield for barium carbonate- ^{13}C , 96.0%. In the synthesis of ^{14}C -labeled linoleic acid, the chemical yield for 1-bromo-8,11-heptadecadien was 87.39%; for barium carbonate- ^{14}C it was 97.1%. The specific radioactivity of ^{14}C -labeled linoleic acids was 45.36 ± 0.02 mCi/g. The radiochemical yield of the reaction was 96.0%. The proposed method is suitable for batch production.

Keywords: breath test, linoleic acid, ^{13}C , ^{14}C , hepatobiliary system, liver disease

Author contribution: Tynio YY conceived and supervised the study; Morozova GV synthesized the final product by carboxylation of the Grignard reagent with ^{13}C and ^{14}C dioxides, did preparative calculations; Biryukova YuK conducted NMR-analysis of the final product; Sivokhin DA analyzed the literature and wrote the manuscript; Pozdniakova NV analyzed the literature; Zylkova MV measured the radioactivity of carbon atoms in the reagents, intermediate and final products; Bogdanova ES analyzed the NMR spectra of the final products; Smirnova MS determined the melting point of the final products; Shevelev AB provided reagents and instrumentation and revised the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yaroslav Y. Tynio
Sireneviy bulvar, 4, Moscow, 105122; ytytnio@mail.ru

Received: 31.03.2020 **Accepted:** 15.04.2020 **Published online:** 25.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.022

Численность наблюдаемых пациентов с хроническими заболеваниями печени, приводящими к циррозу (вирусные гепатиты В и С, алкогольные и токсические гепатиты, первичный склерозирующий холангит и др.), непрерывно растет [1].

Биопсия печени остается золотым стандартом оценки состояния органа. Однако инвазивность процедуры и связанные с этим риски осложнений для пациента не позволяют использовать этот метод в качестве рутинного [2]. Внедрение в практику методов неинвазивной диагностики, обладающих высокой достоверностью, простотой выполнения и безопасностью, как для самого пациента, так и для обслуживающего персонала [3], позволит оценивать эффективность лечения в динамике, наличие функциональных резервов печени [2, 4]. Этим функциональные тесты выгодно отличаются от эластографии или расчета лабораторных индексов APRI [5] либо Forns [6].

Диагностика с помощью дыхательных тестов основана на способности различных органов и систем метаболизировать ^{13}C - и ^{14}C -препараты с образованием $^{13}\text{CO}_2$ [7] или $^{14}\text{CO}_2$ [8], которые распределяются кровеносной системой по всем органам и тканям, и, выделяясь через легкие, могут быть достоверно обнаружены в выдыхаемом воздухе пациента с помощью масс-спектрометрии или ИК-спектрометрии в варианте NDIRS (недиспергирующий инфракрасный анализатор) и лазерной абсорбции CRDS (спектральная техника для измерения поглощения, основанная на определении времени затухания излучения в ячейке с двумя высокоотражающими зеркалами при многократном прохождении света между ними) [3, 9]. Таким образом, появляется возможность постановки диагноза на основе анализа фармакокинетических показателей — изменения концентрации $^{14}\text{CO}_2$ в выдыхаемом воздухе во времени и информации о путях и скоростях метаболических превращений препарата [10].

Уже разработаны и внедрены в практику дыхательные тесты для оценки функционального состояния печени на основе оценки скорости метаболизации ^{13}C -метацетина [11–13], ^{13}C -галактозы и ^{13}C -аминофеназона [14] (оценивается активность цитохрома P450), ^{13}C -фенилаланина [15, 16], ^{13}C -кофеина [17, 18], ^{13}C -триоктаноина (тройного эфира глицерина и ^{13}C -каприловой кислоты) для обнаружения дефицита ферментов поджелудочной железы [7, 19].

Одним из наиболее перспективных направлений в ядерной медицине является использование дыхательных тестов на основе различных фармацевтических препаратов с использованием меченых жирных кислот, в частности линолевой. Данное соединение играет существенную роль в энергетическом обмене клеток высших организмов и служит строительным блоком для липидов нескольких классов, таких как нейтральные жиры, фосфолипиды и эфиры холестерина [20].

Линолевая кислота — длинноцепочечное нерастворимое в воде соединение. В организме под действием желчи, выделяемой из желчного пузыря, в тонком кишечнике происходит гидролиз жирной кислоты с образованием смешанных мицелл. В случае нарушения работы гепатобилиарной системы, приводящего к нехватке желчных солей в желчи, замедляется всасывание меченых жирных кислот, что может быть обнаружено по изотопному составу выделяющегося углекислого газа [20].

В литературе описан стереоспецифический синтез изомеров моно-непредельных жирных кислот с ^{14}C -атомом в первом положении с использованием одиннадцати стадий

при помощи инверсии олефина [21]. Преимущество этого способа в возможности получения мононенасыщенных жирных кислот с различным расположением двойной связи. Однако изложенный в работе способ чрезвычайно трудоемок, требует препаративного разделения стереоизомеров по окончании стадии эпексидирования, а также такого дорогостоящего и токсичного источника ^{14}C , как цианид. Все это ограничивает промышленное применение описанной разработки.

Способы химического синтеза ^{13}C - и ^{14}C -производных наиболее распространенных в пищевых продуктах ненасыщенных жирных кислот: линолевой и линоленовой из наиболее доступного сырья — CO_2 на базе изотопов углерода в литературе не описаны. Биологические способы с применением водорослей, простейших и грибов (например, *Thraustochytrium* или *Mortierella alpina*) имеют низкий радиохимический выход, не превышающий 60% [22, 23]. Остальную часть изотопа выбрасывают в виде отходов, что с учетом большой длительности распада ^{14}C приводит к высокой экологической опасности схемы синтеза. Кроме того, к недостаткам известного из литературы биологического способа с точки зрения применимости ^{13}C - и ^{14}C -жирных кислот в дыхательных тестах является распределение меченых атомов по всей длине углеродной цепи ацила. Между тем, для достижения максимальной чувствительности, воспроизводимости и безопасности дыхательных тестов целесообразно использовать препараты жирных кислот, имеющих 100% меченого атома в позиции 1 (карбоксильная группа). Часто в результате биогенного синтеза образуется смесь жирных кислот различного состава. Например, показано, что биогенный синтез с использованием *Thraustochytrium* приводит к образованию 10 различных жирных кислот с выходами 0,72–21,82%. Кроме того, 1,9% изотопа включается в жирные кислоты неидентифицированной структуры [23].

Целью работы было представить способ синтеза линолевой кислоты с помощью ^{13}C и ^{14}C по положению 1 ацила с использованием CO_2 в качестве источника аномального изотопа для последующего применения в диагностике гепатобилиарной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Чистоту полученных промежуточных и конечных продуктов контролировали тонкослойной хроматографией на силикагеле на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck; Германия) и sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, в системе этилацетат : гексан (1 : 1). Визуализацию разделенных соединений проводили с помощью паров йода. Структуру целевого продукта подтверждали спектроскопией ядерного магнитного резонанса на приборах моделей AM-300, 300 МГц (Bruker; Германия) и DRX-500, 500 МГц (Bruker; Германия). В качестве растворителя для проведения анализа методом ЯМР-спектроскопии использовали ^2H -хлороформ, съемку проводили при частоте 300,1 МГц.

Для определения удельной активности меченых атомов углерода использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик DPM 7001 (НТЦ Радэк; Россия), оснащенный двумя фотоэлектронными умножителями. Для определения активности смесей использовали микрокалориметр Кальве Setaram C80 (SETARAM Instrumentation; Франция). Значения pH водных растворов определяли потенциометрическим

методом с помощью pH-метра модели Sartorius PB-11 (Sartorius; Германия).

Материалы

Использовали следующие материалы:

– 1-бром-8,11-гептадекадиен $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{Br}$ AppliChem (США) со следующими характеристиками: молярная масса — 315,332 г/моль; температура плавления — 23,4 °С; температура кипения — 112 °С [24];

– источник стабильного изотопа углерода: безводный ^{13}C -карбонат бария (АО «Всероссийское объединение «Изотоп»; Россия), со следующими характеристиками, указанными производителем: изотопная чистота — 99,32%; молекулярная масса — 198,3359 г/моль; температура плавления — 1558 °С;

– источник радиоактивного изотопа углерода: безводный ^{14}C -карбонат бария (ПО «МАЯК» Госкорпорации «РОСАТОМ»; Россия) со следующими характеристиками, указанными производителем: изотопная чистота — 97,8%; молярная масса — 199,3359 г/моль; температура плавления — 1566 °С; удельная радиоактивность — 66,92 мКи/г.

– осушенные аргон и азот квалификации «высокая чистота» («М-газ»; Россия), а также этилацетат по ГОСТ 22300-76 изм.1-3 («Химмед»; Россия), гексан по ТУ 2631-158-44493179-13 («ЛенРеактив»; Россия), магний (стружка) по ГОСТ 804-93 («Интерхим»; Россия), йод кристаллический чда («ЛенРеактив»; Россия), диэтиловый эфир по ТУ 2600-001-45682126-13 («Химмед»; Россия), серную кислоту хч по ГОСТ 4204-77 («Химмед»; Россия), соляную кислоту хч по ГОСТ 3118-77 («Химмед»; Россия), гидроксид натрия 98% (Fluka Швейцария; каталожный номер 71695), ацетонитрил по ТУ 6-09-3534-87 («Химсервис»; Россия).

Абсолютированный эфир получали по следующей схеме. Диэтиловый эфир по ТУ 2600-001-45682126-13 промывали насыщенным раствором хлорида кальция из расчета 50 мл на 1 л эфира и сушили над прокаленным в течение суток при +120 °С хлоридом кальция, используя 130 г сухого вещества для обработки 1 л эфира в течение 48 ч. Реагент фильтровали через бумажный складчатый фильтр в сухую колбу и добавляли металлический натрий из расчета 1 г на 1 л. Колбу плотно закрывали пробкой с установленной хлоркальцевой трубкой. Эфир использовали для карбоксилирования реактива Гриньяра при том условии, что при внесении новых порций натрия не наблюдалось выделения водорода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линолевой кислоты, меченной ^{13}C и ^{14}C в первом положении, проводили в две стадии: 1) получение реактива Гриньяра; 2) карбоксилирование реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C .

Получение реактива Гриньяра

Собирали установку из трехгорлой колбы на 250 мл, в боковые горловины колбы вставляли хорошо действующий обратный холодильник с хлоркальцевой трубкой и капельную воронку с трубкой, уравнивающей давление во время прикапывания эфирного раствора. В центральное отверстие через масляный затвор вводили мешалку с электрическим приводом. В колбу помещали 3,0 г магниевой стружки и кристаллик йода. Всю установку продували током аргона квалификации «высокая чистота» в

течение 20 мин. Через капельную воронку в колбу вводили 160 мл абсолютного эфира, включали мешалку и при слабом токе аргона добавляли 3,78 г (12 ммоль) 1-бром-8,11-гептадекадиена в виде раствора в диэтиловом эфире объемом 80 мл. Для начала реакции колбу нагревали на водяной бане до кипения эфира. После начала реакции водяную баню выключали и процесс перемешивания продолжали до полного растворения магния (рис. 1; разрешения из [25]).

Карбоксилирование реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C

Установка, использованная для получения меченых кислот карбоксилированием реактивом Гриньяра, представляла собой высоковакуумную гребенку, снабженную шлифами для присоединения реакционной колбы, источника CO_2 и ртутного манометра, а также трубками для входа и выхода азота. Коническая трехгорлая реакционная колба была изготовлена с таким расчетом, чтобы ее можно было замораживать, и снабжена магнитной мешалкой, позволяющей работать в вакууме при охлаждении (рис. 2; с разрешения из [25]).

Источник диоксида ^{13}C и ^{14}C представлял собой круглодонную колбу, содержащую 5,4 ммоль карбоната

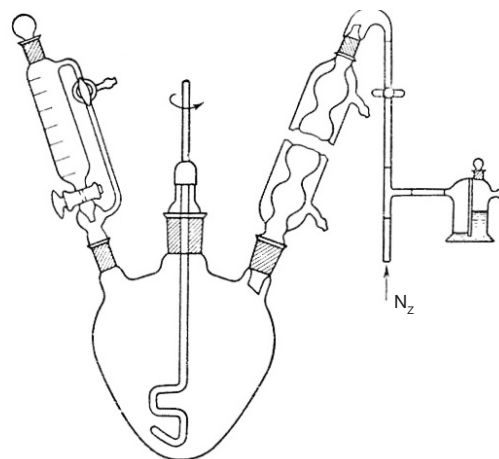


Рис. 1. Прибор для получения реактива Гриньяра в атмосфере аргона

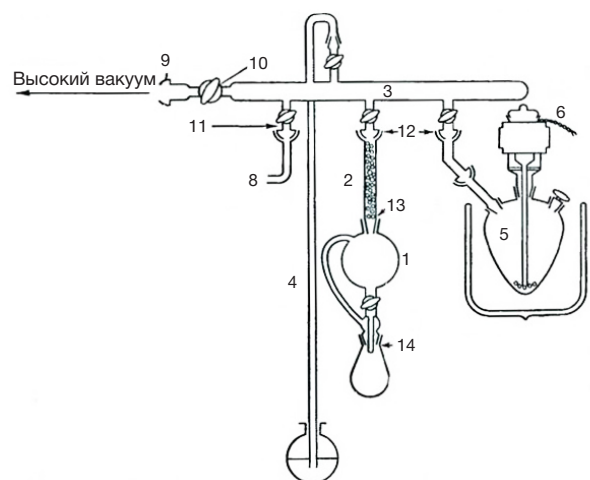


Рис. 2. Прибор для карбоксилирования реактивов Гриньяра. 1 — источник оксида углерода; 2 — трубка с драйеритом; 3 — высоковакуумная гребенка (диаметр трубки 13 мм); 4 — ртутный манометр; 5 — колба; 6 — магнитная мешалка (110 в, 3 фазы); 7 — баня для охлаждения; 8 — подача азота; 9 — шлиф 28/12; 10 — кран с отверстием 3 мм; 11 — кран с отверстием 2 мм; 12 — шлиф 18/9; 13 — шлиф 14/35; 14 — шлиф 14/20

бария на базе изотопов: для изотопа ^{13}C — навеска массой 1,071 г, для изотопа ^{14}C — 1,076 г. Колбу соединили с заполненной концентрированной серной кислотой капельной воронкой, снабженной приспособлением для выравнивания давления. Эту часть установки соединили с вакуумной гребенкой через трубку, наполненную осушителем.

Для проведения реакции установку откачали с помощью масляного насоса до давления 0,1 мм рт. ст. и заполнили сухим азотом. Затем, при помощи предварительно промытой и заполненной азотом пипетки с поршневой подачей, быстро ввели в реакционную колбу раствор реактива Гриньяра, полученный из 6 ммоль 1-бром-8,11-гептадекадиена (половина общего полученного количества). Свободный боковой отвод реакционной колбы закрыли пробкой, колбу охладили жидким азотом и откачивали систему до давления 0,1 мм рт. ст. После этого дали содержимому реакционной колбы оттаять, нагревая его смесью сухого льда и ацетона до $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$, снова замораживали жидким азотом и опять откачали систему для удаления выделившегося азота.

Карбоксилирование реактива Гриньяра проводили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, постоянно перемешивая содержимое колбы. Для запуска выделения CO_2 на базе изотопов углерода к карбонату бария из капельной воронки медленно прибавляли концентрированную серную кислоту, при этом следили за тем, чтобы давление в приборе не превышало 500 мм рт. ст. Для полного выделения меченого CO_2 в конце реакции осторожно нагревали реакционную колбу с карбонатом бария до окончательного его растворения. После полного истощения реактива Гриньяра давление CO_2 в приборе согласно показаниям манометра перестало снижаться. По этому показателю как в случае $^{13}\text{CO}_2$, так и в случае $^{14}\text{CO}_2$, реакция полностью завершилась в течение 15 мин.

Реакционную колбу с реактивом Гриньяра охладили жидким азотом, для того чтобы в нее перешел весь оставшийся в системе меченый CO_2 , затем закрыли кран, соединяющий прибор с источником меченого CO_2 , и для полного поглощения меченого CO_2 реакционную массу перемешивали в течение 15 мин при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого установку заполнили азотом и соединили

с атмосферой. Полученный комплекс разлагали разбавленной соляной кислотой. Подкисленную смесь экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт обработали 100 mM NaOH и подкислили полученный щелочной раствор до pH 7,0. Выделившуюся кислоту отфильтровали. Осадок собрали, промыли водой и перекристаллизовали из ацетонитрила при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (считали, что для линолевой кислоты $t_{\text{замерз}} = -11\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Масса полученной ^{13}C -линолевой кислоты составила 1459 мг (5,184 ммоль). Итоговый химический выход реакции по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 86,4%, по $^{13}\text{CO}_2$ — 96,0%. Экспериментально измеренная температура замерзания продукта составила $-11,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Масса полученной ^{14}C -линолевой кислоты составила 1480 мг (5,243 ммоль). Итоговый химический выход реакции по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 87,39%, по $^{13}\text{CO}_2$ — 97,1%. Удельную активность ^{14}C -линолевой кислоты определяли на сцинтилляционном счетчике: она составила $45,36 \pm 0,02$ мКи/г. Таким образом, общий радиохимический выход составил 96,0%. Препарат имел температуру замерзания $-10,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Анализ полученных образцов ^{13}C - и ^{14}C -линолевых кислот с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах Kieselgel 60 F254 в системе этилацетат : гексан (1 : 1) (см. Материалы и методы) позволил обнаружить примеси. Определение массы основного вещества, элюированного из силикагеля после разделения методом ТСХ, показало, что в случае ^{13}C -линолевой кислоты на него приходится 98,2% сухой массы готового препарата.

Сравнение спектра ^1H ЯМР ^{14}C -линолевой кислоты с эталонным $1\text{S}/\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2/\text{c1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18(19)20/h6-7, 9-10\text{H}, 2-5, 8, 11-17\text{H}_2, 1\text{H}_3, (\text{H}, 19, 20)/b7-6-, 10-9$, описанным в литературе [26], показало полное соответствие структуры синтезированного вещества структуре линолевой кислоты (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значимое преимущество предложенного способа синтеза линолевой кислоты, меченной изотопами ^{13}C и ^{14}C , состоит в ускорении процесса получения целевых продуктов, сокращении потерь меченого CO_2 , в повышении его

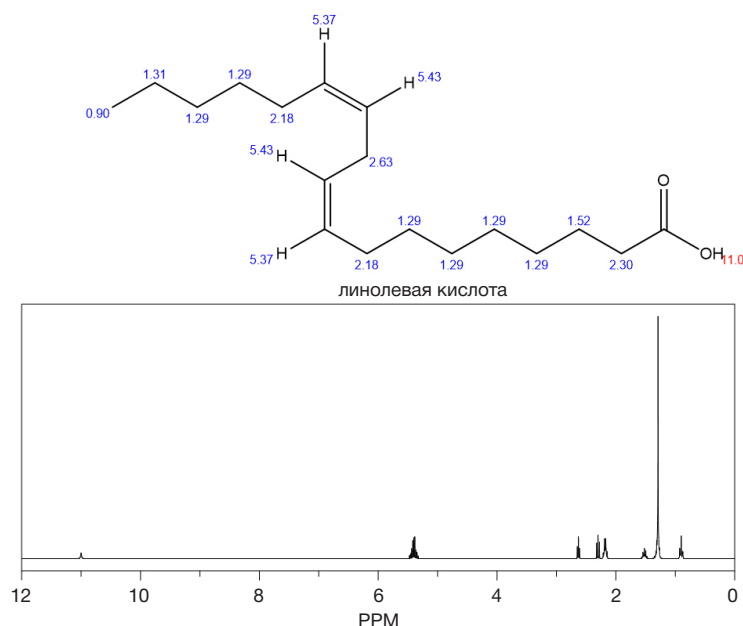


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР ^{14}C -линолевой кислоты

суммарного химического и радиационного выхода. Важным результатом является также исключение распределения изотопно-меченых атомов по всей длине углеродной цепи ацила: при использовании разработанного метода включение происходит только в первом положении.

Упрощение и снижение стоимости процесса получения целевых продуктов обусловлены уменьшением длительности реакции за счет подбора оптимальных соотношений реагентов и использования теста на окончание реакции карбоксилирования реактива Гриньяра с помощью измерения давления CO_2 в системе. Разработанный метод обеспечивает существенное повышение радиационного и химического выхода продукта по источнику изотопа по сравнению с известными способами [21–23]. Включение меченого изотопа в целевой продукт приближается к количественному, в результате практически полностью исключается выброс радиоактивных отходов во внешнюю среду. С учетом затратности и сложности утилизации радиоактивных отходов с длительным периодом полураспада это играет существенную роль с точки зрения экономической эффективности способа.

Полученные в ходе работы образцы ^{13}C - и ^{14}C -линолевой кислот по своей чистоте и количеству

пригодны для проведения доклинических испытаний острой, субхронической, хронической и других типов токсичности в соответствии с требованиями [27]. После подтверждения безопасности соединения, изготавливаемые предлагаемым способом, могут быть рекомендованы для испытаний в клинических условиях в качестве диагностических дыхательных тестов в целях диагностики заболеваний гепатобилиарной системы.

ВЫВОДЫ

Предложен метод получения линолевой кислоты, содержащей атомы углерода ^{13}C или ^{14}C в первом положении. От известных аналогов он отличается простотой и включает две вместо 11 стадий. При работе с ^{14}C способ дает радиохимический выход, близкий к количественному (96%), что полностью исключает проблему утилизации опасных радиоактивных отходов, возникающих при работе с ^{14}C -содержащими исходными веществами. Для синтеза кислот предложенным способом не требуется использования сложного аналитического и препаративного оборудования, что удобно для серийного выпуска готового продукта.

Литература

- Liou IW. Management of end-stage liver disease. *Med Clin North Am.* 2014; 98 (1): 119–52. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.09.006.
- Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol.* 2015; 10 (1): 1–6.
- Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res.* 2007; 1 (1): R1–R13. DOI: 10.1088/1752-7155/1/1/014003.
- Razlan H, Marzuki NM, Tai M-L S, Shamsul Tze-Zen Ong A-S, Mahadeva S. Diagnostic value of the ^{13}C -methacetin breath test in various stages of chronic liver disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2011; 2011 (1): 1–6. DOI: 10.1155/2011/235796.
- Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology.* 2002; 36 (4): 986–92. DOI: 10.1053/jhep.2002.36128.
- Wai CT, Greenson KJ, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Jorge AM, Hari SC, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003; 38 (2): 518–26. DOI: 10.1053/jhep.2003.50346.
- Эльман А. Р., Рапопорт С. И. Стабильно-изотопная диагностика в России: итоги и перспективы. ^{13}C -препараты, приборы, методы. *Клин. мед.* 2014; 92 (7): 5–11.
- Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med.* 2016; 39 (11): 2012–14.
- Плавник Р. Г. ^{13}C -Уреазный дыхательный тест на *Helicobacter pylori* (клинические и организационные аспекты). М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2017; 36 с.
- Grattagliano I, Lauterburg BH, Palasciano G, and Portincasa P. ^{13}C -breath tests for clinical investigation of liver mitochondrial function. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40 (9): 843–50. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02331.x.
- Gorowska-Kowolik K, Chobot A, and Kwiecien J. ^{13}C -Methacetin Breath Test for Assessment of Microsomal Liver Function: Methodology and Clinical Application. *Gastroenterol Res Pract.* 2017; 2017 (1): 1–5.
- Moran S, Mina A, Duque X, Ortiz-Olvera N, Rodriguez-Leal G, Sierra-Ramírez JA, et al. The utility of the ^{13}C -methacetin breath test in predicting the long-term survival of patients with decompensated cirrhosis. *J Breath Res.* 2017; 11 (3): 1–28. DOI: 10.1088/1752-7163/aa7b99.
- Эльман А. Р., Корнеева Г. А., Носков Ю. Г., Хан В. Н., Шишкина Е. Ю., Негримовски В. М. и др. Синтез продуктов, меченных изотопом ^{13}C , для медицинской диагностики. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева).* 2013; LVII (5): 3–24.
- Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M, et al. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3 (3): 279–85. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00720-7.
- Moran S, Gallardo-Wong I, Rodriguez-Leal G, McCollough P, Mendez J, Castañeda B, et al. L-[1- ^{13}C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes Environ Health Stud.* 2009; 45 (3): 192–7. DOI: 10.1080/10256010903083995.
- Zhang GS, Bao ZJ, Zou J, Yin SM, Huang YQ, Huang H, et al. Clinical research on liver reserve function by ^{13}C -phenylalanine breath test in aged patients with chronic liver diseases. *BMC Geriatr.* 2010; 10 (23): 1–8. DOI: 10.1186/1471-2318-10-23.
- Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, et al. The ^{13}C -caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2008; 42 (4): 408–12, 2008. DOI: 10.1097/MCG.0b013e318046ea65.
- Gordon J, Park H, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, et al. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the ^{13}C -caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 (9): 1411–6. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06760.x.
- Braden B. ^{13}C breath tests for the assessment of exocrine pancreatic function. *Pancreas.* 2010; 39 (7): 955–9. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181dbf330.
- Титов В. Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. Гиполипидемическая терапия и профилактика атеросклероза. Клинико-лабораторный консилиум. 2014; 1: 4–29.
- Georgin D, Taran F, Mioskowski C. A divergent synthesis of [1- ^{14}C]-mono-E isomers of fatty acids. *Chem Phys Lipids.* 2003; 125 (1): 83–91.
- Kawashima H, Akimoto K, Tsuyoshi F, Hideo N, Kyoko K, Sakayu S. Preparation of ^{13}C -labeled polyunsaturated fatty acids by an

- arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Analytical Biochemistry*. 1995; 229 (2): 317–22. DOI: 10.1006/abio.1995.1419.
23. Zhao X, Qiu X. Analysis of the biosynthetic process of fatty acids in *Thraustochytrium*. *Biochimie*. 2018; 144 (1): 108–14.
 24. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 86th ed. CRC Press. 2006; p. 3–320.
 25. Поздеев В. В., Тыньо Я. Я., Морозова Г. В., Быченко А. Б., Бирюкова Ю. К., Швелев А. Б., авторы; ООО «ГК Наш Мир», патентообладатель. Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ¹³C и ¹⁴C. Патент РФ № 2630691. 12.09.2017.
 26. Shaaban M, Abd-Alla HI, Hassan AZ, Aly HF, Ghani MA. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. *Org Med Chem Lett*. 2012; 2 (1): 30.
 27. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012; 994 с.
- ## References
1. Liou IW. Management of end-stage liver disease. *Med Clin North Am*. 2014; 98 (1): 119–52. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.09.006.
 2. Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. ¹³CO₂ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
 3. Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13. DOI: 10.1088/1752-7155/1/1/014003.
 4. Razlan H, Marzuki NM, Tai M-L S, Shamsul Tze-Zen Ong A-S, Mahadeva S. Diagnostic value of the ¹³C-methacetin breath test in various stages of chronic liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2011; 2011 (1): 1–6. DOI: 10.1155/2011/235796.
 5. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002; 36 (4): 986–92. DOI: 10.1053/jhep.2002.36128.
 6. Wai CT, Greenson KJ, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Jorge AM, Hari SC, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38 (2): 518–26. DOI: 10.1053/jhep.2003.50346.
 7. Elman AR, Rapoport SI. Stabil'no-izotopnaja diagnostika v Rossii: itogi i perspektivy. ¹³C-preparaty, pribory, metody. *Klin med*. 2014; 92 (7): 5–11. Russian.
 8. Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
 9. Plavnik RG. ¹³S-Ureaznyj dyhatel'nyj test na *Helicobacter pylori* (klinicheskie i organizacionnye aspekty). M.: MEDPRAKTIKA-M, 2017; 36 s.
 10. Grattagliano I, Lauterburg BH, Palasciano G, and Portincasa P. ¹³C-breath tests for clinical investigation of liver mitochondrial function. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40 (9): 843–50. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02331.x.
 11. Gorowska-Kowolik K, Chobot A, and Kwiecien J. ¹³C-Methacetin Breath Test for Assessment of Microsomal Liver Function: Methodology and Clinical Application. *Gastroenterol Res Pract*. 2017; 2017 (1): 1–5.
 12. Moran S, Mina A, Duque X, Ortiz-Olvera N, Rodriguez-Leal G, Sierra-Ramírez JA, et al. The utility of the ¹³C-methacetin breath test in predicting the long-term survival of patients with decompensated cirrhosis. *J Breath Res*. 2017; 11 (3): 1–28. DOI: 10.1088/1752-7163/aa7b99.
 13. Elman AR, Korneeva GA, Noskov YuG, Khan VN, Shishkina EYu, Negrimovski VM, Syntheses of products labeled with ¹³C isotope for medicine diagnosis. *Russian Chemical Journal*. 2013; LVII (5): 3–24.
 14. Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M, et al. ¹³C-galactose breath test and ¹³C-aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00720-7.
 15. Moran S, Gallardo-Wong I, Rodriguez-Leal G, McCollough P, Mendez J, Castañeda B, et al. L-[1-¹³C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes Environ Health Stud*. 2009; 45 (3): 192–7. DOI: 10.1080/10256010903083995.
 16. Zhang GS, Bao ZJ, Zou J, Yin SM, Huang YQ, Huang H, et al. Clinical research on liver reserve function by ¹³C-phenylalanine breath test in aged patients with chronic liver diseases. *BMC Geriatr*. 2010; 10 (23): 1–8. DOI: 10.1186/1471-2318-10-23.
 17. Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, et al. The ¹³C-caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42 (4): 408–12, 2008. DOI: 10.1097/MCG.0b013e318046ea65.
 18. Gordon J, Park H, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, et al. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the ¹³C-caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26 (9): 1411–6. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06760.x.
 19. Braden B. ¹³C breath tests for the assessment of exocrine pancreatic function. *Pancreas*. 2010; 39 (7): 955–9. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181dbf330.
 20. Titov VN. Klinicheskaja biohimija zhirnyh kislot, lipidov i lipoproteinov. Gipolipidemicheskaja terapija i profilaktika ateroskleroza. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2014; 1: 4–29. Russian.
 21. Georgin D, Taran F, Mioskowski C. A divergent synthesis of [1-¹⁴C]-mono-E isomers of fatty acids. *Chem Phys Lipids*. 2003; 125 (1): 83–91.
 22. Kawashima H, Akimoto K, Tsuyoshi F, Hideo N, Kyoko K, Sakayu S. Preparation of ¹³C-labeled polyunsaturated fatty acids by an arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Analytical Biochemistry*. 1995; 229 (2): 317–22. DOI: 10.1006/abio.1995.1419.
 23. Zhao X, Qiu X. Analysis of the biosynthetic process of fatty acids in *Thraustochytrium*. *Biochimie*. 2018; 144 (1): 108–14.
 24. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 86th ed. CRC Press. 2006; p. 3–320.
 25. Pozdеев ВВ, Тыньо ЯЯ, Морозова ГВ, Быченко АБ, Бирюкова ЮК, Швелев АБ; LLC "GK Our World". Method of Synthesis of Linoleic and Linolenic Acids Labeled with Carbon Isotopes ¹³C and ¹⁴C. RF Patent # 2630691. 12.09.2017.
 26. Shaaban M, Abd-Alla HI, Hassan AZ, Aly HF, Ghani MA. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. *Org Med Chem Lett*. 2012; 2 (1): 30.
 27. Mironov AN. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. M.: Grif i K, 2012; 994 s.

ТРАНСАБДОМИНАЛЬНОЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЕ СКАНИРОВАНИЕ КАК СКРИНИНГОВЫЙ ЭТАП ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЕРИТОНИТА

Д. В. Плоткин^{1,2}✉, О. В. Кириллова¹, А. В. Никаноров³, М. Н. Решетников¹, А. О. Штыхно¹, Е. О. Лошкарёва², Е. С. Короткова², М. В. Синицын¹

¹ Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом, Москва, Россия

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

³ Московский клинический научный центр имени А. С. Логанова, Москва, Россия

За последние годы отмечен рост числа случаев туберкулезного перитонита. Туберкулез брюшины — сложный объект для диагностики и нередко верификация диагноза происходит со значительными задержками. В клинической практике предложен непродолжительный и доступный метод лучевой диагностики при подозрении на туберкулезный перитонит — ультразвуковое исследование (УЗИ). Целью работы было описать эхо-семиотику туберкулезного перитонита с созданием интегральной шкалы оценки значимости отдельных эхо-симптомов туберкулеза брюшины и определить роль УЗ-сканирования в верификации диагноза. Произведен ретроспективный анализ инвазивной и УЗ-диагностики 37 пациентов с подтвержденным туберкулезным перитонитом в период с 2009 по 2019 г. В качестве группы сравнения использовали такие же данные исследований у 28 больных с заболеваниями, часто имитирующими туберкулезный перитонит (канцероматозом и саркоидозом брюшины, неспецифическим асцитом). Выделены прямые и косвенные признаки поражения брюшины при туберкулезе, на основании этого создана интегральная шкала оценки значимости отдельных эхо-симптомов. С этой целью каждому эхо-симптому присваивали от 0 до 3 баллов. При оценке визуализации описанных эхо-признаков возможно прогнозировать вероятность туберкулезной этиологии заболевания. Получены следующие статистические данные: низкая вероятность наличия туберкулезного перитонита при оценке визуализации всех описанных эхо-симптомов — до 4 баллов, средняя — от 5 до 8 баллов, высокая 9 и более баллов. Разработанная интегральная схема оценки УЗ-признаков позволяет клиницисту на основании эхографического исследования верифицировать туберкулезный перитонит или выбрать дальнейшую тактику в диагностическом поиске.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, туберкулез брюшины, перитонит, канцероматоз, саркоидоз

Вклад авторов: Д. В. Плоткин, М. Н. Решетников, А. В. Никаноров, М. В. Синицын — разработка концепции и дизайна исследования, общая ответственность; О. В. Кириллова, А. О. Штыхно, Е. О. Лошкарёва — сбор материала; Е. С. Короткова, Д. В. Плоткин — статистическая обработка данных; Д. В. Плоткин, М. Н. Решетников, О. В. Кириллова, А. В. Никаноров — анализ полученных данных; Д. В. Плоткин, М. Н. Решетников — подготовка текста; О. В. Кириллова, А. О. Штыхно, А. В. Никаноров — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (протокол № 12 от 9 декабря 2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Владимирович Плоткин
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; kn13@list.ru

Статья получена: 17.03.2020 **Статья принята к печати:** 04.04.2020 **Опубликована онлайн:** 12.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.018

TRANSABDOMINAL ULTRASOUND AS A SCREENING STAGE FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS PERITONITIS

Plotkin DV^{1,2}✉, Kirillova OV¹, Nikanorov AV³, Reshetnikov MN¹, Shtykhno AO¹, Loshkareva EO², Korotkova ES², Sinitsyn MV¹

¹ Moscow Research and Clinical Center for TB Control, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Loginov Moscow Clinical Scientific Practical Center, Moscow, Russia

In recent years, the incidence of tuberculous peritonitis increased. Peritoneal tuberculosis is difficult to diagnose, and often the diagnosis is verified with significant delay. In clinical practice, a quick and affordable diagnostic radiology method, ultrasonography (USG), is proposed for patients with suspected tuberculous peritonitis. The study was aimed to describe the sonographic semiology of tuberculous peritonitis, to create the integrated scale for the individual peritoneal tuberculosis sonographic symptoms significance assessment, and to determine the role of ultrasound imaging in the diagnosis verification. Retrospective study of the invasive and ultrasound investigation results of 37 patients with confirmed tuberculous peritonitis was carried out in 2009–2019. Similar data obtained by investigation of 28 patients with the disorders which often mimic the tuberculous peritonitis (peritoneal carcinomatosis and sarcoidosis, non-specific ascites) were used as a comparison group. Direct and indirect signs of peritoneal lesion in patients with tuberculosis were identified. On the basis of that, an integral scale for the individual sonographic symptoms significance assessment was created. Each sonographic symptom received a 0–3 score. Assessment of those sonographic signs visualization allowed us to evaluate the probability of the disorder's tuberculous etiology. The following data were obtained: score under 4 corresponded to low probability, score 5–8 corresponded to medium probability, and score over 9 corresponded to high probability of tuberculous peritonitis based on the visualization of all described sonographic symptoms. The proposed integrated scale for the sonographic signs assessment allows the clinician to verify the tuberculous peritonitis diagnosis based on the ultrasound imaging data or to select the further tactics of diagnosis.

Keywords: ultrasonography, peritoneal tuberculosis, peritonitis, carcinomatosis, sarcoidosis

Author contribution: Plotkin DV, Reshetnikov MN, Nikanorov AV, Sinitsyn MV — study concept and design, overall management; Kirillova OV, Shtykhno AO, Loshkareva EO — sample collection; Korotkova ES, Plotkin DV — statistical analysis; Plotkin DV, Reshetnikov MN, Kirillova OV, Nikanorov AV — data analysis; Plotkin DV, Reshetnikov MN — manuscript writing; Kirillova OV, Shtykhno AO, Nikanorov AV — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Moscow Research and Clinical Center for TB Control (protocol № 12 dated December 9, 2019). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry V. Plotkin
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; kn13@list.ru

Received: 17.03.2020 **Accepted:** 04.04.2020 **Published online:** 12.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.018

Туберкулезный перитонит вновь появился в европейских и российских клиниках после 45 лет забвения. Этому способствовали пандемия ВИЧ-инфекции, миграция населения из эндемичных регионов, появление штаммов микобактерий с широкой лекарственной устойчивостью и медикаментозные иммуносупрессии. Туберкулез брюшины (первичный перитонит) является хроническим воспалительным процессом с неспецифическими клиническими проявлениями, что нередко вызывает значительные трудности и задержку в диагностике [1–3]. По мнению большинства исследователей, наиболее точным методом верификации туберкулеза брюшины служит лапароскопия с биопсией пораженных участков серозного покрова брюшной полости [4–5]. Рост микобактерий туберкулеза (МБТ) из экссудата показывает положительный результат на 4–6-й неделе после посева только в 10% случаев, а ПЦР-диагностика выпота информативна лишь в трети наблюдений и также требует проведения инвазивного вмешательства [5–6]. В клинической практике предложены методы непродолжительной по времени и доступной лучевой диагностики при подозрении на туберкулезный перитонит — ультразвуковое исследование (УЗИ) и компьютерная томография [1, 7, 8], однако в большинстве случаев они не позволяют точно идентифицировать воспалительный процесс на брюшине.

Ультрасонография — наиболее безопасный, эффективный и экономичный способ визуализации, способный помочь клиницистам принять решения по диагностике и своевременному лечению туберкулезного перитонита. Сегодня трансабдоминальная сонография играет важную роль в оценке воспалительных, доброкачественных и злокачественных заболеваний брюшины, как в амбулаторных, так и в стационарных условиях. В медицинской литературе описаны различные эхо-признаки, позволяющие предположить туберкулезный перитонит, а также способы, позволяющие дифференцировать его с канцероматозом брюшины и неспецифическим асцитом [7–11]. Точность этих методик напрямую зависит от квалификации и опыта врача, а также класса используемой аппаратуры. Последние 10 лет в большинстве исследований приводятся примеры отдельных наблюдений из практики по визуализации перитонеальных изменений при туберкулезе, однако полностью отсутствует анализ встречаемости признаков и их сочетаний [9, 11].

Цель данной работы — описать эхо-семиотику туберкулезного перитонита с созданием интегральной шкалы оценки значимости отдельных эхо-симптомов туберкулеза брюшины и определить роль ультразвукового (УЗ) сканирования в верификации диагноза.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с 2009 по 2019 г. в туберкулезном хирургическом отделении клиники № 2 Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом г. Москвы с целью определения основных эхо-симптомов туберкулезного перитонита было проведено ретроспективное исследование результатов УЗ-диагностики 37 пациентов с туберкулезным перитонитом, у которых ведущим клиническим синдромом было наличие большого количества выпота в брюшной полости (экссудативная, адгезивно-слипчивая, казеозная и смешанная формы туберкулезного перитонита). Диагноз туберкулеза брюшины был установлен у всех 37 больных

при гистологическом (100%) и бактериоскопическом (81,1%) исследованиях биоптатов брюшины, полученных с помощью лапароскопических инвазивных методик, что и являлось критерием включения пациентов в исследование. Среди госпитализированных больных преобладали лица мужского пола (мужчины — 22; 59,5%, женщины — 15; 40,5%) в возрасте 20–65 лет (медиана — 37,2 года). ВИЧ-положительный статус был зарегистрирован у 23 больных (62,7%), а туберкулез легких — у 34 пациентов (91,6%) с преобладанием инфильтративных и диссеминированных форм. Критерий исключения пациентов из исследования: отсутствие гистологической верификации туберкулеза брюшины.

Для группы сравнения был произведен отбор пациентов, у которых при лапароскопическом, гистологическом и лабораторном исследованиях верифицированы заболевания, наиболее часто имитирующие туберкулезный перитонит, как в клинической картине, так и при УЗИ. В контрольную группу были включены 28 пациентов с асцитом различной неспецифической этиологии (21 пациент; 75,0%), саркоидозом брюшины (1 пациент; 3,5%) и канцероматозом брюшины (6 пациентов; 21,5%). Возраст пациентов варьировал от 29 до 54 лет (медиана 36,1 года); туберкулез легких был диагностирован у всех пациентов, а ВИЧ-положительный статус имел место у 10 (35,7%) больных контрольной группы. Критерии исключения пациентов из контрольной группы: наличие туберкулезных гранул и КУМ в биоптатах брюшины; положительный результат ПЦР-диагностики выпота на ДНК МБТ.

В комплекс обследования пациентов включали полипозиционную рентгенографию и рентгеновскую компьютерную томографию грудной клетки, комплексное УЗИ органов брюшной полости, диагностическую видеолaparоскопию, лабораторные и морфологические методы исследования. Диагностические исследования расширяли применением гистологического, цитологического, и молекулярно-генетического анализов интраоперационного материала (биоптатов и экссудата). При проведении микробиологических исследований использовали бактериоскопию по Цилю–Нильсену для обнаружения кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), посева на плотные и жидкие питательные среды с применением автоматизированных систем.

УЗИ органов брюшной полости выполняли на многофункциональном (экспертного класса) аппарате Toshiba Aplio 500 (Toshiba; Япония) и портативном аппарате LOGIC ER7 (General Electric; Южная Корея), работающих в режиме серой шкалы и реального времени. Исследование брюшной полости проводили конвексным датчиком 2,5–5,0 МГц с оценкой наличия и распространенности свободной жидкости, состояния селезенки, печени. Для оценки состояния петель кишечника, брыжейки, большого и малого сальника и лимфатического аппарата использовали высокочастотный линейный датчик 10–15 МГц.

Оперативные вмешательства (лапароскопия с биопсией или лапаротомия) были выполнены в плановом порядке при наличии асцита неясной этиологии или с целью уточнения характера патологического процесса, выявленного при УЗИ и компьютерной томографии, в экстренном порядке при клинической картине, не позволяющей исключить перитонит.

Критерием верификации диагноза служило обнаружение в биоптатах брюшины туберкулезных гранул, КУМ при бактериоскопическом исследовании и положительный результат ПЦР-диагностики выпота, а также сочетание этих признаков.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартных статистических методов и пакета программ Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc.; США), языка Python 3.6 (Python Software Foundation; США) и теоремы Т. Байесса [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки эхо-симптомов туберкулезного перитонита нами были выделены следующие прямые признаки, относящиеся непосредственно к воспалительному процессу в серозных листках и связанной с ним экссудацией: наличие свободной жидкости и ее расположение в брюшной полости, однородность экссудата, наличие фибриновых септ-перегородок или полуперепоронок в брюшной полости, слоистость и неоднородность брюшины и сальника, наличие диссеминатов на серозных листках.

К косвенным признакам туберкулезного поражения брюшины мы отнесли изменения со стороны петель кишечника, увеличение и неоднородность селезенки, возможность визуализации сгруппированных увеличенных мезентериальных лимфатических узлов. Косвенные признаки напрямую не отражают воспалительный процесс в листках брюшины, но могут быть следствием длительно существующего асцита (утолщение стенок кишечника), а также реактивного или специфического лимфаденита и спленита при абдоминальном туберкулезе.

При выполнении УЗ-сканирования брюшной полости у лиц с туберкулезным перитонитом во всех случаях была выявлена свободная жидкость различного объема. Выпот во всех отделах брюшной полости удалось визуализировать у 19 пациента (51,4%). В восьми наблюдениях (21,6%) свободная жидкость была локализована преимущественно в малом тазу и между петлями тонкой кишки, а у 10 пациентов (27,0%) выявлено осумкованное расположение свободной жидкости в брюшной полости с формированием полусепт или полных перегородок из пластов фибрина. Неоднородность выпота за счет свободно флотирующих пластов фибрина и мелких фибриновых секвестров диаметром до 6–8 мм была отмечена в подавляющем большинстве случаев (75,7%). Слоистость и гетерогенность

листов париетальной брюшины на отдельных участках, преимущественно в проекции илеоцекальной области, отмечены в 14 случаях (37,8%), причем в одном наблюдении в толще передней брюшной стенки были визуализированы очаги казеозной деструкции (рис. 1). Неоднородность и слоистость большого сальника обнаружены у 9 пациентов (24,3%). Характерные для туберкулезного перитонита бугорковые диссеминаты визуализированы у 9 больных (24,3%), их размеры колебались в пределах 5–9 мм и были описаны как возвышающиеся над париетальной брюшиной гиперэхогенные аваскулярные очаговые образования с неровным контуром (рис. 1, 2).

Другие УЗ-признаки, позволяющие предположить туберкулезную природу изменений на брюшине, имели косвенный характер и включали в себя эхо-симптомы вовлечения в патологический процесс висцеральной брюшины кишечника, селезенки и мезентериального лимфатического аппарата. Изменения со стороны стенок кишки имели место у 7 (18,9%) пациентов, как правило, отмечалось локальное утолщение кишечной стенки свыше 3 мм на протяжении не более 45–60 мм. В 6 случаях (16,2%) были выявлены расширение просвета кишечника более 33–35 мм и ослабление или полное отсутствие перистальтики, что трактовалось нами как парез. Увеличение брыжеечных лимфатических узлов более 10–16 мм в диаметре с неоднородной структурой зарегистрировано у 19 пациентов (51,4%). Спленомегалия с неоднородностью структуры селезенки была отмечена у 5 больных (13,5%). Сравнительные результаты УЗ-сканирования пациентов контрольной группы представлены в табл. 1.

Для создания интегральной шкалы оценки вероятности диагностики туберкулезного перитонита при УЗИ были рассмотрены все варианты сочетания признаков (эхо-симптомов) между собой. С этой целью каждому эхо-симптому в зависимости от его значимости и специфичности было присвоено от 0 до 3 баллов. Первые три признака (распределение свободной жидкости) определяют первое полное вероятностное пространство события (наличие выпота в брюшной полости). Бугорковые диссеминаты различных размеров можно считать вторым полным вероятностным пространством

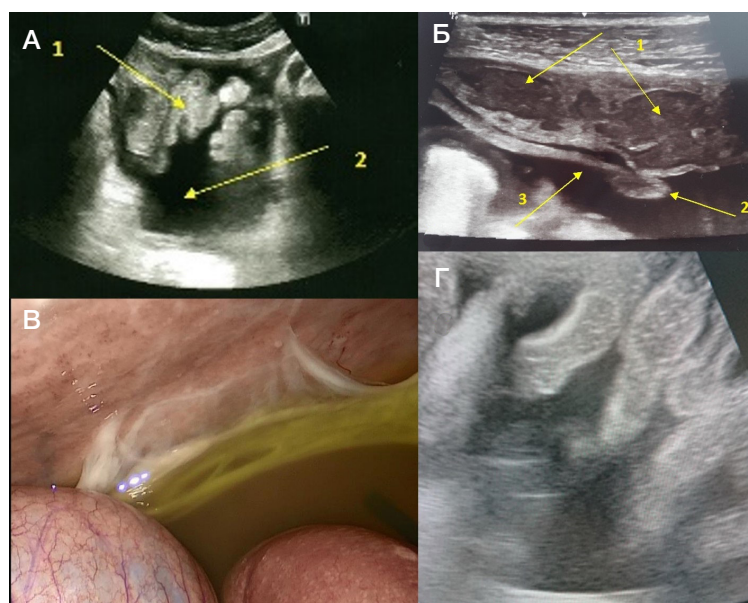


Рис. 1. Туберкулезный перитонит. **А.** Эхограмма: 1 — паретичные петли кишки, 2 — экссудат. **Б.** Эхограмма: 1 — казеозный абсцесс в толще брюшины, 2 — туберкулезный диссеминат, 3 — слоистость париетальной брюшины. **В.** Лапароскопия. **Г.** Эхограмма: неоднородный фибринозный выпот и паретичные петли тонкой кишки

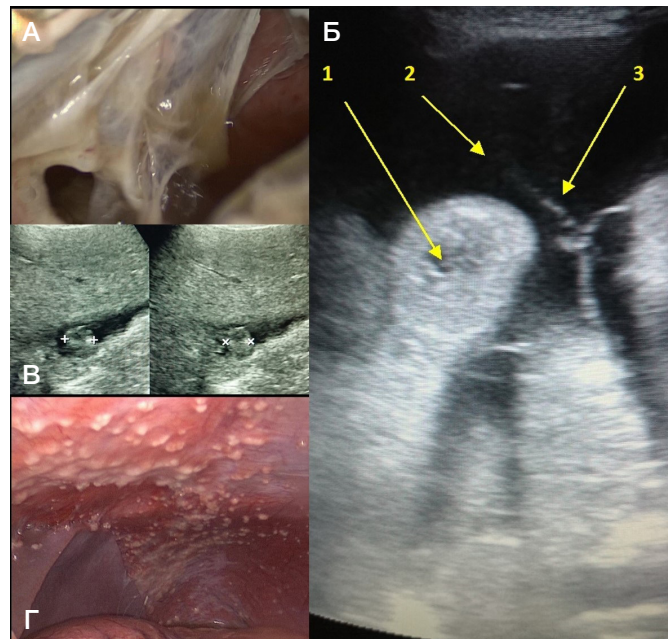


Рис. 2. Туберкулезный перитонит. **А.** Лапароскопия: фибриновые наложения, образующие перегородки. **Б.** Эхограмма: 1 — петли кишки, 2 — экссудат, 3 — фибриновые тяжи, образующие перегородки. **В.** Эхограмма: туберкулезный диссеминат (7 мм). **Г.** Лапароскопия: туберкулезные диссемины на париетальной брюшине

события (по признаку размера диссеминатов). Остальные же признаки (неоднородность выпота с фрагментами фибрина, слоистость и неоднородность листков париетальной брюшины и сальника, казеозные абсцессы в толще брюшины) независимы между собой. Далее были произведены расчеты всех вариантов сочетания признаков между собой на языке Python 3.6 с использованием теоремы Т. Байесса, которая позволяет найти данную вероятность исходя из представленных данных. Предположения о приближении биномиальных распределений к нормальным и вывод о вероятностном отнесении больных по группам (низкая, средняя, высокая) выполнены с использованием библиотек stats и numpy (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, можно отметить, что визуальные признаки туберкулезного перитонита, доброкачественных

гранулематозов брюшины (саркоидоза), неспецифического асцита и перитонеального канцероматоза во многом схожи и в большинстве случаев ставят исследователя перед диагностическим выбором.

Как показывает собственный опыт проведения УЗ-диагностики при туберкулезном перитоните и данные литературы [7–10], основным эхо-симптомом служит неоднородная свободная или осумкованная жидкость в брюшной полости (75–80%). Характерным признаком, отличающим туберкулезный перитонит от неспецифического асцита, служит более частая (около 75%) визуализация свободно располагающихся в экссудате секвестров фибрина, которые в отдельных случаях образуют полные или неполные перегородки, что ведет к осумковыванию выпота (рис. 2). Тем не менее подобные УЗ-находки в 50% случаев могут встречаться и при канцероматозе брюшины [13]. В свою очередь для канцероматоза высока вероятность локализации опухолевых

Таблица 1. Прямые и косвенные эхо-признаки туберкулезного перитонита. Заданный уровень значимости признака равен 0,95

Эхо-симптом	Туберкулезный перитонит $n = 37$	Асцит и канцероматоз $n = 28$	Характер признака
Свободная жидкость во всех отделах брюшной полости	51,4% ± 16,1	82,1% ± 14,1	Прямые признаки
Свободная жидкость в малом тазу и между петлями кишечника	21,6% ± 13,2	3,6% ± 6,8	
Осумкованная жидкость	27,0% ± 14,3	14,3% ± 12,9	
Неоднородность выпота	75,7% ± 13,8	3,6% ± 6,8	
Слоистость и неоднородность листков париетальной брюшины и сальника	37,8% ± 15,6	0	
Казеозные абсцессы в толще брюшины	2,7% ± 1,6	0	
Бугорковые диссемины брюшины	24,3% ± 13,8	10,7% ± 11,5	Косвенные признаки
Утолщение стенки кишечника	18,9% ± 12,6	21,4% ± 15,2	
Парез кишечника	16,2% ± 11,9	10,7% ± 11,5	
Спленомегалия	13,5% ± 11,0	71,4% ± 16,7	
Увеличение и неоднородность мезентериальных лимфатических узлов	51,4% ± 16,1	14,3% ± 12,9	
Увеличение печени и обеднение сосудистого рисунка	27,0% ± 14,3	82,1% ± 14,2	
Расширение воротной вены и диффузные изменения печени	8,1% ± 8,8	85,7% ± 12,9	

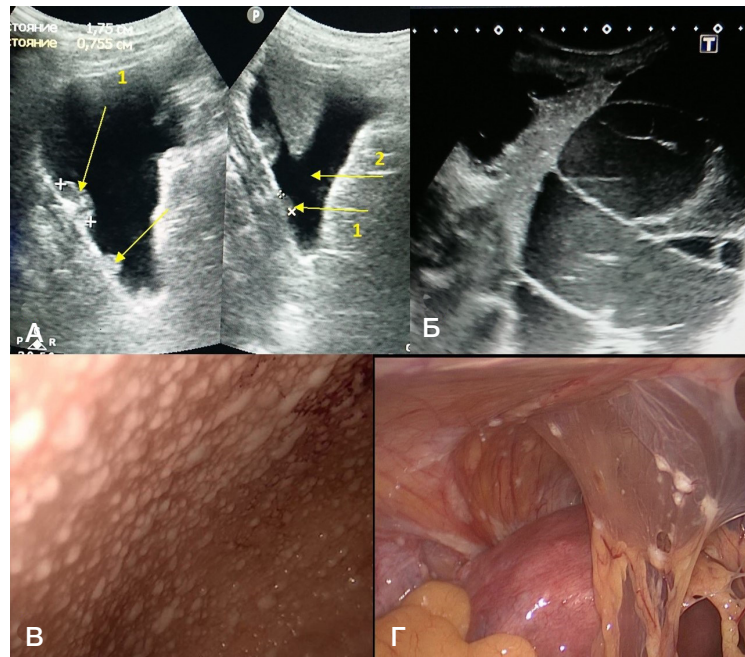


Рис. 3. Гранулематозные перитониты и канцероматоз. **А.** Эхограмма: канцероматоз брюшины при раке сигмовидной кишки. 1 — опухолевые диссемины (17 и 8 мм), 2 — асцит. **Б.** Эхограмма: осумкованный асцит при раке яичника. **В.** Лапароскопия: канцероматоз париетальной брюшины. **Г.** Лапароскопия: саркоидоз брюшины

диссеминатов диаметром 5–18 мм (рис. 3). По данным нашего исследования, подобные гиперэхогенные образования на брюшине можно обнаружить и при доброкачественных гранулематозах, например при саркоидозе (рис. 3), что тоже не дает основания выделить этот признак в специфический. Туберкулезная диссеминация на брюшине, как правило, имеет меньший диаметр и максимальный размер бугорка до 9 мм (медиана 4–6 мм) [11, 13–16]. Более достоверным эхо-симптомом туберкулезного перитонита является неоднородность (слоистость) участков париетальной брюшины и большого сальника, однако этот признак удается определить чуть более чем в трети случаев. Наиболее распространенной находкой является протяженное гипозоногенное утолщение серозного париетального листа от 4 до 8 мм, что отражает хронический характер воспаления. Такой вариант визуализации утолщенной брюшины, по данным различных исследователей, все же с высокой долей вероятности соответствует туберкулезному процессу [8, 17–20] и реже встречается при перитонеальном карциноматозе, где утолщение серозного покрова чаще всего непротяженное

и узловатое [20]. Вовлечение большого сальника и его изменения разные авторы описывают как характерный признак туберкулезного оментита или канцероматоза примерно с одинаковой частотой, поэтому мы считаем этот признак специфичным для обоих заболеваний, учитывая, что визуализировать сальниковые изменения удастся достаточно редко (менее 25% наблюдений) [21].

Косвенные признаки поражения брюшины при туберкулезе, такие как лимфаденопатия с аденомегалией, встречаются у половины больных туберкулезным перитонитом, что отражает патогенетический характер лимфогенной диссеминации в листки брюшины. Изменения в мезентериальном лимфатическом аппарате чаще всего носят деструктивный характер, и лимфатические узлы визуализируются как сгруппированные анэхогенные округлые структуры диаметром более 10 мм. По данным литературы, частота содружественного поражения внутрибрюшных лимфатических узлов и брюшины составляет 10–54% [22–24].

Таким образом, понятно, что туберкулезный перитонит не имеет каких-либо эталонных или уникальных эхо-

Таблица 2. Интегральная таблица встречаемости эхо-симптомов при туберкулезном перитоните

Эхо-признак		Баллы
Свободная жидкость во всех отделах брюшной полости		1
Свободная жидкость в малом тазу и между петлями кишечника		0
Осумкованная жидкость в брюшной полости с перегородками		2
Неоднородность выпота с фрагментами фибрина		2
Слоистость и неоднородность листков париетальной брюшины и сальника		3
Казеозные абсцессы в толще брюшины		3
Бугорковые диссемины брюшины до 9 мм в диаметре		3
Бугорковые диссемины брюшины более 9 мм в диаметре		0
Косвенные признаки: изменения стенки кишки и мезентериальная лимфаденопатия		1
Вероятность наличия туберкулезного перитонита		
высокая	средняя	низкая
≥ 9 баллов	5–8 баллов	≤ 4 балла

симптомов, что крайне затрудняет его диагностику при УЗИ. В то же время различные варианты сочетания некоторых прямых и косвенных признаков повышают вероятность правильной трактовки УЗ-картины при туберкулезе брюшины.

На основании расчетов и распределения вероятностей получены следующие статистические данные: низкая вероятность наличия туберкулезного перитонита при оценке визуализации всех описанных эхо-симптомов — до 4 баллов, средняя — 5–8 баллов, высокая — 9 и более баллов. Основываясь на сумме полученных баллов в результате УЗ-сканирования, можно предложить диагностический алгоритм, в котором четко указаны дальнейшие диагностические и лечебные стратегии для каждого из вариантов сочетания эхо-симптомов и наличия у пациента ВИЧ-инфекции и/или туберкулеза легких (рис. 4).

ВЫВОДЫ

Полученная интегральная схема для оценки УЗ-признаков достаточно проста и позволяет клиницисту на основании результатов эхографического исследования выбрать дальнейшую тактику в диагностическом поиске и своевременно начать лечение. Предложенная схема может также войти в алгоритм диагностического поиска при любой форме асцита или гранулематозного перитонита.

Диагностика туберкулеза брюшины по-прежнему остается сложной задачей, ввиду неспецифичности клинической симптоматики и подострого характера течения. Доступное и распространенное в медицинской практике трансабдоминальное ультразвуковое исследование может стать скрининговым диагностическим исследованием первой линии для верификации туберкулезного перитонита. Туберкулез брюшины следует принимать во



Рис. 4. Тактический алгоритм диагностики туберкулезного перитонита

внимание во всех случаях дифференциальной диагностики у пациентов с неясным асцитом, туберкулезом легких и иммуносупрессией.

Литература

- Gupta P, Kumar S, Sharma V, Mandavdhare H, Dhaka N, Sinha SK, et al. Common and uncommon imaging features of abdominal tuberculosis. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology*. 2019; 63 (3): 329–39. DOI: 10.1111/1754-9485.12874.
- Синицын М. В., Белиловский Е. М., Соколина И. А., Решетников М. Н., Титюхина М. В., Батуринов О. В. Внепочечные локализации туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 95 (11): 19–25. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-19-25.
- Ködmön C, Zucs P, Van der Werf MJ. Migration-related tuberculosis: Epidemiology and characteristics of tuberculosis cases originating outside the European Union and European Economic Area, 2007 to 2013. *Eurosurveillance*. 2016; (21): 23–27. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.12.30164.
- Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *The American Journal of Surgery*. 2003; (185): 567–73. DOI: 10.1016/s0002-9610(03)00079-5.
- Плоткин Д. В., Синицын М. В., Решетников М. Н., Харитонов С. В., Скопин М. С., Соколина И. А. Туберкулезный перитонит. «Забываемая» болезнь. *Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова*. 2018; (12): 38–44. DOI: 10.17116/hirurgia201812138.
- Vaid U, Kane GC. Tuberculous Peritonitis. *Microbiology Spectrum*. 2017; (5): 324–29. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0006-2016.
- Demirkazik FB, Akhan O, Ozmen MN, Akata D. US and CT findings in the diagnosis of tuberculous peritonitis. *Acta Radiologica*. 1996; 37 (4): 517–20. DOI: 10.1177/02841851960373P217.
- Portielje JE, van der Werf SD, Mutsaers JA, Lohle PN, Puylaert JB. Peritonitis tuberculosa echografisch te herkennen [Echographic recognition of tuberculous peritonitis]. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*. 1997; 141 (2): 89–93.
- Мойдунова Н. К., Турдумамбетова Г. К. Ультразвуковая картина абдоминального туберкулеза. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017; (6): 111–3.
- Востров А. Н., Митина Л. А., Казакевич В. И., Каприн А. Д., Степанов С. О., Гуц О. В. и др. Возможности ультразвуковой диагностики в дифференциации поражения брюшины при раке яичников и туберкулезе. *Ультразвуковая и функциональная диагностика*. 2017; (3): 60–71.
- Husain A, Firdaus H, Panday P. Study of Comparison of high resolution sonography and computed tomography in evaluation of abdominal tuberculosis among patients in Lucknow, Uttar Pradesh, India. *International Journal of Surgery*. 2018; (5): 1713–9. DOI: 10.18203/2349-2902.isj20181388.
- Goodman SN. Toward Evidence-Based Medical Statistics. 2: The Bayes Factor. *Annals of Internal Medicine*. 1999; (130): 1005–13.
- Smereczyński A, Kołaczek K, Bernatowicz E. Difficulties in differentiating the nature of ascites based on ultrasound imaging. *Journal of Ultrasonography*. 2017; 17 (69): 96–100. DOI: 10.15557/JoU.2017.0013.
- Atzori S, Vidili G, Delitala G. Usefulness of ultrasound in the diagnosis of peritoneal tuberculosis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2012; 6 (12): 886–90. DOI: 10.3855/jdc.2654.
- Weill FS, Costaz R, Guetarni S, Maltoni I, Rohmer P. Echographic diagnosis of peritoneal metastases in patients with ascites. *European Journal of Radiology*. 1990; (71): 365–8.
- Степанов С. О., Митина Л. А., Гуц О. В., Беспалов П. Д.

Визуализация перитонеальной диссеминации при ультразвуковом исследовании. Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2013; 3 (4): 66–70.

17. N'dri K, Gbazi GC, Konan A, Kouadio, Koffi, N'dri N, et al. Apport de l'échographie dans le diagnostic de la tuberculose péritonéale ascitique. Médecine d'Afrique Noire. 1993; (40): 503–6.
18. Dafiri R, Imani F. Tuberculose abdominale. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés). Radiodiagnostic — Appareil digestif 2001; 33-010-A-30: 12.
19. Gastli H, Hassine W, Absesselem K, Gharbi HA. Echographic aspects of peritoneal tuberculosis. Apropos of 14 cases. European Journal of Radiology. 1983; (64): 325–9.
20. Mbengue A, Ndiaye AR, Amar N, Diallo M, et al. Ultrasonography of peritoneal tuberculosis. Journal of Ultrasonography. 2019; (19): 98–104. DOI: 10.15557/JoU.2019.0014.
21. Batra A, Gulati MS, Sarma D, Paul SB. Sonographic appearances in abdominal tuberculosis. Journal of Clinical Ultrasound. 2000; (28): 233–45. DOI: 10.1002/(sici)1097-0096(200006)28:5<233::aid-jcu5>3.0.co;2-c.
22. Fall F, Ndiaye AR, Ndiaye B, Gning SB, Diop Y, Fall B. Peritoneal tuberculosis: a retrospective study of 61 cases at Principal hospital in Dakar. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2010; (4): 38–43.
23. Darré T, Tchaou M, Sonhaye L, Patassi AA, Kanassoua K, Tchangaï B. Analyse d'une série de 44 cas de tuberculose péritonéale diagnostiqués au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Tokoin de Lomé (1993–2014). Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 2015; (108): 324–7.
24. Heller T, Goblrirsch S, Wallrauch C, Lessells R, Brunetti E. Abdominal tuberculosis: sonographic diagnosis and treatment response in HIV positive adults in rural South Africa. International Journal of Infectious Diseases. 2010; 14 (Suppl 3): 108–12. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.030.
1. Gupta P, Kumar S, Sharma V, Mandavdhare H, Dhaka N, Sinha SK, et al. Common and uncommon imaging features of abdominal tuberculosis. Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology. 2019; 63 (3): 329–39. DOI: 10.1111/1754-9485.12874.
2. Sinitsyn MV, Belilovsky EM, Sokolina IA, Reshetnikov MN, Tityukhina MV, Baturin OV. Extrapulmonary tuberculosis in HIV patients. Tuberculosis and Lung Diseases. 2017; 95 (11): 19–25. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-19-25. Russian.
3. Ködmön C, Zucs P, Van der Werf MJ. Migration-related tuberculosis: Epidemiology and characteristics of tuberculosis cases originating outside the European Union and European Economic Area, 2007 to 2013. Eurosurveillance. 2016; (21): 23–27. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.12.30164.
4. Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. The American Journal of Surgery. 2003; (185): 567–73. DOI: 10.1016/s0002-9610(03)00079-5.
5. Plotkin DV, Sinitsyn MV, Reshetnikov MN, Kharitonov SV, Skopin MS, Sokolina IA. Tuberculous peritonitis. «Forgotten» disease. Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova. 2018; (12): 38–44. DOI: 10.17116/hirurgia20181213. Russian.
6. Vaid U, Kane GC. Tuberculous Peritonitis. Microbiology Spectrum. 2017; (5): 324–29. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0006-2016.
7. Demirkazik FB, Akhan O, Ozmen MN, Akata D. US and CT findings in the diagnosis of tuberculous peritonitis. Acta Radiologica. 1996; 37 (4): 517–20. DOI: 10.1177/02841851960373P217.
8. Portielje JE, van der Werf SD, Mutsaers JA, Lohle PN, Puylaert JB. Peritonitis tuberculosa echografisch te herkennen [Echographic recognition of tuberculous peritonitis]. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde. 1997; 141 (2): 89–93.
9. Mojdonova NK, Turdumambetova GK. Ultrasound picture of abdominal tuberculosis. International journal of applied and fundamental research. 2017; (6): 111–3. Russian.
10. Vostrov AN, Mitina LA, Kazakevich VI, Kaprin AD, Stepanov SO, Guts OV, et al. Value of ultrasound in differential diagnosis of ovarian cancer with peritoneal carcinomatosis and peritoneal tuberculosis. Ultrasound and functional diagnostics. 2017; (3): 60–71. Russian.
11. Husain A, Firdaus H, Panday P. Study of Comparison of high resolution sonography and computed tomography in evaluation of abdominal tuberculosis among patients in Lucknow, Uttar Pradesh, India. International Journal of Surgery. 2018; (5): 1713–9. DOI: 10.18203/2349-2902.isj20181388.
12. Goodman SN. Toward Evidence-Based Medical Statistics. 2: The Bayes Factor. Annals of Internal Medicine. 1999; (130): 1005–13.
13. Smereczyński A, Kołaczek K, Bernatowicz E. Difficulties in differentiating the nature of ascites based on ultrasound imaging. Journal of Ultrasonography. 2017; 17 (69): 96–100. DOI: 10.15557/JoU.2017.0013.
14. Atzori S, Vidili G, Delitala G. Usefulness of ultrasound in the diagnosis of peritoneal tuberculosis. The Journal of Infection in Developing Countries. 2012; 6 (12): 886–90. DOI: 10.3855/jidc.2654.
15. Weill FS, Costaz R, Guetarni S, Maltoni I, Rohmer P. Echographic diagnosis of peritoneal metastases in patients with ascites. European Journal of Radiology. 1990; (71): 365–8.
16. Stepanov SO, Mitina LA, Guts OV, Bespalov PD. Ultrasound imaging of peritoneal dissemination. Ultrasound and functional diagnostics. 2013; 3 (4): 66–70. Russian.
17. N'dri K, Gbazi GC, Konan A, Kouadio, Koffi, N'dri N, et al. Apport de l'échographie dans le diagnostic de la tuberculose péritonéale ascitique. Médecine d'Afrique Noire. 1993; (40): 503–6.
18. Dafiri R, Imani F. Tuberculose abdominale. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés). Radiodiagnostic — Appareil digestif 2001; 33-010-A-30: 12.
19. Gastli H, Hassine W, Absesselem K, Gharbi HA. Echographic aspects of peritoneal tuberculosis. Apropos of 14 cases. European Journal of Radiology. 1983; (64): 325–9.
20. Mbengue A, Ndiaye AR, Amar N, Diallo M, et al. Ultrasonography of peritoneal tuberculosis. Journal of Ultrasonography. 2019; (19): 98–104. DOI: 10.15557/JoU.2019.0014.
21. Batra A, Gulati MS, Sarma D, Paul SB. Sonographic appearances in abdominal tuberculosis. Journal of Clinical Ultrasound. 2000; (28): 233–45. DOI: 10.1002/(sici)1097-0096(200006)28:5<233::aid-jcu5>3.0.co;2-c.
22. Fall F, Ndiaye AR, Ndiaye B, Gning SB, Diop Y, Fall B. Peritoneal tuberculosis: a retrospective study of 61 cases at Principal hospital in Dakar. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2010; (4): 38–43.
23. Darré T, Tchaou M, Sonhaye L, Patassi AA, Kanassoua K, Tchangaï B. Analyse d'une série de 44 cas de tuberculose péritonéale diagnostiqués au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Tokoin de Lomé (1993–2014). Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 2015; (108): 324–7.
24. Heller T, Goblrirsch S, Wallrauch C, Lessells R, Brunetti E. Abdominal tuberculosis: sonographic diagnosis and treatment response in HIV positive adults in rural South Africa. International Journal of Infectious Diseases. 2010; 14 (Suppl 3): 108–12. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.030.

References

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЕРЕНОСА ОДНОГО ЭМБРИОНА У ПАЦИЕНТОК С ХОРОШИМ ОВАРИАЛЬНЫМ РЕЗЕРВОМ

Н. В. Сараева^{1,2}✉, Н. В. Спиридонова¹, М. Т. Тугушев¹, О. В. Шурыгина¹, А. И. Синицына¹, А. О. Корчагин²¹ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия² «Медицинская компания ИДК», группа компаний «Мать и Дитя», Самара, Россия

Совершенствование вспомогательных репродуктивных технологий привело к росту числа случаев многоплодной беременности. Один из инструментов выбора качественного эмбриона на перенос — использование time-lapse микроскопии (TLM). Целью работы было оценить исходы переноса одного эмбриона на пятые сутки культивирования у пациенток с хорошим овариальным резервом в программе ЭКО с использованием TLM. Исследовали 208 женщин с бесплодием, с хорошим овариальным резервом (при пункции фолликулов получено более восьми ооцитов): у 95 пациенток провели перенос одного эмбриона с использованием системы TLM (группа исследования); у 113 пациенток — с использованием традиционного культивирования и выбора эмбриона для переноса (группа контроля). Проведена оценка качества переносимых эмбрионов, частоты наступления клинической беременности, частоты достижения родов и случаев потери беременности. В каждой группе выделены две подгруппы: с неэлективным переносом одного эмбриона (подгруппа 5SET: 45 пациенток в группе исследования, 67 — в контрольной) и с элективным (подгруппа 5eSET: 50 пациенток в группе исследования, 46 — в контрольной). Группы не различались по среднему возрасту, фактору бесплодия, длительности бесплодия. В группе исследования в 100% случаев перенесены эмбрионы хорошего и отличного качества, в группе контроля — в 93,8% ($p = 0,037$). Частота наступления клинической беременности составила 64,2% в основной группе и 60,2% — в контрольной ($p = 0,65$). В группе исследования частота родов составила 54% в подгруппе 5eSET и 51,1% — в подгруппе 5SET ($p = 0,940$). В группе контроля в подгруппе 5eSET частота родов составила 54,4%, а в подгруппе 5SET — 34,3% ($p = 0,052$ по методу Фишера). Проведение элективного переноса эмбриона (5eSET) или использование TLM повышало вероятность родов в 2,17 раза ($p = 0,01$).

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, перенос одного эмбриона, элективный перенос бластоцисты, time-lapse микроскопия

Благодарности: к.б.н., доценту Самарского национального исследовательского университета имени академика С. П. Королева М. В. Комаровой за помощь в статистической обработке результатов исследования.

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в исследование и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом СамГМУ (протокол № 194 от 12 сентября 2018 г.). Всеми пациентами подписано добровольное информированное согласие на лечение методами вспомогательных репродуктивных технологий.

✉ Для корреспонденции: Наталья Владимировна Сараева
ул. Врубеля, 15–131, г. Самара, 443086; kuzichkina@gmail.com

Статья получена: 19.03.2020 Статья принята к печати: 07.04.2020 Опубликовано онлайн: 20.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.021

OPTIMIZATION OF A SINGLE-EMBRYO TRANSFER IN PATIENTS WITH GOOD OVARIAN RESERVE

Saraeva NV^{1,2}✉, Spiridonova NV¹, Tugushev MT¹, Shurygina OV¹, Sinitsyna AI¹, Korchagin AO²¹ Samara State Medical University, Samara, Russia² IDK Medical Company, the Mother and Child group, Samara, Russia

Due to refinements of assisted reproductive technology, the number of multiple pregnancies has increased substantially. Time-lapse microscopy (TLM) is a tool for selecting quality embryos for transfer. This study aimed to assess the outcomes of single-embryo transfer of autologous oocytes performed on day 5 of embryo incubation in a TLM-equipped system in patients with good ovarian reserve. The study was carried out in 208 infertile women with good ovarian reserve (over 8 oocytes retrieved). Single-embryo transfer following incubation in a TLM-equipped incubator was performed in 95 patients, who formed the main group; the control group consisted of 113 patients undergoing single-embryo transfer following a traditional culture and embryo selection procedure. We assessed the quality of transferred embryos, the rates of clinical pregnancy and pregnancy loss. Two subgroups were identified in each group of the participants: the 5SET subgroup (nonelective single-embryo transfer), which included 45 patients from the main group and 67 controls, and the 5eSET subgroup (elective single-embryo transfer), which consisted of 50 main group patients and 46 controls. The groups did not differ in terms of age, infertility factors and infertility duration. The quality of transferred embryos was excellent or good in all main group patients (100%); in the control group, the quality of transferred embryos was excellent or good in 93.8% of cases ($p = 0.037$). Clinical pregnancies were achieved in 64.2% of women in the main group and in 60.2% of controls ($p = 0.65$). Delivery rates were 54% and 51.1% in the 5eSET and 5SET subgroups of the main group, respectively ($p = 0.940$). For the control group, delivery rates were 54.4% and 34.3% in the 5eSET and 5SET subgroups, respectively ($p = 0.052$, Fisher exact test). Elective single-embryo transfer (5eSET) and the use of TLM increased the chance of pregnancy 2.17-fold ($p = 0.01$).

Keywords: assisted reproductive technology, single-embryo transfer, elective blastocyst transfer, time-lapse microscopy

Acknowledgements: the authors thank Komarova MV, PhD Biol., Associate Professor of Samara National Research University, for her help with the statistical analysis.

Author contribution: all authors equally contributed to the study and manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Samara State Medical University (Protocol 194 dated September 12, 2018). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Natalya V. Saraeva
Vrubelya, 15–131, Samara, 443086; kuzichkina@gmail.com

Received: 19.03.2020 Accepted: 07.04.2020 Published online: 20.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.021

Совершенствование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) за последние 15–20 лет привело к повышению частоты имплантации эмбрионов человека, что повлекло за собой рост числа многоплодных беременностей. Многоплодная беременность является доказанным фактором риска осложненного течения беременности и родов и значительно повышает риск возникновения материнских и перинатальных осложнений [1–3]. В связи с этим перенос одного эмбриона стал приоритетной задачей лечения методами ВРТ [4, 5].

Для максимального повышения вероятности наступления беременности в программах ВРТ первостепенное значение имеет возможность выбора эмбриона с наивысшим потенциалом развития. Это позволит сократить время до достижения беременности и облегчит ранжирование оставшихся эмбрионов для криоконсервации, что в последующем будет способствовать переносу потенциально качественного эмбриона в первую очередь [6, 7].

С момента возникновения технологии экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) морфологическая оценка эмбрионов человека была основным методом, используемым эмбриологами для оценки развития и выбора эмбрионов при переносе. Со временем были разработаны классификации для оценки развития и жизнеспособности эмбрионов. Однако их использование на практике оказалось более трудным, чем ожидалось, из-за высокودинамичного характера развития эмбриона в период преимплантации. Другими словами, эмбрион, оцененный в 8 ч утра на вторые сутки развития, может выглядеть совсем по-другому через несколько часов [8]. Следовательно, чрезвычайно сложно интерпретировать данные морфологии без оценки развития эмбриона в динамике, с анализом морфологии в разные промежутки времени.

С внедрением в лабораторию ЭКО time-lapse технологии, или TLM (электронной микроскопии с временным интервалом), — современного метода выбора эмбриона для переноса, наступила новая эра эмбриологии. Благодаря этой методике на сегодняшний день возможна оценка морфологии эмбрионов как континуум, т. е. с фиксацией изображения каждые несколько минут [9–11].

В настоящее время получены противоречивые данные о результатах использования TLM. Ретроспективное исследование показало, что культивирование эмбрионов в инкубаторе EmbryoScope может улучшить показатели рождаемости, а традиционные методы культивирования негативно влияют на развитие эмбрионов и потенциал имплантации [12]. Авторы текущих ретроспективных и проспективных исследований подчеркивают и преимущество этой технологии с многообещающими результатами [13–16], и отсутствие различий по сравнению с морфологической оценкой качества эмбрионов [17, 18].

Целью исследования было оценить исходы переноса одного эмбриона в программе ЭКО у пациенток с хорошим овариальным резервом с использованием TLM.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 208 женщин с бесплодием, которым был проведен перенос одного эмбриона по программе ЭКО на базе ЗАО «Медицинская компания ИДК» (г. Самара) в 2013–2015 гг.

Произведен статистический анализ 208 клинических и эмбриологических протоколов пациенток с помощью статистического пакета SPSS21, номер лицензии

20130626-3 (An IBM Company; США) и Microsoft Excel (Microsoft; США).

Критерии включения в исследование: программа ЭКО; циклы с использованием собственных ооцитов; циклы с получением восьми и более ооцитов; перенос одного эмбриона на пятые сутки культивирования; толщина эндометрия 8 мм и более на день переноса эмбриона.

Критерии исключения: программа ИКСИ; циклы с использованием донорских ооцитов; циклы с получением менее 8 ооцитов; циклы с переносом размороженного эмбриона; перенос эмбрионов на третьи сутки культивирования; перенос двух эмбрионов; толщина эндометрия менее 8 мм на день переноса эмбриона.

Ограничений по возрасту пациенток для включения в исследование не было. Минимальный возраст составил 20 лет, максимальный — 42 года.

Пациенток разделили на две группы. Группу исследования составили 95 пациенток с хорошим овариальным резервом с переносом одного эмбриона по программе ЭКО с использованием системы time-lapse микроскопии.

Группу контроля составили 113 пациенток с хорошим овариальным резервом с переносом одного эмбриона по программе ЭКО с использованием метода традиционного культивирования и выбора эмбриона для переноса. Средний возраст, факторы бесплодия, длительность отсутствия бесплодия в браке, порядковый номер настоящей программы ЭКО статистически не различались у пациенток двух групп. Средний возраст женщин в основной и контрольной группах составил $31,40 \pm 0,38$ и $30,65 \pm 0,37$ г. соответственно ($p > 0,05$).

Эмбриологический этап программы ЭКО в группе исследования проводили с использованием видео-системы наблюдения за развитием эмбрионов Primovision (Vitrolife; Швеция).

В обеих группах для оценки качества эмбрионов использовали буквенно-цифровую систему, разработанную Gardner и Schoolcraft в 1999 г. [19]. Бластоцисты градации AA, AB, BA оценивали как эмбрионы отличного качества; бластоцисты градации BB оценивали как эмбрионы хорошего качества; бластоцисты градации AC, CA, BC, CB, CC оценивали как эмбрионы удовлетворительного качества.

По типу переноса эмбриона в каждой группе были выделены две подгруппы: подгруппа с неэлективным переносом одного эмбриона на пятые сутки культивирования (подгруппа 5SET: 45 пациенток в группе исследования, 67 — в группе контроля) и подгруппа с элективным переносом одного эмбриона на пятые сутки культивирования (подгруппа 5eSET: 50 пациенток в группе исследования, 46 — в группе контроля). Элективным считали перенос при наличии выбора из двух и более эмбрионов отличного качества.

Дополнительно в группе исследования выбор эмбрионов на перенос проводили на основании их соответствия ключевым морфодинамическим параметрам системы. В качестве ключевых событий деления эмбрионов оценивали следующие параметры: время наступления первого дробления; интервал времени между первым и вторым дроблением; время наступления второго дробления; время наступления третьего дробления; время формирования бластоцисты. Если все параметры деления эмбриона соответствовали референсным значениям системы и эмбрион был отличного или хорошего качества на основании морфологической оценки, такой эмбрион выбирали для переноса (референс-положительный

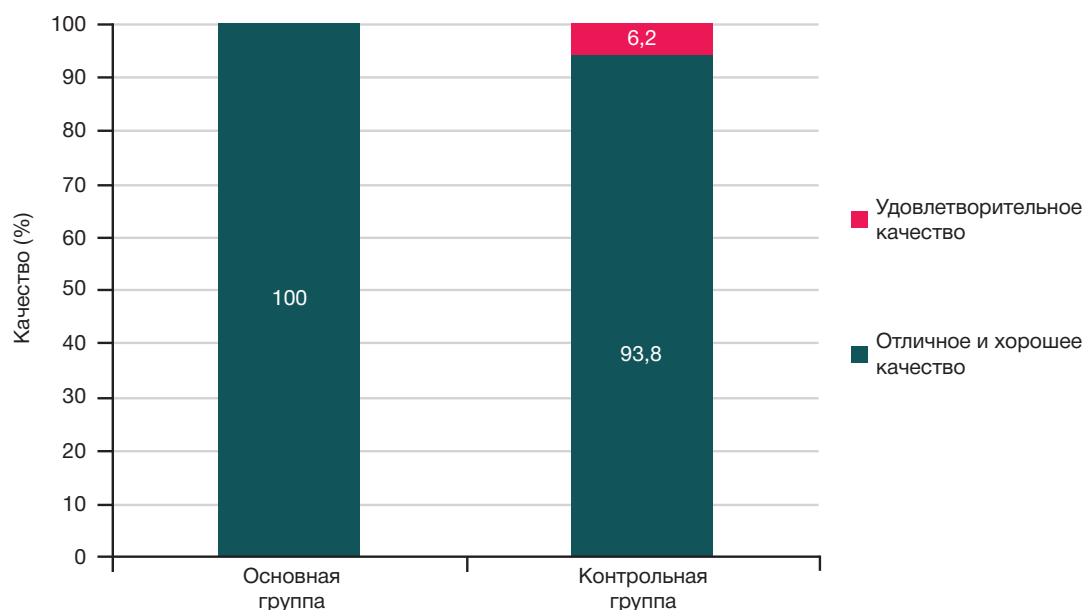


Рис. 1. Качество эмбрионов у пациенток основной группы и группы контроля

эмбрион). В подгруппе с референс-положительным эмбрионом было 52 пациентки. В том случае, если один или несколько параметров деления эмбриона не соответствовало референсному значению системы, выбор эмбриона на перенос осуществляли дополнительно на основании стандартной морфологической оценки (референс-отрицательный эмбрион). В подгруппе с референс-отрицательным эмбрионом было 43 пациентки.

В обеих группах культивирование проводили с использованием универсальной среды Continuous Single Culture (Irvine Scientific; USA). Оценку качества эмбрионов на пятые сутки культивирования проводили через 116–118 ч после оплодотворения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования в обеих группах была проведена оценка качества переносимых эмбрионов, частоты наступления клинической беременности, частоты наступления родов и частоты случаев потери беременности.

Доля пациенток позднего репродуктивного возраста (≥ 35 лет) составила 21,05% в основной группе и 23,89% — в группе контроля ($p > 0,05$). Поскольку настоящее исследование включало только женщин с хорошим овариальным резервом и с переносом одного эмбриона, то основную часть наблюдений составили женщины молодого репродуктивного возраста.

Среднее число полученных ооцитов в основной и контрольной группах составило $11,87 \pm 0,32$ и $12,49 \pm 0,40$ соответственно ($p > 0,05$).

Известно, что качество переносимых эмбрионов значительно влияет на вероятность наступления беременности при использовании ЭКО. Так, при переносе эмбрионов отличного или хорошего качества показатель частоты наступления клинической беременности значительно выше, чем при переносе эмбрионов удовлетворительного качества [20]. В группе исследования в 100% случаев были перенесены эмбрионы хорошего (16 эмбрионов) и отличного (79 эмбрионов) качества, в группе контроля этот показатель составил 93,8% (из них 88 эмбрионов отличного качества, 18 эмбрионов хорошего качества) ($p = 0,037$) (рис. 1). У 7 пациенток группы контроля были перенесены эмбрионы удовлетворительного качества (6,2%).

При анализе качества переносимых эмбрионов между подгруппой пациенток с положительным референсным значением перенесенных эмбрионов и подгруппой пациенток с отрицательным референсным значением перенесенных эмбрионов различий не выявлено. В подгруппе с положительным референсным значением доля циклов с переносом отличного эмбриона составила 87,5%, в подгруппе с отрицательным референсным значением — 78,95% ($p = 0,44$).

Таким образом, частота наступления клинической беременности при использовании ЭКО не различалась

Таблица 1. Исходы переноса эмбрионов у пациенток основной группы и группы контроля

		Основная группа		Контрольная группа		χ^2	p
		Абс.	%	Абс.	%		
Беременность	Нет	34	35,8%	45	39,8%	0,2	0,65
	Да	61	64,2%	68	60,2%		
Исходы	Нет беременности	34	35,8%	45	39,8%	3,7	0,443
	Ранние потери	11	11,6%	18	15,9%		
	Поздние потери			2	1,8%		
	Преждевременные роды	1	1,1%	1	0,9%		
	Срочные роды	49	51,6%	47	41,6%		
Роды	Нет	45	47,4%	65	57,5%	1,7	0,186
	Да	50	52,6%	48	42,5%		

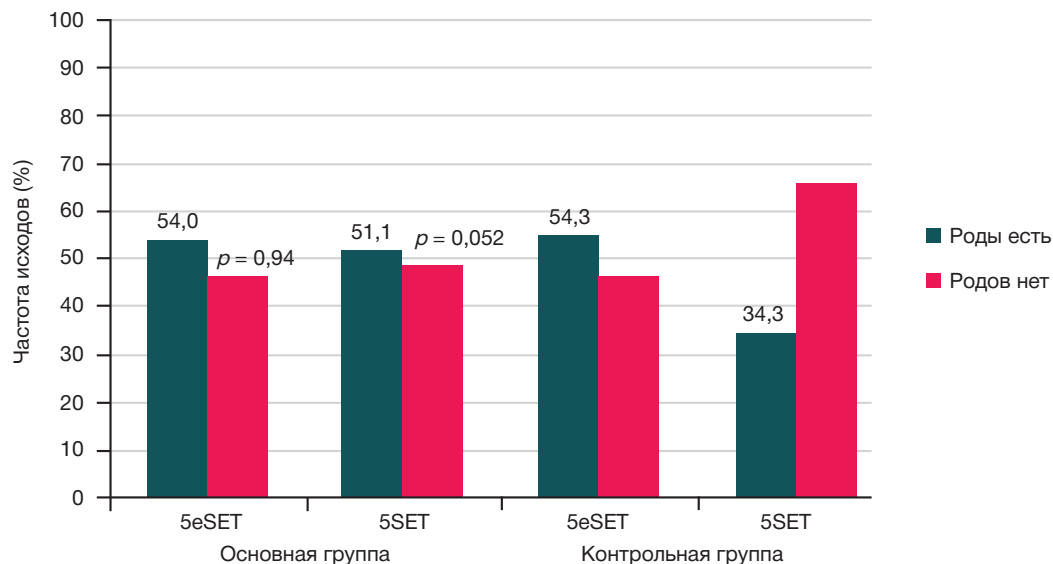


Рис. 2. Частота родов в зависимости от вида переноса эмбриона

между двумя группами и составила 64,2% в основной группе и 60,2% в группе контроля ($p = 0,65$) (табл. 1).

Среди всех исходов переноса эмбрионов доля наступивших родов составила 52,6% в основной группе и 42,5% в группе контроля ($p > 0,05$). Число всех случаев ранней потери беременности (биохимические беременности и потери в сроке до 12 недель гестации) в основной группе составило 11,6%, в группе контроля 17,7%, хотя разница была статистически незначимой.

Мы не получили статистически значимых различий в группе исследования между подгруппой пациенток с положительным референсным значением перенесенных эмбрионов и подгруппой пациенток с отрицательным референсным значением перенесенных эмбрионов в частоте клинической беременности (66,7 и 60,5% соответственно) и по частоте наступивших родов (50 и 52,6% соответственно).

Так как по данным литературы elective перенос эмбриона повышает вероятность благоприятного исхода переноса [21], был проведен сравнительный анализ частоты наступивших родов в зависимости от вида переноса.

Так, в основной группе частота родов составила 54% при elective переносе эмбриона (подгруппа 5eSET) и 51,1% — при неelective переносе (подгруппа 5SET) ($p = 0,940$) (рис. 2). В группе контроля вид переноса существенно влиял на частоту родов: в подгруппе переноса 5eSET частота родов составила 54,3%, а в подгруппе переноса 5SET — только 34,3% ($p = 0,052$ при оценке точным методом Фишера). Разница в частоте родов составила 20,1% (95% ДИ — 1,5–37%) при ОШ 2,28 (95% ДИ — 1,06–4,91). Таким образом, у женщин при использовании TLM независимо от вида переноса процент наступления родов был высоким 54,0% и 51,1% и статистически не различался.

С учетом полученных выше данных нами была проведена оценка связи благоприятного исхода цикла

ЭКО (наступление родов) с двумя факторами: наличием или отсутствием TLM и с видом переноса эмбриона (elective или неelective) (табл. 2).

В группе комбинации двух признаков (вид переноса 5eSET в обеих группах и вид переноса 5SET в основной группе) частота наступления родов достигала 53,2%, в то время как в группе контроля с видом переноса 5SET этот показатель был ниже и составил 34,3% ($p = 0,01$) (ОШ = 2,17 (1,19–3,97)). Таким образом, можно предположить, что есть положительная тенденция к повышению частоты наступления родов при использовании TLM независимо от вида переноса эмбриона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Технология использования TLM минимизирует контакт эмбриона с внешней средой, что может быть одним из факторов, обуславливающих более высокий имплантационный потенциал эмбриона. Непрерывный мониторинг с короткими промежутками времени дает больше информации о кинетике и морфологии эмбрионов по сравнению со стандартной ежедневной оценкой. Текущие публикации содержат противоречивые данные о влиянии TLM на результаты программы ЭКО.

В рамках нашего исследования получены данные о переносе blastocyst более высокого качества в группе TLM, что совпадает с данными ряда авторов [22, 23]. Так, у пациенток с хорошим овариальным резервом доля blastocyst хорошего качества и число криоконсервированных эмбрионов на пациентку были существенно ниже в группе контроля, по сравнению с группой TLM (50,7% и $1,72 \pm 1,55$ против 60,1% и $2,64 \pm 2,59$ соответственно; $p < 0,05$); хотя не было получено статистически значимых различий в числе эмбрионов хорошего качества на третьи сутки, частоте случаев наступления клинической беременности и частоте случаев

Таблица 2. Частота наступления родов в зависимости от использования TLM и вида переноса эмбриона

Роды	Вид переноса				χ^2	p
	5eSET в обеих группах + 5SET в основной группе		5SET в группе контроля			
	Абс.	%	Абс.	%		
Нет	66	46,8%	44	65,7%	5,75	0,01
Да	75	53,2%	23	34,3%		

имплантации [23]. Поскольку в нашем исследовании пациентки по клиническим характеристикам (возрасту, факторам бесплодия, продолжительности бесплодия) не различались между двумя группами, можно предположить, что различие в доле эмбрионов отличного и хорошего качества связано с отсутствием влияния в группе TLM факторов внешней среды (температуры, света, изменения pH).

Эффективность TLM может быть обусловлена двумя факторами: стабильными условиями культивирования эмбрионов (для оценки качества эмбриона нет необходимости извлекать эмбрион из инкубатора) и возможностью выбора эмбриона на перенос с помощью программного обеспечения [24].

По результатам недавно проведенного обзора Cochrane (2995 супружеских пар), отсутствуют убедительные доказательства преимущества TLM по сравнению с традиционным культивированием — не было обнаружено достоверных различий в частоте случаев наступления клинической беременности (ОШ 0,95; 95% ДИ — 0,78–1,16) и частоте родов (ОШ 1,12; 95% ДИ — 0,92–1,36) [25]. В метаанализе ведения 1637 пациенток, напротив, показано преимущество использования TLM по сравнению со стандартной инкубацией и оценкой качества эмбрионов [26]. В этом исследовании сообщается о высокой частоте наступления клинической беременности (51,0 против 39,9%; ОШ 1,54, 95% ДИ — 1,21–1,97), более низкой частоте ранней потери беременности (15,3 против 21,3%; ОШ 0,66, 95% ДИ — 0,47–0,94) и высокой частоте случаев живорождения (44,2 против 31,3%; ОШ 1,67, 95% ДИ — 1,13–2,46).

Мы получили высокую частоту наступления клинической беременности в обеих группах (64,2% в группе исследования и 60,2% в контрольной группе), что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния на культуру эмбрионов использования системы непрерывного мониторинга. Применение покадровой микроскопии вело к снижению числа случаев ранней потери беременности.

Нельзя исключить, что отсутствие различий между двумя группами по частоте наступления клинической беременности, частоте наступления родов и случаев ранней потери беременности в нашем исследовании может быть связано с небольшим с точки зрения статистики числом наблюдений (95 пациенток) с помощью TLM.

В одном из ретроспективных когортных исследований было показано увеличение частоты случаев наступления клинической беременности в группе TLM (+15,7% на перенос эмбриона) [27]. Но в отличие от нашей работы, это исследование было гетерогенным по составу пациентов (включало циклы с донорскими ооцитами), количеству переносимых эмбрионов (от 1 до 3 эмбрионов), по суткам переноса — в большинстве случаев в группе TLM проводили перенос на третьи сутки культивирования, что снижало итоговый показатель частоты наступления клинической беременности. Так, в указанной работе в группе TLM показатель наступления клинической беременности на пункцию фолликулов (получение ооцитов) при переносе эмбриона на пятые сутки культивирования составил 50%, в то время как в нашем исследовании показатель наступления клинической беременности в расчете на перенос эмбриона на пятые сутки культивирования достигал 64,2%. Из

достоинств этой работы можно отметить разработанную авторами прогностическую (математическую) модель, согласно которой в клинике ВРТ после использования TLM можно ожидать увеличения числа случаев наступления клинической беременности на 15,7% в расчете на перенос эмбриона. При этом улучшения результатов лечения чаще всего можно достигнуть увеличением числа циклов ЭКО с использованием TLM до 200 раз и выше.

Как многие технологические достижения, применение TLM может не дать быстрого эффекта во всех лабораториях, и для успешного внедрения, вероятно, потребуется некоторая стандартизация. Действительно, TLM не всегда имеет преимущество при отборе эмбрионов в клинических исследованиях [22]. Однако нельзя не упомянуть о ее возрастающей ценности для проведения непрерывного культивирования и помощи в выборе времени процедуры биопсии эмбриона [28, 29].

В настоящее время ведутся работы по внедрению искусственного интеллекта в TLM для определения комбинаций параметров, способных указать на максимальный потенциал эмбриона к имплантации и живорождению [24].

ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании не выявлено различий в частоте наступления клинической беременности, частоте достижения родов и частоте случаев ранней потери беременности между группой TLM и группой традиционного культивирования эмбрионов, что может быть связано с небольшим числом наблюдений в группе TLM. При использовании TLM выявлена высокая частота наступления родов вне зависимости от elective и неelective переноса эмбриона, однако отсутствовали различия в частоте случаев наступления клинической беременности и ранней потери беременности. При использовании традиционного способа культивирования и выбора эмбриона для переноса вид переноса существенно влиял на частоту случаев достижения родов: в подгруппе elective переноса показатель родов был выше, по сравнению с подгруппой неelective переноса ($p = 0,052$ при оценке точным методом Фишера). Проведение elective переноса эмбриона на пятые сутки культивирования (5eSET) или использование TLM вне зависимости от вида переноса было благоприятным фактором и повышало шанс на роды ($p = 0,01$).

Представленные данные открывают перспективы изучения преимущества использования TLM у пациенток разных возрастных групп, у пациенток со сниженным овариальным резервом. Дальнейшее накопление фактического материала необходимо для анализа таких показателей, как кумулятивный показатель беременности в циклах ВРТ с использованием системы видеонаблюдения, а также для мониторинга отдаленных результатов использования этой технологии. Нет сомнений, что скоро будут созданы сложные системы для неинвазивной оценки качества эмбрионов (морфологии, динамики и метаболизма), позволяющие автоматизировать процесс выбора эмбриона для переноса. Они снизят вероятность воздействия факторов человека и окружающей среды и, как следствие, увеличат рождаемость при переносе эмбрионов.

Литература

1. Калинкина О. Б., Спиридонова Н. В., Юнусова Ю. Р., Аравина О. Р. Многофакторный анализ риска развития акушерских и перинатальных осложнений у пациенток с ожирением и избыточной массой тела. Известия Самарского научного центра РАН. 2015; 17 (5–3): 793–7.
2. Anderson P, Doyle LW. Victorian Infant Collaborative Study Group. Neurobehavioral outcomes of school-age children born extremely low birth weight or very preterm in the 1990s. *J Am Med Assoc.* 2003; 289: 3264–72.
3. Ombelet W, De Sutter P, Van der Elst J, Martens G. Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction-the Belgian project. *Hum Reprod Update.* 2005; 11: 3–14.
4. De Sutter P, Van der Elst J, Coetsier T, Dhont M. Single embryo transfer and multiple pregnancy rate reduction in IVF/ICSI: a 5-year appraisal. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 464–9.
5. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2392–402.
6. Bergh C. Single embryo transfer: a mini-review. *Hum Reprod.* 2005; 20: 323–7.
7. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 2015; 21: 727–47.
8. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995; 1: 91–148.
9. Meseguer M. Time-lapse: the remaining questions to be answered. *Fertil Steril.* 2016; 105 (2): 295–6.
10. Pribenszky C, Matyasb S, Kovacs P, Losoncz E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online.* 2010; 21 (4): 533–6.
11. Wang SX. The past, present, and future of embryo selection in in vitro fertilization: Frontiers in Reproduction Conference. *Yale J Biol Med.* 2011; 84 (4): 487–90.
12. McEvoy K, Brison D, Roberts S, Turner C, Adeniyi T, Wood L, et al. A one year retrospective analysis comparing live birth outcomes from embryos grown and transferred from an undisturbed time-lapse culture system with a conventional culture system. *Human reproduction.* 2016; 31: i174–i175.
13. Шурыгина О. В., Сараева Н. В., Турушев М. Т., Пекарев В. А., Байзарова А. А., Краснова О. В., и др. Отдаленные результаты программ ВРТ с использованием системы непрерывного видеонаблюдения на эмбриологическом этапе. В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня и завтра. Материалы XXVII международной конференции Российской ассоциации репродукции человека; 6–9 сентября 2017 г.; М.: Медиа Сфера, 2017; 328 с.
14. Adamson GD, Abusief ME, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril.* 2015; 105: 369–75.
15. Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lamb-Steinmiller JC, et al. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 61–68.
16. Ver Milyea MD, Tan Lei, Joshua TA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online.* 2014; 29 (6): 729–36.
17. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29 (6): 565–72.
18. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod.* 2016; 31 (10): 2245–54.
19. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999 Jun; 11 (3): 307–11.
20. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000; 73: 1155–8.
21. Lee AM, Connell MT, Csokmay JM, Styer AK. Elective single embryo transfer — the power of one. *Contracept Reprod Med.* 2016; 1: 11.
22. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2016; 105 (2): 275–85.
23. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20: 510–15.
24. Apter S, Ebner T, Freour T, Guns Y, Kovacic B, Le Clef N, et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open.* 2020; 2020 (2): hoaa008. Available from: <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>.
25. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018; 25 (5): CD011320. DOI: 10.1002/14651858.CD011320.pub4.
26. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2017 Nov; 35 (5): 511–520.
27. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012 Dec; 98 (6): 1481–9.
28. Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril.* 2014; 101 (6): 1637–48.
29. Liu Yanhe, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril.* 2016; 105 (3): 656–62.

References

1. Kalinkina OB, Spiridonova NV, Yunusova JuR, Aravina OR. Mnogofaktornyj analiz riska razvitiya akusherskih i perinatal'nyh oslozhenij u pacientok s ozhireniem i izbytochnoj massoj tela. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN.* 2015; 17 (5–3): 793–7.
2. Anderson P, Doyle LW. Victorian Infant Collaborative Study Group. Neurobehavioral outcomes of school-age children born extremely low birth weight or very preterm in the 1990s. *J Am Med Assoc.* 2003; 289: 3264–72.
3. Ombelet W, De Sutter P, Van der Elst J, Martens G. Multiple gestation and infertility treatment: registration, reflection and reaction-the Belgian project. *Hum Reprod Update.* 2005; 11: 3–14.
4. De Sutter P, Van der Elst J, Coetsier T, Dhont M. Single embryo transfer and multiple pregnancy rate reduction in IVF/ICSI: a 5-year appraisal. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 464–9.
5. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2004;

- 351: 2392–402.
6. Bergh C. Single embryo transfer: a mini-review. *Hum Reprod.* 2005; 20: 323–7.
7. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 2015; 21: 727–47.
8. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995; 1: 91–148.
9. Meseguer M. Time-lapse: the remaining questions to be answered. *Fertil Steril.* 2016; 105 (2): 295–6.
10. Pribenszky C, Matyasb S, Kovacs P, Losonczic E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online.* 2010; 21 (4): 533–6.
11. Wang SX. The past, present, and future of embryo selection in vitro fertilization: *Frontiers in Reproduction Conference.* *Yale J Biol Med.* 2011; 84 (4): 487–90.
12. McEvoy K, Brison D, Roberts S, Turner C, Adeniyi T, Wood L, et al. A one year retrospective analysis comparing live birth outcomes from embryos grown and transferred from an undisturbed time-lapse culture system with a conventional culture system. *Human reproduction.* 2016; 31: i174–i175.
13. Shurygina OV, Saraeva NV, Tugushev MT, Pekarev VA, Bajzarova AA, Krasnova OV, et al. Otdalennye rezultaty programm VRT s ispolzovaniem sistemy nepreryvnogo videonabljudeniya na jembiologicheskome jetape. V sbornike: Reprodukivnye tehnologii segodnja i zavtra. Materialy XXVII mezhdunarodnoj konferencii Rossijskoj Associacii Reprodukci Cheloveka; 6–9 sentjabrja 2017 g. M.: Media Sfera, 2017; 328 s.
14. Adamson GD, Abusief ME, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril.* 2015; 105: 369–75.
15. Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lambesteinmiller JC, et al. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 61–68.
16. Ver Milyea MD, Tan Lei, Joshua TA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online.* 2014; 29 (6): 729–36.
17. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29 (6): 565–72.
18. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod.* 2016; 31 (10): 2245–54.
19. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999 Jun; 11 (3): 307–11.
20. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000; 73: 1155–8.
21. Lee AM, Connell MT, Csokmay JM, Styer AK. Elective single embryo transfer — the power of one. *Contracept Reprod Med.* 2016; 1: 11.
22. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2016; 105 (2): 275–85.
23. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20: 510–15.
24. Apter S, Ebner T, Freour T, Guns Y, Kovacic B, Le Clef N, et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open.* 2020; 2020 (2): hoaa008. Available from: <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>.
25. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018; 25 (5): CD011320. DOI: 10.1002/14651858.CD011320.pub4.
26. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2017 Nov; 35 (5): 511–520.
27. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012 Dec; 98 (6): 1481–9.
28. Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril.* 2014; 101 (6): 1637–48.
29. Liu Yanhe, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril.* 2016; 105 (3): 656–62.

ПОГРАНИЧНЫЕ ОПУХОЛИ ЯИЧНИКОВ У БЕРЕМЕННЫХ

А. А. Герасимова¹, М. В. Шамаракова¹, П. А. Клименко²✉¹ Центр планирования семьи и репродукции, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Пограничные опухоли яичников характерны для женщин репродуктивного периода, более чем у трети больных опухоли выявляют в возрасте 15–29 лет, средний возраст при первичной постановке диагноза составляет 40 лет. Целью исследования было усовершенствовать методы диагностики пограничных опухолей яичников на фоне беременности и определить возможности выполнения органосохраняющего лечения. Обследовано 300 беременных с различными опухолевидными образованиями (ООЯ) и опухолями яичников (ОЯ), из которых 25 имели пограничные эпителиальные опухоли: 22 — серозные, три — муцинозные. До операции проводили УЗИ, определяли концентрацию в сыворотке крови СА-125, sFas, VEGF и IL6. Полученные результаты сопоставляли с морфологическими исследованиями. Проводили органосохраняющее и радикальное хирургическое лечение, при необходимости — химиотерапию. При перекрестном сравнении изучали перинатальные исходы. Обнаружено, что различить доброкачественные опухоли яичников от пограничных (ПОЯ) и злокачественных (ЗОЯ) возможно с помощью УЗИ и логгистических моделей. Уровни VEGF выше 500 пг/мл, IL6 выше 8,1 пг/мл и СА-125 выше 300 ЕД/мл свидетельствуют о высокой вероятности ЗОЯ у беременных. И только морфологическое исследование тканей яичников, полученных независимо от хирургических способов, давало истинное представление о характере опухоли яичников у беременных. Вместе с тем у трех беременных с ОЯ при морфологическом исследовании выявлены участки ткани, характерные как для ПОЯ, так и для ЗОЯ. Таким образом, преобладание начальных форм опухолевого процесса, относительно благоприятное течение и прогноз при ПОЯ позволяют достаточно широко использовать хирургическое лечение щадящего характера с сохранением менструальной функции и фертильности.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, морфологическое исследование, опухоли яичников у беременных, CD31

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

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 176 от 25 июня 2018 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Петр Афанасьевич Клименко
Севастопольский проспект, д. 24а, г. Москва, 117209; pa.klimenko@mail.ru

Статья получена: 07.04.2020 **Статья принята к печати:** 21.04.2020 **Опубликована онлайн:** 26.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.023

BORDERLINE OVARIAN TUMORS IN PREGNANCY

Gerasimova AA¹, Shamarakova MV¹, Klimenko PA²✉¹ Center of Family Planning of Moscow Department of Health, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Borderline ovarian tumors (BOTs) are common in women in their reproductive years. In more than one-third of patients tumors are detected at the age of 15–29, the average age at initial diagnosis is 40. The study was aimed to improve methods for BOTs diagnosis in pregnancy and to determine the possibilities of organ preservation treatment. A group of 300 pregnant women with various tumor-like formations and ovarian tumors was examined. Of them, 25 patients had borderline epithelial tumors (22 patients had serous and 3 patients had mucinous tumors). Ultrasound examination together with blood serum CA-125, sFas, VEGF and IL6 level assessment were performed prior to surgery. The results obtained were compared with the results of morphological studies. Organ preservation and radical surgical treatment were carried out, and chemotherapy, if necessary. Perinatal outcomes were studied when performing the cross-comparison. It was discovered, that ultrasonography and logistic regression analysis made it possible to distinguish between benign ovarian tumors, BOTs and malignant ovarian tumors. The levels of VEGF above the 500 pg/ml, IL6 above the 8.1 pg/ml and CA-125 above the 300 U/ml indicated the high probability of malignant ovarian tumors in pregnant women. Only the morphological study of ovarian tissue, obtained regardless of surgical methods, ensured understanding of the ovarian tumor's true nature during pregnancy. At the same time, in three pregnant women with ovarian tumors, the morphological examination revealed some tissue areas common both for BOTs and malignant ovarian tumors. Thus, the predominance of the tumor early stages, relatively mild course and, favorable prognosis in patients with BOTs make it possible to use gentle surgical treatment making it possible to preserve menstrual function and fertility.

Keywords: ultrasound, morphological examination, ovarian tumors in pregnant women, CD31

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

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 176 dates June 25, 2018). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Piotr A. Klimenko
Sevastopolsky prospect, 24a, Moscow, 117209; pa.klimenko@mail.ru

Received: 07.04.2020 **Accepted:** 21.04.2020 **Published online:** 26.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.023

Пограничные эпителиальные опухоли (ПОЯ) представляют собой овариальные новообразования с наличием клеточной и ядерной атипии без деструктивной стромальной инвазии и имеют благоприятный прогноз. Среди всех неоплазий яичников ПОЯ составляют 15–20% [1–3]. Однако при анализе данных специализированных онкологических клиник выявлена большая частота — 21–35% в связи с

профильным отбором больных [4–8]. У беременных частота злокачественных образований яичников (ЗОЯ) вместе с ПОЯ не превышает 9%. Из-за отсутствия патогномичных симптомов, достоверных признаков эхографии и результатов определения маркерного гликопротеина СА-125 клиническая диагностика ПОЯ затруднена, и зачастую возникают сложности с дифференцированием их от

доброкачественных и злокачественных видов неоплазий яичников. Поэтому диагноз пограничной опухоли может быть достоверно установлен только по итогам послеоперационного морфологического исследования [9–10]. Более чем у 70% беременных опухоли выявляют при проведении ультразвукового исследования (УЗИ) на ранних сроках гестации и они соответствуют начальным стадиям по классификации FIGO. Хирургическое лечение ЗОЯ и ПОЯ у беременных выполняют, как правило, в первом и втором триместрах беременности [5, 11–12], что ведет к росту перинатальной заболеваемости и ранней детской смертности.

Целью исследования было усовершенствовать методы диагностики ПОЯ на фоне беременности и определить возможности выполнения органосохраняющего лечения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

За период с 2000 по 2017 г. были проспективно обследованы 300 беременных с различными опухолевидными образованиями (ООЯ) и опухолями яичников (ОЯ). Критерии включения пациенток в исследование: беременные с ООЯ/ОЯ в I–III триместрах. Критерии исключения: отказ беременной от участия в исследовании; беременные с установленным до начала исследования онкологическим заболеванием; пациентки с угрозой прерывания беременности, внутриутробным инфицированием, пренатальными повреждениями плода, установленными до проведения исследования. Результаты исследования оценивали при перекрестном анализе. Распределение их в зависимости от морфологической структуры, стадии опухолевого процесса и степени дифференцировки представлено на рис. 1.

У 76 из 300 беременных с новообразованиями яичников были выявлены пограничные (ПОЯ) и злокачественные (ЗОЯ) опухоли. Среди 25 ПОЯ серозная форма зарегистрирована в 22 наблюдениях, муцинозная в трех. Следует отметить, что исследование проводили длительное время и набор пациентов носил случайный, не популяционный характер.

УЗИ проводили на аппарате Voluson 530 MT (Kretztechnik; Австрия) и Voluson E8 (General Electric;

США) с использованием датчиков: RIC5-9-D (4–9 МГц), C1-5-D (2–5 МГц), RAB4-8-D (2–8 МГц). Комплексное УЗИ выполняли в режиме 2D и 3D в комбинации с использованием доплерографических методик в режиме цветового и энергетического картирования (ЦДК и ЭДК), а также трехмерной ангиографии. При ЦДК исследовали ряд параметров: характер сосудистого рисунка (по периферии, в центральной части опухоли, в перегородках, в папиллярных разрастаниях), анализ кривой скорости кровотока (КСК) с определением показателя сосудистого сопротивления — индекса резистентности (resistance index, RI) и максимальной систолической скорости кровотока (МСС, см/с). Из 30 сонографических признаков ООЯ, доброкачественных образований (ДОЯ), ПОЯ и ЗОЯ информативными оказались 17. Для УЗ-диагностики использовали предложенную нами модель, разделяющую ДОЯ от ПОЯ и ЗОЯ [13]. В предыдущих наших исследованиях [14] было показано, что опухоли яичников у беременных имеют УЗ-признаки, с помощью которых их можно с довольно высокой точностью дифференцировать на ДОЯ и ЗОЯ. В ходе исследования было обнаружено, что УЗ-особенности различных ОЯ имеют статистически значимые различия. При изучении эхографических признаков злокачественных эпителиальных опухолей яичников (рака яичников, или РЯ) выделено четыре типа строения, и что самое важное — своеобразие гемодинамических показателей. Одновременно была создана экспертная шкала на основании анализа УЗ-показателей. Для оценки точности модели помимо собственно процента верных отнесений учитывали параметры чувствительности (Se) и специфичности (Sp).

Молекулярно-биологические исследования проводили по следующей схеме. Концентрацию СА-125 определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы (Siemens; Германия). В сыворотке крови концентрацию sFas измеряли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител, а концентрацию VEGF — иммуноферментным методом при использовании наборов реактивов («R&D»; США). Определение концентрации IL6 производили иммуноферментным методом ELISA «сэндвичевого» типа с использованием наборов реактивов («R&D»; США).



Рис. 1. Распределение ОЯ/ООЯ в зависимости от гистологической структуры, стадий опухолевого процесса (ПОЯ/ЗОЯ) и степени дифференцировки (РЯ)

Гистологические препараты, окрашенные гематоксилин-эозином, оценивали разные патологи. При постановке морфологического диагноза использовали классификацию опухолей женской репродуктивной системы ВОЗ 2003 г., поскольку именно она была принята на территории РФ во время проведения исследования. Для иммуногистохимического исследования были отобраны парафиновые блоки у 15 беременных с ПОЯ и у 10 — с ЗОЯ. Ангиогенез анализировали с помощью антител к фактору роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) — главному сигнальному белку ангиогенеза (VENTANA; США) и эндотелиальному маркеру CD31 — молекуле межклеточной адгезии тромбоцитов и эндотелия типа 1 (клон JC70; VENTANA, США). При оценке экспрессии CD31 сначала при малом увеличении микроскопа были отобраны участки с наибольшим числом микрососудов. В дальнейшем в двух отдельных полях зрения с повышенной микрососудистой площадью при 200-кратном увеличении микроскопа подсчитывали число всех позитивных микрососудов. Уровень экспрессии VEGF оценивали полуколичественным методом в пяти полях зрения при 400-кратном увеличении микроскопа, включающим сопоставление интенсивности окрашивания и числа позитивных клеток. При измерении интенсивности окрашивания неокрашенные клетки соответствовали 0 баллам, клетки со слабожелтым окрашиванием — 1 баллу, клетки с желто-коричневым окрашиванием — 2 баллам, клетки с коричневым окрашиванием — 3 баллам. Число позитивно окрашенных клеток варьировало: 0 баллов — менее 10% всех клеток, 1 балл — 10–49% окрашенных клеток, 2 балла — 50–74% окрашенных клеток, 3 балла — более 75% окрашенных клеток. Результаты обоих подсчетов складывали, значение более 2 баллов считали положительным.

Помимо этого, были изучены истории болезни и исходы беременности и родов у 300 пациенток с новообразованиями яичников после проведенного лечения.

Для статистической обработки данных применяли прикладной пакет программ SPSS 15.0 (IBM; США). Данные подвергали частотному анализу путем построения кросс-таблиц. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что клинические характеристики обследованных беременных существенно не различались по группам. Так, возраст у 76 беременных с ПОЯ и ЗОЯ варьировал в широком диапазоне, от 18 до 45 лет. Более чем в 60% наблюдений он составлял 30 лет. У беременных с ПОЯ/ЗОЯ были отмечены боли внизу живота и нарушение функций соседних органов — в 9% случаев, увеличение объема живота — в 10,9%, в анамнезе были выявлены нарушение менструального цикла в 10,9% и бесплодие — в 2,7%. Структура сопутствующих экстрагенитальной, гинекологической патологий и перенесенные гинекологические операции до настоящей беременности у пациенток с ООЯ/ОЯ в большей степени коррелировали с возрастом и не зависели от морфологической структуры опухолей.

Среди гистологических форм ПОЯ преобладали серозные — у 22 (88%) пациенток, муцинозные типы встречались у 3 (12%) беременных. Билатеральное поражение яичников было установлено в 28% наблюдений. Большинство ПОЯ на фоне беременности диагностированы в I стадии опухолевого процесса — у 19 (76%) пациенток, II стадия выявлена у 5 (20%) больных и только в одном наблюдении верифицирована III стадия.

УЗ-признаки у беременных с пограничными опухолями яичников соответствовали нескольким вариантам строения: в 32,6% наблюдений констатирован смешанный тип строения опухоли с преобладанием солидного компонента, примерно у 55% больных отмечалось преобладание кистозного компонента, к солидным опухолям отнесены более 10%. При доплерографии

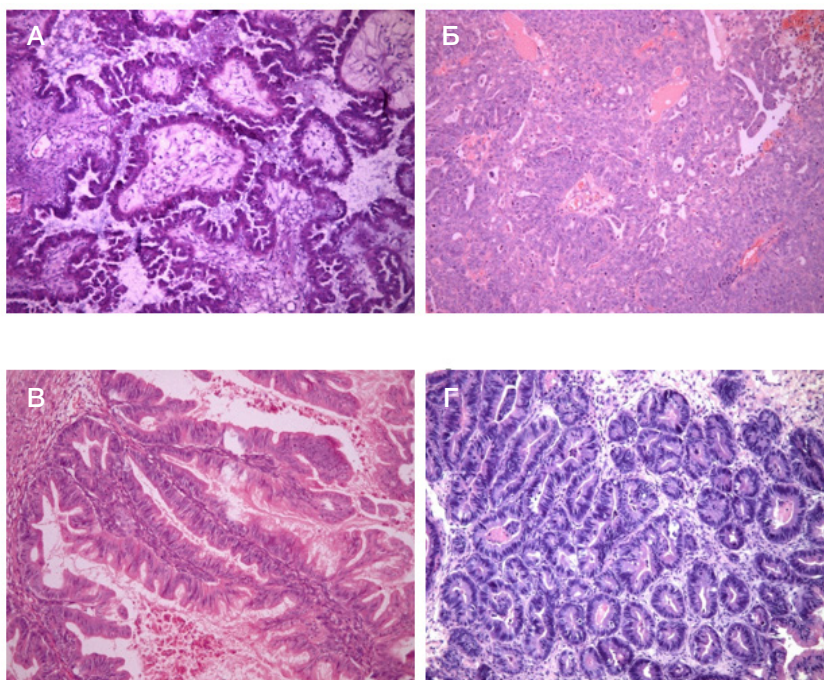


Рис. 2. Морфологическая картина ПОЯ и ЗОЯ яичников у беременных. **А.** Серозная пограничная цистаденома яичника (×10, окраска гематоксилин-эозином). **Б.** Серозная низкодифференцированная карцинома яичника (×10, окраска гематоксилин-эозином). **В.** Муцинозная пограничная цистаденома яичника (×10, окраска гематоксилин-эозином). **Г.** Муцинозная карцинома яичника (×10, окраска гематоксилин-эозином)

была выявлена центральная и периферическая гиперваскуляризация с низкими значениями RI (меньше или равно 0,4) и высокими показателями МСС (более 15 см/с) при оценке КСК, с наличием мозаичного типа кровотока, свидетельствующего о присутствии артериовенозного шунтирования в сосудистой сети опухоли.

Использование предложенной нами модели для дифференциальной диагностики ОЯ у беременных позволило отличать ООЯ и ДОЯ от ПОЯ и ЗОЯ (чувствительность составила 100%, специфичность 92,3% при суммарной точности модели 92,8%). Из-за выраженной схожести изображения и гемодинамических показателей при проведении комплексной эхографии не удалось дифференцировать ПОЯ и ЗОЯ. Вместе с тем при этих неоплазиях во всех наблюдениях были выявлены центральное расположение сосудов с разветвленной сетью в перегородках, солидном компоненте, папиллярных разрастаниях и низкорезистентный кровоток.

При ПОЯ концентрация СА-125 в крови беременных варьировала от 24,4 до 361 ЕД/мл в I триместре и от 24,1 до 223 ЕД/мл — во II триместре беременности. Уровень sFas составлял 40–200 нг/мл в I триместре и 46–180 нг/мл во II триместре беременности. Концентрация VEGF колебалась от 89 до 286 пг/мл в I триместре и от 92 до 480 пг/мл — во II триместре беременности. IL6 достигали 3,6–12 пг/мл в I триместре и 8–40,9 пг/мл во II триместре беременности.

При ЗОЯ было отмечено достоверное повышение по сравнению с ПОЯ в сыворотке крови как СА-125, так и других маркеров канцерогенеза — sFas, VEGF, IL6 в любые сроки беременности. В крови трех пациенток с аденокарциномой яичников СА-125 составили 540–1224,6 ЕД/мл, sFas — 180–312,6 нг/мл, VEGF — 510–1028 пг/мл, IL6 — 9,8–40,9 пг/мл. Аналогичную концентрацию молекулярно-биологических факторов наблюдали в крови пациенток с дисгерминомой, смешанной герминогенной опухолью и незрелой тератомой. В этих наблюдениях уровень СА-125 превышал 361 ЕД/мл, sFas — 240 нг/мл, VEGF — 490 пг/мл, IL6 — 8,1 пг/мл.

При морфологическом исследовании ПОЯ (рис. 2) в 22 наблюдениях были зарегистрированы признаки, позволяющие дифференцировать их как от ДОЯ, так и от ЗОЯ. В трех наблюдениях были обнаружены несовпадения в интерпретации окончательного гистологического ответа у больных, которым был установлен диагноз серозной аденокарциномы на фоне серозной пограничной опухоли. При повторном пересмотре препаратов элементов злокачественной опухоли не было обнаружено.

Пограничная серозная цистаденома представляла собой кистозную опухоль с рыхлой стенкой и выраженными папиллярными разрастаниями, которые занимали всю внутреннюю поверхность и в 70% случаев определялись и на наружной поверхности. ПОЯ отличались эпителиальными разрастаниями с образованием клеточных пучков и отпочкованием групп клеток одновременно со строго упорядоченным ветвлением, при котором мелкие папиллы происходят от крупных, центрально расположенных сосочков. Клетки пограничных серозных опухолей имели особенности эпителиальной и мезотелиальной дифференцировки. Реснитчатые клетки были похожи на клетки маточной трубы и были выявлены в трети опухолей. Клетки с обильной эозинофильной цитоплазмой и округлыми ядрами имели сходство с мезотелием и располагались на верхушках папилл. Ядра клеток располагались базально, овальной или округлой формы, с легкой атипией, нежным хроматином и иногда

выраженными ядрышками. Выявлены редкие митозы (обычно 4 в 10 полях зрения). Псаммомные тельца обнаружены в половине наблюдений.

Серозные карциномы достигали больших размеров (до 20 см в диаметре), представляли собой кисты с серозным или сукровичным содержимым, заполненные мягкими рыхлыми папиллярными разрастаниями. Наружная поверхность была гладкая, изредка с папиллярными структурами. Опухоли солидного строения обычно имели менее выраженные папиллы, розово-серого цвета, были мягкими или плотными в зависимости от характера подлежащей стромы. Одновременно наблюдались кровоизлияния и некрозы. При микроскопическом исследовании серозные карциномы имели папиллярное с очагами солидного строения, увеличенные округлые клетки с полиморфными, гиперхромными ядрами, глыбчатым ядерным хроматином и увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением, псевдомногорядность эпителия, характеризовались потерей полярности, отсутствием ресничек на поверхности клеток, повышенной митотической активностью.

Пограничная муцинозная цистаденома яичника была, как правило, многокамерная, диаметром до 30 см, содержала соломенного цвета жидкость или слизь. Морфологическое изучение препаратов этих опухолей выявляло участки, выстланные многорядным муцинозным эпителием кишечного типа с образованием ворсинчато-железистых и папиллярных структур с легкой степенью атипии ядер клеток.

Муцинозная карцинома отличалась от пограничной муцинозной цистаденомы наличием очагов с комплексным расположением желез, выстланных клетками с умеренной и тяжелой атипией ядер, митозами, а также присутствием очагов некроза в опухоли.

Экспрессия CD31 (рис. 3–4) была выявлена в строме опухолей во всех случаях. Среднее число CD31 позитивных сосудов у женщин с ПОЯ составило 36 (от 12 до 48), у пациенток с ЗОЯ — 44 (от 19 до 56). Иммунореактивность в отношении маркера VEGF, оцененная полуколичественным методом, у женщин с ПОЯ соответствовала 5 баллам (от 4 до 6), у пациенток с ЗОЯ — 6 баллам (от 5 до 7). Достоверные различия при исследовании экспрессии обоих маркеров не были установлены.

Анализ историй болезни беременных с ПОЯ и ЗОЯ показал, что части из них при распространенном опухолевом процессе проведены полные циторедуктивные операции с прерыванием беременности. Другим пациенткам циторедуктивные операции проводили дважды: при обнаружении опухоли и после операции кесарева сечения.

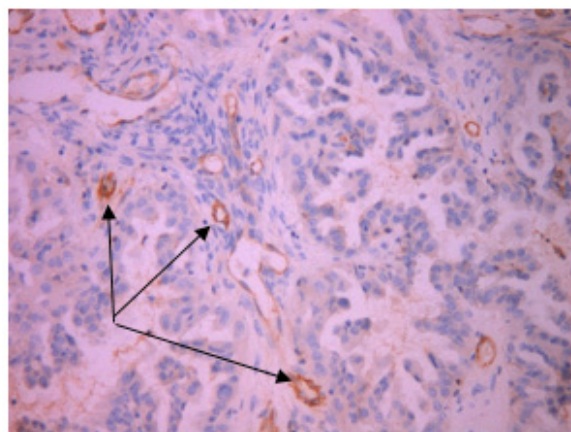


Рис. 3. Экспрессия CD31 в ЗОЯ (×20). Стрелками указаны сосуды

У всех пациенток с признаками озлокачествления опухолей яичников проводили срединную лапаротомию с обходом пупка слева. В шести наблюдениях была выполнена сначала диагностическая лапароскопия, а затем в связи с подозрением на РЯ — лапаротомия и удаление первичного очага.

Объем хирургического вмешательства определяли интраоперационно в соответствии с данными клинической картины заболевания, репродуктивного анамнеза и возрастом пациентки, результатами УЗИ, уровнями онкомаркеров в сыворотке крови и результатами срочного гистологического исследования. В ходе операций проводили хирургическое стадирование опухолевого процесса, ревизию органов брюшной полости и малого таза, резекцию/удаление большого сальника, множественные биопсии брюшины, взятие смывов или асцитической жидкости из брюшной полости. При муцинозном типе опухоли проводили аппендэктомию. У больных, не заинтересованных в сохранении беременности и фертильности, выполняли радикальные операции — в семи из 76 наблюдений. На первом этапе во время беременности 20 пациенткам с ПОЯ было выполнено органосохраняющее оперативное вмешательство с сохранением матки и части здорового яичника. В двух случаях проводили двухстороннюю аднексэктомию. В одном из них пограничная опухоль стала находкой после гистологического исследования резецированной части визуально неизмененного контрлатерального яичника (IV стадия).

Следует отметить, что при гистологическом исследовании биопсийного материала или препаратов опухоли могут возникать ошибки и неточности. Так, в наших наблюдениях у трех больных с ОЯ на фоне беременности при морфологическом исследовании зарегистрированы участки ткани, характерные как для ПОЯ, так и для ЗОЯ. Был установлен диагноз высокодифференцированной аденокарциномы обоих яичников на фоне серозной цистаденомы пограничного типа. У одной из них в сроки 11–12 недель беременности клинически определены двухсторонние опухоли яичников с признаками озлокачествления, асцит. В онкологическом стационаре после проведения диагностической лапароскопии, правосторонней аднексэктомии с экспресс-гистологическим исследованием было сделано заключение: пограничная цистаденома. Выполнена конверсия лапароскопического доступа на лапаротомический. Путем срединной лапаротомии были выполнены биопсия левого яичника, резекция большого сальника, множественные биопсии брюшины. Морфологически установлен диагноз высокодифференцированной аденокарциномы, развившейся на фоне серозной пограничной опухоли с раковыми эмболами в просвете сосудов большого сальника (рак яичников T3cN0M0). Выполнены искусственное прерывание беременности и радикальная операция: экстирпация матки с левыми придатками, субтотальная резекция большого сальника. При цитологическом исследовании смывов из брюшной полости выявлены элементы аденогенного рака. Перед назначением химиотерапии был проведен междисциплинарный онкологический консилиум в связи с расхождением в трактовке результатов цитологического и гистологического исследований разными специалистами. Первичный диагноз не был подтвержден. Установленный диагноз: пограничная опухоль яичников с неинвазивными имплантатами в большом сальнике. От проведения химиотерапии было

решено отказаться. Больная наблюдается четыре года без признаков прогрессирования заболевания.

Результаты лечения пациенток с пограничными опухолями были следующие: у трех беременных проведено прерывание беременности с проведением хирургического лечения в объеме пангистерэктомии из-за наличия аденокарциномы на фоне серозной ПОЯ, у двух беременных произошли выкидыши, 10 пациенток родили самостоятельно в срок, шесть беременных родоразрешены раньше срока путем операции кесарева сечения при появлении акушерских показаний, в четырех случаях повторные операции проведены с целью рестадирования.

У беременных с ПОЯ впоследствии возникли рецидивы опухоли в двух случаях. У одной при серозном гистотипе опухоли IA стадии в ткани резецированного яичника после органосохраняющей операции рецидив выявлен на пятом году наблюдения. При морфологическом исследовании была обнаружена высокодифференцированная аденокарцинома, после чего проведена радикальная операция, дополненная химиотерапией. Во втором наблюдении через 2 года после первой операции возник рецидив, идентичный по гистологической структуре первичной опухоли (атипически пролиферирующая опухоль серозного типа). После удаления рецидивного новообразования было проведено комбинированное лечение. Обе пациентки живы более 3 лет. Выбыли из-под наблюдения 5 пациенток. Отдаленные результаты лечения нами прослежены у 17 из 25 больных в течение 3–10 лет. Все наблюдаемые живы на момент проведения исследования. Общая пятилетняя выживаемость составила 100%.

У пациенток с ПОЯ через 2–5 лет после проведенного оперативного вмешательства наступило 9 беременностей, 4 из которых закончились родами с благоприятным исходом. В 3 наблюдениях беременности закончились самопроизвольным абортom.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы свидетельствуют об отсутствии специфических клинических проявлений ПОЯ при беременности. Комплексная сонография с использованием доплерометрических методик, включенных в модели для дифференциальной диагностики, имеет высокую специфичность.

В настоящее время не выделено молекулярно-биологических факторов, достоверно характеризующих ПОЯ [2, 15]. Применение большинства онкомаркеров ограничено из-за высокой вариабельности их показателей,

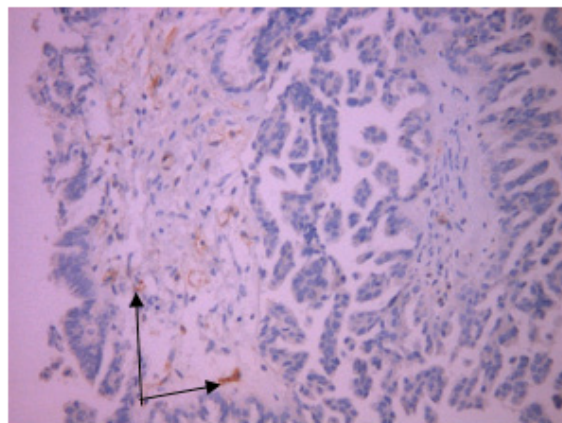


Рис. 4. Экспрессия CD31 в ПОЯ (×20). Стрелками указаны сосуды

в том числе и в зависимости от срока гестации. В проведенном исследовании значительное повышение уровней маркеров канцерогенеза выше пороговых (VEGF — выше 500 пг/мл, IL6 — 8,1 пг/мл) выявлено при наличии злокачественных неоплазий яичников у беременных. При этом специфичность теста составила 91,5%, чувствительность — 75%. Концентрация СА-125 при ЗОЯ у беременных превышала 300 ЕД/мл. Эти результаты согласуются с данными других авторов [16].

При оценке уровня экспрессии VEGF в парафиновых блоках полуколичественным методом повышенная иммунореактивность в отношении данного маркера, соответствующая 5–7 баллам, была зарегистрирована в карциномах яичников. Ассоциация экспрессии VEGF и овариального рака подтверждена многими работами. Доказано повышение иммунореактивности VEGF в карциноме яичника по сравнению с ПОЯ, при этом высокий уровень экспрессии VEGF свидетельствует о прогрессировании заболевания [17]. Повышенная иммунореактивность CD31 в препаратах ЗОЯ по сравнению с образцами ПОЯ указывает на усиленный кровоток в опухолевой ткани, обусловленный неоваскуляризацией, регистрируемой в злокачественных опухолях [18].

Основным методом лечения ПОЯ с органосохраняющим или радикальным подходом остается хирургический метод. В мировой литературе активно обсуждают вопрос о возможности ультраконсервативных вмешательств как органосохраняющего варианта с сохранением неизменной ткани яичника, пораженного ПОЯ, путем выполнения резекции/цистэктомии [2, 19]. Оптимальным объемом операции считается аднексэктомия на стороне поражения с морфологическим исследованием смывов с брюшины и ее множественных биоптатов; окончательное хирургическое стадирование следует проводить во время кесарева сечения или после родов, если родоразрешение проводили через естественные родовые пути [20, 21]. В нашем исследовании ультраконсервативные вмешательства не были выполнены, в 80% наблюдений у пациенток с ПОЯ применяли органосохраняющее хирургическое лечение. С целью рестадирования повторные операции были выполнены у 16% наблюдаемых.

Примерно у 1/3 больных необходимо проведение окончательного послеоперационного морфологического исследования на парафиновых блоках при ПОЯ и высокодифференцированной аденокарциноме [2, 22–24]. По некоторым данным, высокая частота гипердиагностики при наличии фокусов, подозрительных на рак яичников при ПОЯ, даже при проведении окончательного гистологического исследования в специализированных учреждениях, приводит к необоснованному завышению объемов хирургических вмешательств [3]. По нашим результатам, несовпадения в трактовке морфологического ответа при дифференциальной диагностике ПОЯ и РЯ обнаружены в 12% случаев. Разнообразное строение ПОЯ, необходимость тщательного исследования множественных

срезов обуславливают повышенные требования к квалификации и опыту морфолога, аналогичного мнения придерживаются и другие исследователи [3, 9, 22].

Общая частота рецидивов при ПОЯ варьирует от 3 до 10%, при распространенных стадиях рецидивы развиваются у 25% больных. В проведенном нами исследовании рецидивы были выявлены в 8% наблюдений. По результатам публикаций, пятилетняя выживаемость при I–II стадиях составляет около 98–99%, при III–IV стадиях — 82–90% [25, 26]. Возможно, столь высокие показатели пятилетней выживаемости в выполненном исследовании связаны с выявлением ПОЯ в начальных стадиях процесса и малым количеством исследуемых групп.

В работах по изучению фертильности после органосохраняющего лечения сообщается, что спонтанные беременности возникают в 40–72% наблюдений. Влияние беременности на течение заболевания не установлено [1, 2, 27, 28]. Следует отметить, что репродуктивными результатами, полученными в нашей работе, были зафиксированные беременности более чем у 35% пациенток после органосохраняющих оперативных вмешательств при выявлении ПОЯ на фоне беременности.

Полученные нами результаты позволили выделить в диагностическом алгоритме обследования беременных с подозрением на малигнизированные ОЯ совокупность таких признаков, как смешанное эхографическое строение с гиперваскулярным типом кровотока и низкими показателями индексов сосудистого сопротивления, значения VEGF, превышающие 500 пг/мл, и IL6 более 8,1 пг/мл, концентрация СА-125 выше 300 ЕД/мл, как наиболее важные. Однако схожесть УЗ-признаков ПОЯ и ЗОЯ не позволила однозначно дифференцировать данные типы неоплазий. Диагноз ПОЯ является прерогативой окончательного послеоперационного морфологического исследования. Результаты срочного гистологического анализа тканей яичников на замороженных срезах не во всех наблюдениях позволяют получить истинное представление о характере ОЯ у беременных. Высокие показатели общей пятилетней выживаемости после выполнения хирургического лечения ПОЯ в органосохраняющем объеме на фоне беременности в проведенном исследовании демонстрируют возможность реализации таких щадящих подходов при начальных стадиях.

ВЫВОДЫ

Несмотря на значительный научный и практический интерес к ПОЯ многие проблемы, касающиеся совершенствования диагностики и методов лечения больных во время беременности, далеки от своего решения. Преобладание начальных форм опухолевого процесса, относительно благоприятное течение и прогноз при ПОЯ позволяют достаточно широко использовать щадящий характер хирургического лечения с сохранением менструальной функции и фертильности.

Литература

1. Батталова Г. Ю. Пограничные опухоли яичников (оптимизация методов лечения и медико-социальной реабилитации больных) [диссертация]. М., 2005.
2. Новикова Е. Г., Андреева Ю. Ю., Шевчук А. С. Пограничные опухоли яичников. Онкология. 2013; (1): 84–91.
3. Давыдова И. Ю. Серозные пограничные опухоли яичников (клинико-морфологические особенности, лечение, прогноз) [диссертация]. М., 2018.
4. Giuntoli RL, Vang RS, Bristow RE. Evaluation and management of adnexal masses during pregnancy. Clin Obstet Gynecol. 2006; 49

- (3): 492–505.
- Бахидзе Е. В. Опухоли яичника у беременных. Журнал акушерства и женских болезней. 2011; 3: 190–6.
 - Morice P, Uzan C, Gouy S, Verschraegen C, Haie-Meder C. Gynecological cancers in pregnancy. *Lancet*. 2012; 379 (9815): 558–69.
 - Aggarwal P, Kehoe S. Ovarian tumors in pregnancy a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 155 (2): 119–24.
 - Gui T, Cao D, Shen K, Yang J, Fu C, Lang J, Liu X. Management and outcome of ovarian malignancy complicating pregnancy: an analysis of 41 cases and review of the literature. *Clin Transl Oncol*. 2013; 15 (7): 548–54.
 - Шлома Е. Н., Фридман М. В., Шелкович С. Е., Демидчик Ю. Е. Пограничные эпителиальные опухоли яичников: клиническое течение и проблемы морфологической диагностики. Минск: Изд-во «Бел МАПО», 2012; 80 с.
 - Давыдова И. Ю., Кузнецов В. В., Карселадзе А. И., Мещерякова Л. А. Пограничные опухоли яичников. Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2019; 7 (1): 92–104.
 - Nadereh B, Mojgan KZ, Mitra MG, Fatemeh G, Azamsadat M, Fahimeh G. Ovarian carcinoma with pregnancy: a clinicopathologic analysis of 23 cases and review of the literature. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2008; 8: 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266699/>.
 - Yong-Soon K, Jung-Eun M, Kyung-Taek L, In-Ho L, Tae-Jin K, Ki-Heon L, et al. Ovarian cancer during pregnancy clinical and pregnancy outcome. *Korean Med Sci*. 2010; 25 (2): 230–4.
 - Герасимова А. А., Гус А. И., Клименко П. А., авторы; Клименко Петр Афанасьевич, патентообладатель. Способ дифференциальной диагностики опухолевидных образований и опухолей яичников у беременных. Патент РФ № 2325118. 05.06.2007.
 - Герасимова А. А., Швырев С. Л., Соломатина А. А., Гус А. И., Клименко П. А. Способ выявления характера яичниковых образований. *Онкология*. 2013; 1: 34–40.
 - Tinelli R, Tinelli F, Cicenelli E, Malvasi A. Conservative surgery for borderline ovarian tumors: a review. *Gynecol Oncol*. 2006; 100 (1): 185–91.
 - Манухин И. Б., Высоцкий М. М., Кушлинский Н. Е. Молекулярно-биологические факторы в патогенезе и хирургическом лечении опухолей яичников. М.: Изд-во «Династия», 2007; 208 с.
 - Moghaddam SM, Amini A, Morris D, Pourgholami H. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31 (1–2): 143–62. DOI: 10.1007/s10555-011-9337-5.
 - Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017; 20 (4): 409–26. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.
 - Новикова Е. Г., Шевчук А. С. Органосохраняющее лечение больных с пограничными опухолями яичников. *Вопросы онкологии*. 2014; 60 (3): 267–73.
 - Fauvet R, Brzakowski M, Morice P, Resch B, Marret H, Graesslin O, et al. Borderline ovarian tumors diagnosed during pregnancy exhibit a high incidence of aggressive features: results of a French multicenter study. *Ann Oncol*. 2012; 23 (6): 1481–7.
 - Zagouri F, Dimitrakakis C, Marinopoulos S, Tsigginou A, Dimopoulos MA. Cancer in pregnancy: disentangling treatment modalities. *ESMO*. 2016; 1 (3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070264/>.
 - Шевчук А. С. Повторные лапароскопические операции у больных со злокачественными опухолями яичников [диссертация]. М., 2005.
 - Kim JH, Kim TJ, Park YG. Clinical analysis of intra — operative frozen section proven borderline tumors of the ovary. *J Gynecol Oncol*. 2009; 20 (3): 176–80.
 - Brun JL, Cortez A, Rouzier R. Factors influencing the use and accuracy of frozen section diagnosis of epithelial ovarian tumors. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199 (3): 241–7.
 - Du Bois A, Ewald-Riegler N, du Bois O, Harter P. Borderline tumors of the ovary — a systematic review. *Geburtsh Frauenheilk*. 2009; 69: 807–33.
 - Trope C, Davidson B, Paulsen T, Abeler VM, Kaern J. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms «the state of the art». *Eur J Gynecol Oncol*. 2009; 30 (5): 471–82.
 - Fauvet R, Poncelet C, Boccara J. Fertility after conservative treatment for borderline ovarian tumors a French multicenter study. *Fertil Steril*. 2005; 83: 284.
 - Tinelli F, Tinelli R, La Grotta F. Pregnancy outcome and recurrence after conservative laparoscopic surgery for borderline ovarian tumors. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007; 86: 81.

References

- Battalova G. Ju. Pogranichnye opuholi jaichnikov (optimizacija metodov lechenija i mediko-socialnoj rehabilitacii bolnyh) [dissertation]. M., 2005. Russian.
- Novikova EG, Andreeva YuYu, Shevchuk AS. Fertility sparing treatment for patients with bilateral borderline ovarian tumors. *Oncology*. 2013; (1): 84–91.
- Davydova IYu. Serous borderline ovarian tumors (clinical and morphological features, treatment, prognosis) [dissertation]. M., 2018. Russian.
- Giuntoli RL, Vang RS, Bristow RE. Evaluation and management of adnexal masses during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2006; 49 (3): 492–505.
- Bakhidze EV. Ovarian tumors in pregnancy. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2011; 3: 190–6.
- Morice P, Uzan C, Gouy S, Verschraegen C, Haie-Meder C. Gynecological cancers in pregnancy. *Lancet*. 2012; 379 (9815): 558–69.
- Aggarwal P, Kehoe S. Ovarian tumors in pregnancy a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 155 (2): 119–24.
- Gui T, Cao D, Shen K, Yang J, Fu C, Lang J, Liu X. Management and outcome of ovarian malignancy complicating pregnancy: an analysis of 41 cases and review of the literature. *Clin Transl Oncol*. 2013; 15 (7): 548–54.
- Shloma EN, Fridman MV, Shelkovich SE, Demidchik YuE. Borderline epithelial tumors of the ovaries: clinical course and problems of morphological diagnosis. Minsk: Publishing house "Bel MAPO", 2012; 80 s.
- Davydova IYu, Kuznetsov VV, Karseladze AI, Meshcheryakova LA. Borderline ovarian tumors. *Obstetrics and gynecology: news, opinions, training*. 2019; 7 (1): 92–104.
- Nadereh B, Mojgan KZ, Mitra MG, Fatemeh G, Azamsadat M, Fahimeh G. Ovarian carcinoma with pregnancy: a clinicopathologic analysis of 23 cases and review of the literature. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2008; 8: 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266699/>.
- Yong-Soon K, Jung-Eun M, Kyung-Taek L, In-Ho L, Tae-Jin K, Ki-Heon L, et al. Ovarian cancer during pregnancy clinical and pregnancy outcome. *Korean Med Sci*. 2010; 25 (2): 230–4.
- Gerasimova AA, Gus AI, Klimenko PA, inventor; Klimenko Petr Afanasevich, assignee. A method for the differential diagnosis of tumorous formations and tumors of the ovaries in pregnant women. Russian Federation patent RF 2325118. 2007 Jun 1. Russian.
- Gerasimova AA, Shvyrev S, Solomatina AA, Gus AI, Klimenko PA. Procedure for detecting the pattern of ovarian masses. *Oncology*. 2013; 1: 34–40.
- Tinelli R, Tinelli F, Cicenelli E, Malvasi A. Conservative surgery for borderline ovarian tumors: a review. *Gynecol Oncol*. 2006; 100 (1): 185–91.
- Manuhin IB, Vysockij MM, Kushlinskij NE. Molekularno-biologicheskie faktory v patogeneze i hirurgicheskom lechenii opuholej jaichnikov. M.: Izd-vo «Dinastija», 2007; 208 s. Russian.
- Moghaddam SM, Amini A, Morris D, Pourgholami H. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal

- dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31 (1–2): 143–62. DOI: 10.1007/s10555-011-9337-5.
18. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017; 20 (4): 409–26. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.
 19. Novikova EG, Shevchuk AS. Organ-preserving treatment of patients with borderline ovarian tumors. *Oncology issues.* 2014; 60 (3): 267–73.
 20. Fauvet R, Brzakowski M, Morice P, Resch B, Marret H, Graesslin O, et al. Borderline ovarian tumors diagnosed during pregnancy exhibit a high incidence of aggressive features: results of a French multicenter study. *Ann Oncol.* 2012; 23 (6): 1481–7.
 21. Zagouri F, Dimitrakakis C, Marinopoulos S, Tsigginou A, Dimopoulos MA. Cancer in pregnancy: disentangling treatment modalities. *ESMO.* 2016; 1 (3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070264/>
 22. Shevchuk AS. Repeated laparoscopic operations in patients with malignant ovarian tumors [dissertation]. M., 2005.
 23. Kim JH, Kim TJ, Park YG. Clinical analysis of intra — operative frozen section proven borderline tumors of the ovary. *J Gynecol Oncol.* 2009; 20 (3): 176–80.
 24. Brun JL, Cortez A, Rouzier R. Factors influencing the use and accuracy of frozen section diagnosis of epithelial ovarian tumors. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199 (3): 241–7.
 25. Du Bois A, Ewald-Riegler N, du Bois O, Harter P. Borderline tumors of the ovary — a systematic review. *Geburtsh Frauenheilk.* 2009; 69: 807–33.
 26. Trope C, Davidson B, Paulsen T, Abeler VM, Kaern J. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms «the state of the art». *Eur J Gynecol Oncol.* 2009; 30 (5): 471–82.
 27. Fauvet R, Poncelet C, Boccara J. Fertility after conservative treatment for borderline ovarian tumors a French multicenter study. *Fertil Steril.* 2005; 83: 284.
 28. Tinelli F, Tinelli R, La Grotta F. Pregnancy outcome and recurrence after conservative laparoscopic surgery for borderline ovarian tumors. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007; 86: 81.

УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ АСПЕКТЫ И СКРИНИНГ ОПУХОЛЕЙ И ОПУХОЛЕВИДНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЯИЧНИКОВ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Н. В. Спиридонова, А. А. Демуря ✉, В. О. Катюшина

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Опухоли яичников возникают в любом возрасте, снижают репродуктивный потенциал женщины, имеют высокий риск малигнизации и являются показанием для оперативного лечения. На сегодняшний день продолжается поиск оптимальных алгоритмов скрининга опухолей данной нозологии. Целью работы было оценить прогностическую эффективность ультразвуковых (УЗ) признаков для дифференциальной диагностики злокачественных, доброкачественных и пограничных опухолей яичников у женщин репродуктивного возраста. Обследованы 168 пациенток репродуктивного возраста с опухолевыми и опухолевидными образованиями яичника, прооперированных с 2012 по 2015 г., и сопоставлены морфологические данные верифицированного процесса в яичниках с данными комплексного УЗИ с импульсно-волновым доплеровским режимом. В исследовании не выявлено зависимости размеров и объема образований яичников от морфологической структуры опухоли. Обнаружены эхографические особенности опухолей яичников: наличие солидного компонента ($p < 0,001$); наличие перегородок ($p = 0,029$) и разрастаний по внутренней поверхности капсулы ($p < 0,001$); наличие умеренного и значительного количества свободной жидкости в малом тазу ($p = 0,007$) и бугристая поверхность капсулы образования яичника ($p = 0,008$). Наличие солидного образования увеличивало вероятность появления злокачественной и пограничной опухолей в 31,69 раза, кистозно-солидной структуры образования — в 3,46 раза. Выделены значимые доплерометрические показатели, способные четко обозначить разницу между доброкачественным и злокачественным процессами, а именно превышение скорости кровотока свыше 1,85 см/с ($p = 0,007$) и ИР более 0,16 ($p = 0,013$). Чувствительность и специфичность данной диагностической модели составляют 87% и 68% при значении пороговой вероятности 0,3.

Ключевые слова: опухоли яичников, риск малигнизации, скрининг опухолей, ультразвуковое исследование, эхоструктура опухолей яичников, доплерография, особенности кровотока

Благодарности: к. б. н., доценту Самарского университета М. В. Комаровой за помощь в статистической обработке результатов исследования.

Вклад авторов: Н. В. Спиридонова, А. А. Демуря, В. О. Катюшина — равнозначен на всех этапах работы и написания статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом СамГМУ (протокол № 194 от 12 сентября 2018 г.); все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Андреевна Демуря
пр. Масленникова, д. 25, г. Самара, 443056; lina281@ya.ru

Статья получена: 12.02.2020 **Статья принята к печати:** 28.02.2020 **Опубликована онлайн:** 13.03.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.016

ULTRASONOGRAPHY FEATURES AND SCREENING OF OVARIAN MASSES IN REPRODUCTIVE-AGE WOMEN

Spiridonova NV, Demura AA ✉, Katyushina VO

Samara State Medical University, Samara, Russia

Ovarian neoplasms can develop at any age, carry a high risk for malignant transformation, reduce the reproductive potential of a woman and are an indication for surgery. The search for optimal screening algorithms for ovarian tumors is still ongoing. The aim of this study was to evaluate the prognostic efficacy of ultrasonography (US) features in differentiating between benign, malignant and borderline tumors in reproductive-age women. We examined 168 reproductive-age women with ovarian masses who underwent surgery in 2012–2015 and compared the results of histopathological examinations with pulsed-Doppler US findings. We did not establish a correlation between the size/volume of the tumor and their morphological structure. We identified the echotexture characteristics associated with malignancy, including the presence of a solid component ($p < 0.001$); septations ($p = 0.029$) and projections on the internal surface of the tumor capsule ($p < 0.001$); moderate or significant buildup of free fluid in the small pelvis ($p = 0.007$), and the nodular surface of the tumor capsule ($p = 0.008$). Solid ovarian masses were at increased (31.69-fold) risk of transformation into malignant or borderline tumors, whereas for a mixed (cystic and solid) type the risk of such transformation increased 3.46-fold. We also identified Doppler parameters that can clearly discriminate between benign and malignant growths, including the blood flow rate in the tumor over 1.85 cm/s ($p = 0.007$) and RMI over 0.16 ($p = 0.013$). The sensitivity and specificity of our diagnostic model are 87% and 68%, respectively, with a probability threshold of 0.3.

Keywords: ovarian tumors, risk of malignancy, screening, ultrasound, ovarian tumor echotexture, Doppler ultrasonography, blood flow characteristics

Acknowledgements: the authors thank Komarova MV, Cand. Sci. (Biol.) and Associate Professor at the Samara State Medical University for her invaluable help with statistical analysis

Author contribution: all authors equally contributed to the study at its every stage.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Samara State Medical University (Protocol № 194 dated September 12, 2018). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina A. Demura
pr. Maslennikova, 25, Samara, 443056; lina281@ya.ru

Received: 12.02.2020 **Accepted:** 28.02.2020 **Published online:** 13.03.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.016

Опухоли яичников — одна из самых актуальных проблем современной гинекологии. Они возникают в любом возрасте, имеют высокий риск малигнизации, служат показанием для оперативного лечения и снижают репродуктивный потенциал женщины. Многокомпонентное

строение гонад и сочетание структур самых разных функциональных направлений обуславливают широчайший спектр гистологических форм новообразований яичников, особенно у пациенток репродуктивного возраста. Если принять во внимание еще и переходные формы, а также

опухоли, в которых сочетаются два и более гистотипа, то количество вариантов опухолей яичников возрастает в геометрической прогрессии. Следовательно, очень важно оценить макроскопическую структуру образования, чтобы выявить признаки, указывающие врачу ультразвуковой (УЗ) диагностики на присутствие неопластического процесса в образовании [1]. По мнению ряда авторов, эпителиальные опухоли составляют 60% всех новообразований яичников и 80–90% их злокачественных форм [2]; в то время как остальные опухоли возникают из зародышевых и стромальных клеток, характерны для более молодого возраста и могут усложнить дифференциальную диагностику опухолей и опухолевидных образований яичников при оценке УЗ-картины.

Ввиду агрессивного течения роста опухолей данной нозологии III–IV стадии заболевания устанавливают приблизительно у 60–70% пациенток при первичном обращении [3]. Одним из выходов на данный момент являются применение и совершенствование УЗ-методов диагностики. Ультразвуковое исследование (УЗИ) — это неинвазивный недорогой наиболее доступный и легко воспроизводимый диагностический метод, внедренный с 1970 г. [4–6]. Первые скрининговые осмотры женщин были начаты в 1980-х гг. и включали в себя только трансабдоминальное сканирование органов малого таза, что ввиду анатомических особенностей было малоэффективным способом. С 1990 г. I. Jacobs включил в свою скрининговую модель трансвагинальное УЗ-сканирование, и в течение почти 30 лет УЗИ остается ведущим методом диагностики опухолевидных образований яичников. Активное использование доплерографии позволило добиться большей точности в дифференцировке злокачественных и доброкачественных опухолей яичников. В основе метода лежит феномен неоваскуляризации опухоли, при котором в структуре новообразования происходит рост капилляров, способствующих ее дальнейшему росту; в результате кровотока злокачественных опухолей имеет особенности, которые формируются за счет недостатка гладкомышечной ткани в стенках злокачественных сосудов и наличия множественных шунтов, способствующих высокой скорости внутриопухолевого кровотока [7].

Целью исследования было оценить прогностическую эффективность определенных УЗ-признаков для дифференциальной диагностики злокачественных, доброкачественных и пограничных опухолей яичников у женщин репродуктивного возраста.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В основу работы легли результаты проспективного исследования 168 пациенток репродуктивного возраста с морфологически верифицированным процессом в яичниках, прооперированных на базе Самарского областного онкологического клинического диспансера с 2012 по 2015 г.

Таблица 1. Характеристика размеров опухолей яичников

	Доброкачественные	Пограничные	Злокачественные	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}	p
Размер образования 1	88,10 ± 4,90	97,06 ± 15,29	91,87 ± 7,42	0,867	0,431	0,643	0,724
Размер образования 2	77,48 ± 4,47	82,56 ± 14,00	77,26 ± 6,94	0,886	0,981	0,817	0,983
Размер образования, 3	82,79 ± 4,59	89,81 ± 14,52	84,56 ± 6,94	0,972	0,669	0,783	0,909
Объем образования, мл	599,06 ± 128,18	814,54 ± 358,32	579,17 ± 196,37	0,965	0,727	0,844	0,941

Примечание: p_{1-2} , p_{1-3} , p_{2-3} — межгрупповые сравнения; p — сравнения по однофакторному дисперсионному анализу Краскела–Уоллиса.

Набор пациенток проводили с учетом следующих критериев включения: возраст 18–40 лет; УЗ-данные, подтверждающие наличие опухоли или опухолевидного образования яичников; последующее оперативное лечение с проведением морфологической диагностики. Критерии исключения: возраст моложе 18 лет и старше 40 лет, наличие верифицированного онкологического заболевания в анамнезе.

Комплексное УЗИ с импульсно-волновым доплеровским режимом проводили на сканере Philips IU-22 (Philips; США).

Пациентки были разделены на три группы, согласно морфологической классификации ВОЗ от 2013 г.: 1) 101 (60,1%) пациентка с доброкачественными образованиями; 2) 24 (14,3%) пациентки с пограничными опухолями; 3) 43 (25,6%) пациентки со злокачественными опухолями.

У исследуемых групп проводили оценку таких УЗ-показателей, как размеры и объем образования яичников, наличие свободной жидкости в малом тазу, тип и особенности строения опухоли. При оценке опухолевого процесса в яичниках учитывали следующие критерии: тип строения (солидный, кистозный или кистозно-солидный), одностороннее или билатеральное поражение яичников, размеры образований, наличие перегородок в структуре образований, строение капсулы опухоли (а именно наличие разрастаний по внутренней или наружной поверхности капсулы, поверхность самой капсулы), наличие кровотока в образовании, а также отдельно рассматривали скорость кровотока и индекс резистентности кровотока в опухоли.

Статистический анализ проводили с помощью статистического пакета SPSS21, номер лицензии 20130626-3 (An IBM Company; США) и Microsoft Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Максимальные размеры опухоли (табл. 1) находились в пределах от 77,26 ± 6,94 мм до 97,06 ± 15,29 мм, не было установлено прямой зависимости размера опухолевого образования от стадии опухолевого процесса. Объем образования у пациенток с доброкачественными опухолями составил в среднем 599,06 ± 128,18 мл, пациенток с пограничными опухолями — 814,54 ± 358,32 мл и у пациенток со злокачественными опухолями — 579,17 ± 196,37 мл ($p = 0,941$).

При анализе эхографической картины проведена оценка стороны поражения (одно- или двустороннее), а также выделены в отдельную группу 15 пациенток, экстренно прооперированных в гинекологических стационарах общего профиля с удалением придатков, которым в последующем проведены УЗИ в онкодиспансере и пересмотр гистологических микропрепаратов. Одностороннее поражение чаще наблюдали при доброкачественных (81,2%) и злокачественных опухолях (86%) и лишь у 54,2% пациенток с пограничными опухолями ($p = 0,006$).

При оценке экоструктуры все опухоли яичников были разделены на три типа по строению (рис. 1): кистозная, кистозно-солидная и солидная ($p < 0,001$). Группа пациенток с кистозными образованиями составила 72,6%; ее характеризовало наличие округлого образования с четкими и ровными контурами, анэхогенной структуры с единичными или множественными перегородками, а также отсутствием разрастаний по внутренней капсуле. Кистозная структура образования в большей степени характерна для пациенток с доброкачественными опухолями (87,1%); при пограничных и злокачественных опухолях кистозное строение было выявлено у половины женщин — 54,2 и 48,8% соответственно.

Пациентки с опухолями кистозно-солидной структуры составили 22,6%. Для этой группы характерно наличие образования округлой формы, с достаточно четкими границами и ровными контурами, анэхогенной структуры, с перегородками или образованиями с наличием эхогенных включений и солидного компонента правильной или неправильной формы. Кистозно-солидная структура в большей степени характерна для пациенток с пограничными и злокачественными опухолями — 37,5 и 39,5% соответственно и лишь у 11,9% женщин с доброкачественными опухолями.

Пациентки с опухолями солидной структуры составили 4,8%. Для этой группы характерно наличие образования округлой либо неправильной формы с достаточно четкими неровными контурами, смешанной эхогенности или образования с наличием единичных анэхогенных включений округлой формы. Салидная структура была присуща образованиям у пациенток со злокачественными опухолями — 11,6% женщин.

Произведена оценка поверхности капсулы образований яичников (рис. 2): ровная или бугристая ($p = 0,008$). В группе пациенток с доброкачественными опухолями яичников ровную поверхность капсулы образования яичников наблюдали у 80 (79,2%) пациенток, бугристую поверхность — у 21 (20,8%) пациентки. В группе пациенток с пограничными опухолями яичников ровная поверхность капсулы образования яичников выявлена у 17 (70,8%) пациенток, бугристая поверхность — у 7 (29,2%). В группе пациенток со злокачественными опухолями яичников ровную поверхность капсулы образования яичников наблюдали у 23 (53,5%) пациенток, бугристую поверхность — у 20 (46,5%). При оценке наличия разрастаний на внешней ($p = 0,192$) и внутренней поверхностях ($p < 0,001$) образований яичников: для пациенток с доброкачественными опухолями у 40,6% пациенток обнаружено наличие разрастаний на внешней поверхности капсулы и у 4% женщин на внутренней. В группе пациенток с пограничными опухолями не выявлено разрастаний на внешней поверхности капсулы и у 79,2% зарегистрированы разрастания на ее внутренней поверхности. В группе пациенток со злокачественными опухолями у 65,1% наблюдали разрастания на внешней поверхности капсулы и у 9,3% женщин — на внутренней.

При доброкачественных опухолях наличие незначительного выпота в малом тазу выявлено у 15,8% женщин, не наблюдалось наличия умеренного и значительного количества свободной жидкости. При пограничных опухолях свободная жидкость в малом тазу выявлена у каждой третьей пациентки (33,3%), при этом у 16,7% пациенток в умеренном и значительном количестве, однако при злокачественных опухолях свободная жидкость



Рис. 1. Тип строения опухолей по данным УЗИ

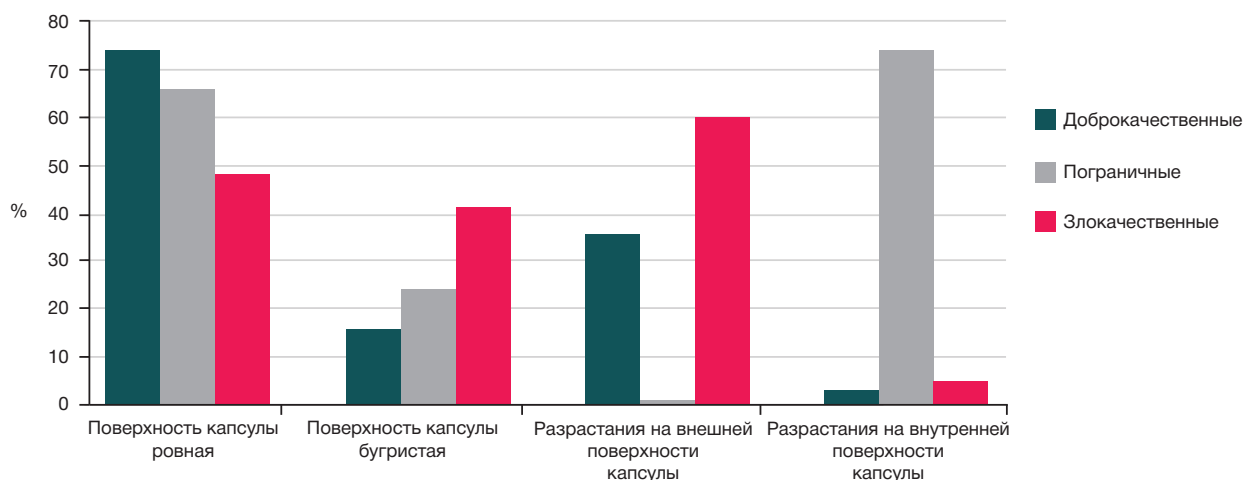


Рис. 2. Характеристика капсулы образований яичников у пациенток репродуктивного возраста

Таблица 2. Особенности кровотока в опухолях яичников

	Доброкачественные	Пограничные	Злокачественные	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}	p
v , см/с	$1,45 \pm 0,40$	$4,58 \pm 1,44$	$6,34 \pm 1,17$	0,007	< 0,001	0,261	< 0,001
RI	$0,08 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,04$	0,013	< 0,001	0,319	< 0,001

Примечание: v — скорость кровотока в опухолях яичников, см/с; RI — индекс резистентности опухолевого кровотока; p_{1-2} , p_{1-3} , p_{2-3} — межгрупповые сравнения; p — сравнения по однофакторному дисперсионному анализу Краскела–Уоллиса.

в малом тазу выявлена лишь у 14% женщин, в большом количестве только у 1 (2,3%) пациентки (сравнение по однофакторному дисперсионному анализу Краскела–Уоллиса равно 0,007).

Использование доплерографии позволяет выявить ряд особенностей кровоснабжения опухоли. Благодаря им мы можем своевременно диагностировать неопластический процесс в опухоли яичников, что особенно важно для своевременного принятия решения о тактике ведения пациенток в репродуктивном возрасте. В проведенном нами исследовании кровотока в опухоли яичников оценивали в несколько этапов.

Этап I. Оценивали наличие кровотока в выделенных группах ($p < 0,001$): в группе пациенток с доброкачественными опухолями яичников у 18 (17,8%) наблюдали наличие кровотока и у 27 (26,7%) — единичные цветовые локусы в режиме ЭД; в группе пациенток с пограничными опухолями у 9 (37,5%) наблюдали наличие кровотока и у 9 (37,5%) — единичные цветовые локусы в режиме ЭД; в группе пациенток со злокачественными опухолями у 23 (53,5%) наблюдали наличие кровотока и у 15 (34,9%) — единичные цветовые локусы в режиме ЭД.

Этап II. Оценивали скорость кровотока и индекс резистентности (RI) в выявленном образовании (табл. 2). В группе пациенток с доброкачественным процессом средний показатель скорости кровотока составил $1,45 \pm 0,4$ см/с и обнаружено минимальное значение индекса резистентности. В группе пациенток с пограничными опухолями яичников средний показатель скорости кровотока — $4,58 \pm 1,44$ см/с и индекс резистентности — $0,21 \pm 0,05$. В группе пациенток со злокачественными опухолями — максимальные значения скорости кровотока и индекса резистентности; $6,34 \pm 1,17$ см/с и $0,26 \pm 0,04$ соответственно. Выделены значимые доплерометрические показатели, способные четко обозначить разницу между доброкачественным и злокачественным процессами: превышение скорости кровотока свыше $1,85$ см/с ($p = 0,007$) и RI более $0,16$ ($p = 0,013$).

На основе метода логистического регрессионного анализа с пошаговым включением предикторов, с учетом данных УЗИ и оценки скоростей кровотока, мы построили модель ранней диагностики онкологического опухолевого процесса в яичниках (табл. 3). Значимым предиктором ультразвуковых параметров стал тип строения опухоли: наличие солидного образования увеличивало вероятность злокачественной и пограничной опухоли в 31,69 раза,

наличие кистозно-солидной структуры — в 3,46 раза. Чувствительность и специфичность данной диагностической модели составляют 87 и 68% при значении пороговой вероятности 0,3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принимая во внимание широкий диапазон морфологических проявлений опухолей яичников и нередко неблагоприятный исход данной патологии, на сегодняшний день для многих авторов актуален поиск предикторов ранней диагностики опухолей яичников, особенно для женщин репродуктивного возраста. Продолжается разработка алгоритмов раннего прогнозирования возможности озлокачествления опухоли яичника с целью диагностики опухолей начальных стадий и уменьшения объема оперативного вмешательства. В 1996 г. был впервые предложен способ расчета индекса малигнизации, позволяющий получить предварительную оценку вероятности озлокачествления в баллах [8]. В данном способе расчета индекса малигнизации, как и в нашем исследовании, использовали УЗ-характеристики, такие как многокамерность, наличие солидного компонента, билатеральность образований, наличие асцита. Но, в отличие от проведенной нами работы, дополнительно учитывали наличие внутрибрюшинных метастазов, состояние менструальной функции (пременопауза/постменопауза) и абсолютные показатели титра СА-125. Для удобства расчета каждому компоненту присваивали значение в баллах и производили расчет индекса малигнизации по формуле: ИМ = Ультразвуковые характеристики (в баллах) × Состояние менструальной функции (пременопауза/постменопауза) × Абсолютные показатели титра СА-125. При показателе индекса малигнизации < 200 образование яичника расценивали как потенциально доброкачественное.

В 1999–2009 гг. проведено исследование «The International Ovarian Tumor Analysis» (IOTA), целью которого были создание правил и разработка моделей для характеристики яичниковых образований [9]. Модели были разработаны для использования врачами независимо от квалификационных категорий и позволяли лучше понять генез опухоли яичника и роль СА-125 и других онкомаркеров. В дальнейшем международной группой авторов были предложены две модели логистической регрессии (ЛГ) — ЛР-1 и ЛР-2 для определения «доброкачественности» и «злокачественности» опухолей яичников [10, 11].

Таблица 3. Модель расчета ранней диагностики онкологического опухолевого процесса в яичниках у пациенток репродуктивного возраста

Фактор риска	Градации фактора риска	Коэффициент регрессии, b	ОШ (95% ДИ)	p
Тип строения	Кистозная, референс	0	1	—
	Солидная	3,46	31,69 (3,16–318,11)	0,003
	Кистозно-солидная	1,23	3,40 (1,32–8,77)	0,011
Наличие кровотока в образовании	«Да» по сравнению с «нет»	0,98	2,68 (1,56–4,58)	< 0,001
RI	Увеличение на 1	2,23	9,34 (1,92–45,49)	0,006
Константа	—	–2,35	—	< 0,001

Согласно этим моделям, специалист УЗ-диагностики проводит обследование, включающее оценку более 40 клинических и УЗ-переменных. Чувствительность данного метода составила 96%, точность 90%, но он достаточно трудоемок, затягивает и усложняет работу клинического врача, не учитывает анамнестические и лабораторные методы исследования. Результатом работы был вывод о том, что распознавание типичной УЗ-картины опытным врачом — лучший способ охарактеризовать патологию яичников, а СА-125 не улучшает диагностическую точность в предсказании злокачественности процесса [12–14]. В нашем исследовании при помощи статистического анализа удалось сократить количество переменных с целью экономии времени работы врача и удобства дальнейших расчетов, не ухудшив показатели чувствительности и специфичности данной диагностической модели (87 и 68%).

В 2011 г. было показано, что алгоритмы совместного использования двух опухолевых маркеров (титра СА-125 и HE-4) и результатов УЗИ необходимо применять для распределения женщин на оперативное лечение в специализированные лечебные учреждения [15].

В 2011 г. в международном руководстве NICE clinical guidelines CG 122 по ведению больных с раком яичника одним из ключевых моментов стало обязательное использование индекса малигнизации RMI, учитывающего аналогично алгоритму, предложенному в 1996 г. [16], три предоперационные характеристики: сывороточный СА-125 (CA-125), менопаузальный статус (М) и ультразвуковой балл (U). Согласно руководству, результат УЗИ необходимо оценивать в 1 балл при наличии каждого из следующих параметров: мультилокулярные кисты, солидные участки, метастазы, асцит и двусторонние поражения. Менопаузальный статус оценивали следующим образом: 1 балл — пременопауза и 3 балла — постменопауза (женщина, у которой не было менструации более года, или женщина старше 50 лет, у которой была гистерэктомия). Сывороточный СА-125 измеряли в МЕ/мл, его значение варьирует от 0 до сотен или даже тысяч единиц. Индекс

малигнизации рассчитывали по формуле: $RMI = U \cdot M \cdot CA-125$; при его значении выше 200 пациентке рекомендовали дополнительное обследование.

В работах современных авторов зачастую не удается обнаружить достоверных различий между доброкачественными и злокачественными опухолями яичников по классическим критериям малигнизации, таким как неправильная форма, неровный контур, большие размеры.

ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании не выявлено зависимости размеров и объема образований яичников от морфологической структуры опухоли. Однако анализ типов экоструктуры опухолей и опухолевидных образований яичников позволил выделить эхографические особенности опухолей яичников, ассоциирующиеся в большей степени с малигнизацией: наличие солидного компонента ($p < 0,001$), наличие перегородок ($p = 0,029$) и разрастаний по внутренней поверхности капсулы ($p < 0,001$), наличие умеренного и значительного количества свободной жидкости в малом тазу ($p = 0,007$) и бугристая поверхность капсулы образования яичника ($p = 0,008$).

Показано, что признаком возможной малигнизации опухолевого процесса в яичниках является наличие кровотока в образовании ($p < 0,001$). Выделены значимые доплерометрические показатели в группе пациенток репродуктивного возраста, способные четко обозначить разницу между доброкачественным и злокачественным процессом: скорость кровотока свыше 1,85 см/с ($p = 0,007$) и RI более 0,16 ($p = 0,013$).

В группе пациенток репродуктивного возраста выделенные нами УЗ-признаки (наличие солидного или кистозно-солидного образования, наличие кровотока в образовании и повышение индекса резистентности) можно использовать как наиболее значимые при дифференциальной диагностике вида опухолевого процесса в яичниках.

Литература

- Ашрафян Л. А., Бабаева Н. А., Антонова И. Б., Ивашина С. В., Люстик А. В., Алешикова О. И. и др. Ультразвуковые критерии ранней диагностики рака яичников. Опухоли женской репродуктивной системы. 2015; 11 (1): 53–60.
- Урманчеева А. Ф., Кутушева Г. Ф., Ульрих Е. А. Опухоли яичника (клиника, диагностика, лечение). Пособие для врачей. СПб.: ООО «Издательство Н-Л», 2012; 68 с.
- Максимов С. Я., Хаджимба А. В., Вышинская Е. А., Соболев И. В., Ильин А. А. Рак органов репродуктивной системы в молодом возрасте. Практическая онкология. 2017; 18 (2): 185–96.
- Буланов М. Н. Ультразвуковая гинекология. В 3-х томах. Т. 2. М.: Видар, 2010; 306 с.
- Manegold-Brauer G, Bellin AK, Tercanli S, Lapaire O, Heinzelmann-Schwarz V. The special role of ultrasound for screening, staging and surveillance of malignant ovarian tumors: distinction from other methods of diagnostic imaging. Arch Gynecol Obstet. 2012; (289): 491–8.
- Levine D, Brown DL, Andreotti RF, Benacerraf B, Benson CB, Brewster WR, et al. Management of asymptomatic ovarian and other adnexal cysts imaged at US: society of radiologists in ultrasound consensus conference statement. Radiology. 2010; 256 (3): 943–54.
- Хачкуров С. Г. Ультразвуковая симптоматика и дифференциальная диагностика кист и опухолей яичников. М.: МЕДпресс-информ, 2014; 288 с.
- Гаспаров А. С., Жордания К. И., Паяниди Ю. Г., Дубинская Е. Д. Онкогинекологические аспекты кистозных образований яичников. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013; 68 (8): 9–13.
- Higgins RV, Matkins JF, Marroum MC. Comprasion of fine-needle aspiracion cytologic findings of ovarian cysts with ovarian histologic findings. Am J Obstet gynecol. 1999; 180 (3): 550–3.
- Campbell S. Ovarian cancer: role of ultrasound in preoperative diagnosis and population screening. Ultrasound Obstet Gynecol. 2012; (40): 245–54.
- Kaijser J, Bourne T, Valentin L, Sayasneh A, Van Holsbeke C, Vergote L, et al. Improving strategies for diagnosing ovarian cancer: a summary of the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) studies. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013; 41 (1): 9–20.
- Fischerova D. Ultrasound scanning of the and abdomen for staging of gynecological tumors: a review. Ultrasound Obstetrics Gynecol. 2011; (38): 246–66.
- Van Gorp T, Cadron I, Despiere E, Daemen A, Leunen K., Amant F, et al. HE 4 and CA 125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. Br J Cancer. 2011. (104): 863–70.
- Valentin L, Ameye L, Franchi D, Guerriero S, Jurkovic D, Savelli L, et al. Risk of malignancy in unilocular cysts: a study of 1148 adnexal

- masses classified as unilocular cysts at transvaginal ultrasound and review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41 (1): 80–89.
15. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem.* 2011; (57): 1534–44.
 16. Ovarian cancer: recognition and initial management (CG122). National institute for health and care excellence. Clinical guideline. 2011, p. 19. Available from: <https://www.nice.org.uk/terms-and-conditions#notice-of-rights>.
- ### References
1. Ashrafyan LA, Babaeva NA, Antonova IB, Ivashina SV, Lustik AV, Alyoshikova OI, et al. Ultrasound criteria for early diagnosis of ovarian cancer. *Tumors of the female reproductive system.* 2015; 11 (1): 53–60. Russian.
 2. Urmanceeva AF, Kutusheva GF, Ulrih EA. *Opuholi jaichnika (klinika, diagnostika, lechenie). Posobie dlja vrachej.* SPb.: OOO «Izdatel'stvo N-L», 2012; 68 s. Russian.
 3. Maksimov SYa, Khadzhimba AV, Vyshinskaya EA, Sobolev IV, Ilyin AA. *Rak organov reproduktivnoj sistemy v molodom vozraste. Prakticheskaja onkologija.* 2017; 18 (2): 185–96. Russian.
 4. Bulanov MN. *Ul'trazvukovaja ginekologija. V 3-h tomah.* T. 2. M.: Vidar, 2010; 306 s.
 5. Manegold-Brauer G, Bellin AK, Tercanli S, Lapaire O, Heinzelmann-Schwarz V. The special role of ultrasound for screening, staging and surveillance of malignant ovarian tumors: distinction from other methods of diagnostic imaging. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; (289): 491–8.
 6. Levine D, Brown DL, Andreotti RF, Benacerraf B, Benson CB, Brewster WR, et al. Management of asymptomatic ovarian and other adnexal cysts imaged at US: society of radiologists in ultrasound consensus conference statement. *Radiology.* 2010; 256 (3): 943–54.
 7. Hachkuruzov SG. *Ul'trazvukovaja simptomatika i differencial'naja diagnostika kist i opuholej jaichnikov.* M.: MEDpress-inform, 2014; 288 s. Russian.
 8. Gasparov AS, Zhordania KI, Payanidi YuG, Dubinskaya ED. Oncogynecological aspects of ovarian cysts. *Bulletin of the RAMS.* 2013; 68 (8): 9–13. Russian.
 9. Higgins RV, Matkins JF, Marroum MC. Comparison of fine-needle aspiration cytologic findings of ovarian cysts with ovarian histologic findings. *Am J Obstet gynecol.* 1999; 180 (3): 550–3.
 10. Campbell S. Ovarian cancer: role of ultrasound in preoperative diagnosis and population screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012; (40): 245–54.
 11. Kaijser J, Bourne T, Valentin L, Sayasneh A, Van Holsbeke C, Vergote I, et al. Improving strategies for diagnosing ovarian cancer: a summary of the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) studies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41 (1): 9–20.
 12. Fischerova D. Ultrasound scanning of the and abdomen for staging of gynecological tumors: a review. *Ultrasound Obstetrics Gynecol.* 2011; (38): 246–66.
 13. Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, Daemen A, Leunen K., Amant F, et al. HE 4 and CA 125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer.* 2011. (104): 863–70.
 14. Valentin L, Ameye L, Franchi D, Guerriero S, Jurkovic D, Savelli L, et al. Risk of malignancy in unilocular cysts: a study of 1148 adnexal masses classified as unilocular cysts at transvaginal ultrasound and review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41 (1): 80–89.
 15. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem.* 2011; (57): 1534–44.
 16. Ovarian cancer: recognition and initial management (CG122). National institute for health and care excellence. Clinical guideline. 2011, p. 19. Available from: <https://www.nice.org.uk/terms-and-conditions#notice-of-rights>.

РЕАКТИВНОСТЬ μ -РИТМА ЭЭГ У ДЕТЕЙ ПРИ ИМИТАЦИИ ДВИЖЕНИЙ ВИЗУАЛЬНЫХ ОБРАЗОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО И НЕБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. И. Кайда ✉, А. А. Михайлова, Е. В. Эйсмонт, Л. Л. Джаппарова, В. Б. Павленко

Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

В настоящее время актуальна разработка интерфейсов мозг-компьютер, основанных на использовании параметров реактивности сенсомоторных ритмов ЭЭГ и предназначенных для реабилитации людей с нарушениями двигательных функций, в том числе детей. Целью работы было проанализировать реактивность μ -ритма ЭЭГ в индивидуально определенном частотном диапазоне у детей при имитации движений визуальных образов биологического и небιологического происхождения. ЭЭГ регистрировали во фронтальных, центральных и парietальных областях коры у 136 нормально развивающихся детей-правшей 4–15 лет в состоянии двигательного покоя, а также при самостоятельном выполнении и имитации движений с помощью компьютерной мыши. При выполнении детьми самостоятельных движений компьютерной мышью ($F_{1,132} = 31,17; p < 0,001$) и при осуществлении концентрических перемещений цветного круга ($F_{1,132} = 90,34; p < 0,001$) развивается десинхронизация μ -ритма во фронтальных, центральных и парietальных областях неокортекса. При имитации движений визуальных образов небιологического происхождения, по сравнению с заданием на выполнение самостоятельных движений, была выявлена синхронизация μ -ритма ($F_{1,132} = 12,65; p < 0,001$). При подражании движениям визуальных образов биологического происхождения относительно самостоятельных движений выявлена десинхронизация μ -ритма ($F_{1,132} = 9,58; p = 0,002$). Данные эффекты имели свои особенности в группах детей 4–6, 7–9, 10–12 и 13–15 лет. Результаты исследования показывают целесообразность учета возрастных особенностей реактивности μ -ритма и характера предъявляемых зрительных стимулов при разработке программного обеспечения интерфейсов мозг-компьютер.

Ключевые слова: дети; ЭЭГ; μ -ритм; имитация; биологическое движение; небιологическое движение

Финансирование: исследования выполнены в рамках темы: «Разработка комплекса экзоскелета кисти с внешним программным управлением и биологической обратной связью для процедуры реабилитации детей с синдромом ДЦП» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (RFMEFI60519X0186).

Вклад авторов: А. И. Кайда — набор и обработка данных, написание статьи; А. А. Михайлова — обработка данных, написание статьи; Е. В. Эйсмонт — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; Л. Л. Джаппарова — набор данных, написание статьи; В. Б. Павленко — план исследований, обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 12 от 14 июня 2016 г.). Получено добровольное информированное согласие родителей на участие детей в эксперименте.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Ивановна Кайда
ул. Ангарская, д. 38, г. Симферополь, 295001; kaydaanna@gmail.com

Статья получена: 01.04.2020 **Статья принята к печати:** 15.04.2020 **Опубликована онлайн:** 16.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.019

EEG μ -RHYTHM REACTIVITY IN CHILDREN DURING IMITATION OF BIOLOGICAL AND NON-BIOLOGICAL MOTION

Kaida AI ✉, Mikhailova AA, Eismont EV, Dzhapparova LL, Pavlenko VB

V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

The development of brain-computer interfaces based on the use of EEG sensorimotor rhythms reactivity parameters and designed for the rehabilitation of people (including children) with impaired motor functions is currently relevant. The study was aimed to analyse the EEG μ -rhythm in the individual frequency range in children during imitation of biological and non-biological motion. EEG was recorded at frontal, central and parietal cortical regions in 136 normally developing right-handed children aged 4–15, at rest and during the execution and imitation of movements using the computer mouse. When the children moved the computer mouse on their own ($F_{1,132} = 31.17; p < 0.001$) and executed the concentric moving of the coloured circle ($F_{1,132} = 90.34; p < 0.001$), the μ -rhythm desynchronization developed in the frontal, central and parietal neocortical regions. The μ -rhythm synchronization was detected during the non-biological motion imitation ($F_{1,132} = 12.65; p < 0.001$), compared to the task on the autonomous movement execution. The μ -rhythm desynchronization was observed during the biological motion imitation in relation to autonomous movement execution ($F_{1,132} = 9.58; p = 0.002$). The described effects had their own features in the groups of children aged 4–6, 7–9, 10–12 and 13–15. The study results demonstrate the desirability of taking into account the μ -rhythm reactivity age-related features and the visual stimuli nature when developing software for the brain-computer interfaces.

Keywords: children; EEG; μ -rhythm; imitation; biological motion; non-biological motion

Funding: the study was performed as a part of the project “Development of a complex of exoskeleton, hands and procedures for the rehabilitation of children with cerebral palsy” supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (RFMEFI60519X0186).

Author contribution: Kaida AI — data acquisition and analysis, manuscript writing; Mikhailova AA — data analysis, manuscript writing; Eismont EV — research planning, data acquisition and analysis, manuscript writing; Dzhapparova LL — data acquisition, manuscript writing; Pavlenko VB — research planning, data analysis, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of V.I. Vernadsky Crimean Federal University (protocol № 12 dated June 14, 2016). Informed consent to participation in the study was obtained from the parents.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna I. Kaida
Angarskaya, 38, Simferopol, 295001; kaydaanna@gmail.com

Received: 01.04.2020 **Accepted:** 15.04.2020 **Published online:** 16.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.019

Способность человека понимать цели действий и имитировать их играет важную роль в эффективной

интеграции в социальную среду, позволяя овладевать различными видами деятельности и нормами поведения

в социуме. В процессах распознавания движений и связанных с ними намерений значительную роль играет система зеркальных нейронов (СЗН) — нервных клеток, способных активироваться сходным образом, как при самостоятельном выполнении действий, так и при наблюдении за аналогичными действиями, выполняемыми другими индивидами [1, 2]. Было выдвинуто предположение, что СЗН играет важную роль в реализации сложных форм социального взаимодействия [3].

Маркером активации СЗН у человека принято считать десинхронизацию сенсомоторного ритма, или μ -ритма, ЭЭГ [4]. Поскольку на эффекты десинхронизации μ -ритма могут накладываться модуляции затылочного α -ритма [5], для определения его индивидуального частотного диапазона и оценки реактивности учитывают следующие особенности: в отличие от затылочного α -ритма, μ -ритм наиболее выражен во фронто-париетальных областях; его амплитуда падает при движениях субъекта, их представлении или при наблюдениях за движениями окружающих, но существенно не изменяется при открывании или закрывании глаз [6, 7].

Подавление амплитуды сенсомоторного ритма во время наблюдения за биологическим движением более выражено, чем при наблюдении небиологического движения [8], что также характерно для наблюдения социальных действий, по сравнению с действиями вне социального контекста [9]. Что касается подражания движениям, то предполагают, что оно сопровождается активацией СЗН человека и является результатом сопоставления наблюдаемого действия и внутреннего моторного плана осуществления этого действия [10].

Исследование СЗН и реактивности μ -ритма вызывает особый интерес в свете разработки новых методов реабилитации пациентов с различными двигательными нарушениями с помощью интерфейсов мозг-компьютер [11, 12]. В частности, при лечении взрослых пациентов применяют синхронные интерфейсы, основанные на анализе реактивности сенсомоторных ритмов ЭЭГ при представлении движения в ответ на предъявляемый сигнал [13, 14]. В последнее время такие методы начинают использовать в процессе реабилитации детей с синдромом детского церебрального паралича (ДЦП) [15]. В качестве предъявляемых пациентам сигналов в указанных работах используют символы либо текстовые команды. Однако с учетом концепции СЗН можно предположить, что более эффективными для вызова реакций в диапазоне μ -ритма ЭЭГ будут стимулы, наглядно представляющие движения и требующие их имитации. Следует отметить, что при работе с детьми для более эффективной реализации задания предпочтительно использовать действия, находящиеся в моторном репертуаре ребенка [16]. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было проанализировать реактивность μ -ритма ЭЭГ у детей 4–15 лет в условиях имитации движений визуальных образов биологического и небиологического происхождения с помощью компьютерного манипулятора — мыши. Действия с компьютерной мышью в настоящее время хорошо знакомы даже детям дошкольного возраста.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика выборки

Исследование проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная

физиология и биофизика» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского».

В исследовании приняли участие 136 детей-правшей в возрасте 4–15 лет (69 мальчиков и 67 девочек). Критерии включения в эксперимент: наличие нормального (или скорректированного до нормального) уровня зрения и слуха; предпочтение правой руки в работе с компьютерной мышью; достаточный уровень когнитивного развития (IQ не менее 80 баллов по тесту Векслера в вариантах WPPSI и WISC). Критерии исключения: прием препаратов, влияющих на работу ЦНС; тяжелые хронические соматические заболевания. В дальнейшем дети были разделены на четыре возрастные группы: 4–6 лет (30 человек), 7–9 лет (46 человек), 10–12 лет (30 человек) и 13–15 лет (30 человек).

Регистрация ЭЭГ

Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-3» («Нейрософт»; Россия). Данные обрабатывали с помощью компьютерной программы «WinEEG» версии 2.8 (в свободном доступе). Для коррекции артефактов применяли метод независимых компонент. ЭЭГ-потенциалы отводили монополярно в 19 отведениях по системе 10–20. Областью интересов в данном исследовании были фронтальные, центральные и париетальные зоны неокортекса (локусы F3, F4, Fz, C3, C4, Cz, P3, P4, Pz). Референтным электродом служили объединенные контакты, закрепленные на мочках ушей. Частоты среза фильтров высоких и низких частот составляли, соответственно, 1,5 и 35 Гц, частота оцифровки ЭЭГ-сигналов — 250 Гц.

Запись ЭЭГ производили во время выполнения испытуемыми серии последовательных заданий длительностью по 30 с каждое. Отрезки ЭЭГ подвергали быстрому преобразованию Фурье с эпохой анализа 4 с и взаимным перекрытием эпох 50%.

В ситуации имитации движений визуальных образов небиологического происхождения использовали следующие задания:

- 1) фиксация взгляда на видеоизображении компьютерной мыши (фон);
- 2) осуществление концентрических перемещений цветного круга на экране монитора при помощи компьютерной мыши (Дв.1) (рис. 1А);
- 3) имитация движений другого цветного круга (имитация небиологического движения, ИмНБ) (рис. 1Б).

В ситуации имитации движений визуальных образов биологического происхождения испытуемый и экспериментатор располагались за стоящими рядом столами (экспериментатор справа), на каждом из которых находились монитор и компьютерная мышь. На мониторе перед испытуемым с помощью веб-камеры демонстрировали рабочую плоскость стола экспериментатора с расположенной на ней мышью. Последовательность заданий была следующая:

- 1) фиксация взгляда на видеоизображении компьютерной мыши (фон);
- 2) осуществление самостоятельных движений компьютерной мышью по кругу (Дв.2) (рис. 1В);
- 3) имитация детьми движений, выполняемых экспериментатором (имитация биологического движения, ИмБ) (рис. 1Г).

ЭЭГ анализировали в индивидуальном частотном диапазоне μ -ритма, определяемого при совершении

самостоятельных движений правой рукой в отведении СЗ. Полный частотный диапазон μ -ритма (6–13 Гц) разбивали на отрезки по 1 Гц. В качестве индивидуального частотного диапазона принимали два прилегающих друг к другу отрезка с максимальной десинхронизацией относительно фона [17]. Амплитуду μ -ритма в пределах индивидуального частотного диапазона рассчитывали для каждой экспериментальной ситуации. С целью нормализации распределения значения амплитуд логарифмировали.

Для сопоставления параметров μ -ритма в ситуациях имитации биологического и небιологического движений использовали индексы реактивности. Указанные показатели рассчитывали по общепринятой схеме [18], в соответствии с формулой: $k = \ln(B/A)$, где k — индекс реактивности сенсомоторного ритма, B — амплитуда сенсомоторного ритма в основной ситуации, A — амплитуда сенсомоторного ритма в исходной ситуации сравнения (фон или самостоятельное движение). Положительные значения индекса реактивности соответствовали синхронизации сенсомоторного ритма, а отрицательные — десинхронизации.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.; США). Для описания распределений, отличных от нормального, применяли медиану и интерквартильный размах, а различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. В случаях нормального распределения данных использовали среднее и стандартную ошибку среднего. Различия в амплитуде и индексах реактивности μ -ритма, зарегистрированного в разных экспериментальных ситуациях, оценивали с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). По схеме $4 \times 2 \times 9$ оценивали влияние межсубъектного фактора — возрастной группы (ВОЗР), а также двух внутрисубъектных факторов — ситуации (СИТ) и локуса ЭЭГ (ЛОК). Для расчета статистической значимости различий в анализируемых параметрах сенсомоторного ритма в привязке к каждому из девяти отведений ЭЭГ в рамках каждой возрастной группы использовали метод априорных контрастов (оценку F-распределения).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частотные показатели μ -ритма

Значения медианы нижней границы индивидуального диапазона μ -ритма составили 9 Гц (8,5; 10) при крайних значениях 6 и 11 Гц. Значения медианы верхней границы индивидуального диапазона μ -ритма составили 11 Гц (10,5; 12) при крайних значениях 8 и 13 Гц. Различия по данному показателю между возрастными группами не достигали уровня статистической значимости.

Амплитуда μ -ритма ЭЭГ в состоянии двигательного покоя, а также при выполнении и имитации действий

Дисперсионный анализ различий в амплитуде μ -ритма в ситуации Дв.1, относительно фона, с учетом возрастной группы и локуса отведения ЭЭГ показал значимое влияние факторов СИТ ($F_{1,132} = 90,34$; $p < 0,001$), ВОЗР ($F_{3,132} = 10,18$; $p < 0,001$) и ЛОК ($F_{8,1056} = 73,06$; $p < 0,001$), а также взаимодействия факторов СИТ×ЛОК ($F_{8,1056} = 41,28$;

$p < 0,001$). В ситуации ИмНБ, относительно Дв.1 на изменения амплитуды μ -ритма значимо влияли факторы СИТ ($F_{1,132} = 12,65$; $p < 0,001$), ВОЗР ($F_{3,132} = 14,67$; $p < 0,001$) и ЛОК ($F_{8,1056} = 39,43$; $p < 0,001$).

Анализ различий в амплитуде μ -ритма в ситуации Дв.2 относительно фона и с учетом возрастной группы и локуса отведения ЭЭГ показал значимое влияние факторов СИТ ($F_{1,132} = 31,17$; $p < 0,001$), ВОЗР ($F_{3,132} = 6,46$; $p < 0,001$) и ЛОК ($F_{8,1056} = 71,55$; $p < 0,001$), а также взаимодействия факторов СИТ×ЛОК ($F_{8,1056} = 28,32$; $p < 0,001$) и СИТ×ВОЗР ($F_{3,132} = 6,35$; $p < 0,001$). При оценке изменения амплитуды μ -ритма в ситуации ИмБ относительно Дв.2 было показано значимое влияние факторов СИТ ($F_{1,132} = 9,58$; $p = 0,002$), ВОЗР ($F_{3,132} = 18,63$; $p < 0,001$) и ЛОК ($F_{8,1056} = 54,08$; $p < 0,001$), а также взаимодействия факторов СИТ×ЛОК ($F_{8,1056} = 3,28$; $p = 0,001$) и СИТ×ВОЗР ($F_{3,132} = 6,2$; $p = 0,001$).

У детей 4–6 лет при осуществлении концентрических перемещений цветного круга была выявлена значимая десинхронизация μ -ритма ЭЭГ (Дв.1 относительно фона) в большинстве исследуемых областей. При имитации движений цветного круга изменения амплитуды μ -ритма (ИмНБ относительно Дв.1) не достигали уровня статистической значимости (рис. 2А). При выполнении самостоятельных движений компьютерной мышью у детей данного возраста был зарегистрирован значимый рост амплитуды μ -ритма ЭЭГ (Дв.2 относительно фона) в центральном локусе правого полушария (С4). При имитации движений экспериментатора была обнаружена десинхронизация сенсомоторного ритма (ИмБ относительно Дв. 2) в срединном теменном отведении (Pz) (рис. 2Б).

В группе детей 7–9 лет значимая депрессия μ -ритма в ситуации Дв.1 была обнаружена в большинстве исследуемых областей. При ИмНБ относительно Дв.1

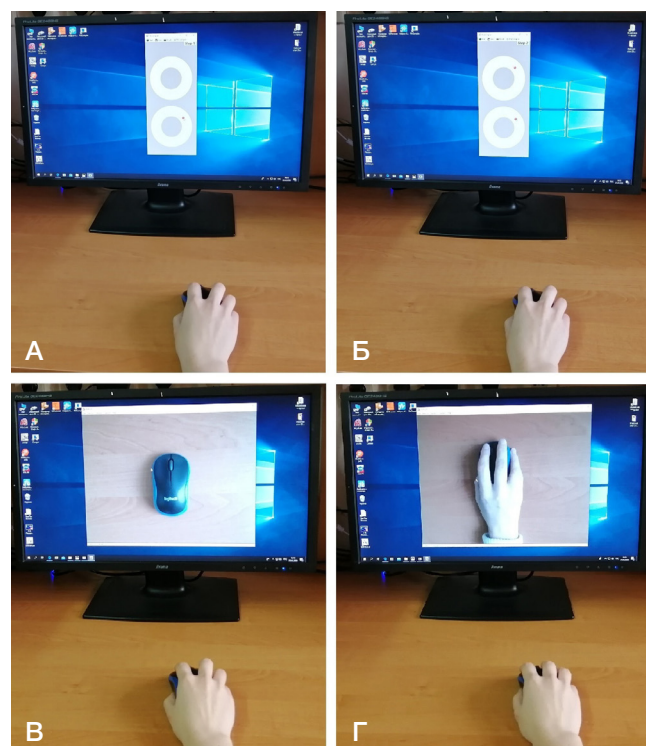


Рис. 1. Серия заданий. А. Осуществление концентрических перемещений цветного круга на экране монитора при помощи компьютерной мыши (Дв.1). Б. Имитация движений другого цветного круга (ИмНБ). В. Осуществление самостоятельных движений компьютерной мышью по кругу (Дв.2). Г. Имитация детьми движений, выполняемых экспериментатором (ИмБ).

изменения амплитуды μ -ритма не достигали уровня статистической значимости (рис. 3А). В ситуации Дв.2 значимая десинхронизация сенсомоторного ритма была обнаружена в центральных (C3 и Cz) и всех теменных локусах. При ИмБ относительно Дв.2 не выявлено значимых изменений амплитуды μ -ритма (рис. 3Б).

У детей 10–12 лет при Дв.1 значимое падение амплитуды μ -ритма зарегистрировано в большинстве анализируемых локусов. При имитации движений цветного круга обнаружена значимая синхронизация сенсомоторного ритма (ИмНБ относительно Дв.1) в срединном фронтальном отведении (рис. 4А). В ситуации Дв.2 значимое падение амплитуды μ -ритма наблюдали в центральных (C3 и Cz) и всех теменных локусах. При ИмБ относительно Дв.2 изменения амплитуды сенсомоторного ритма не достигали уровня статистической значимости (рис. 4Б).

В группе подростков 13–15 лет при Дв.1 снижение амплитуды μ -ритма достигало уровня статистической значимости во всех анализируемых локусах. При имитации небологического движения в большинстве исследуемых областей была зарегистрирована значимая синхронизация (ИмНБ, относительно Дв.1) сенсомоторного ритма (рис. 5А). При выполнении самостоятельных движений компьютерной мышью значимая десинхронизация сенсомоторного ритма (Дв.2 относительно фона) была обнаружена во всех исследуемых областях. В ситуации ИмБ выявлена дополнительная, по сравнению с предыдущим заданием, десинхронизация μ -ритма, значимая во всех отведениях (рис. 5Б).

Сравнение реактивности μ -ритма ЭЭГ при имитации движений визуальных образов биологического и небологического происхождения

Для анализа различий в реактивности μ -ритма при ИмНБ и ИмБ, относительно условий выполнения самостоятельных движений с произвольной скоростью, был проведен дисперсионный анализ индексов реактивности с учетом

возрастной группы и локуса отведения ЭЭГ. Средние значения индексов реактивности μ -ритма у детей в четырех возрастных группах представлены в табл. 1 и 2. Выявлено значимое влияние факторов СИТ ($F_{1, 132} = 21,85$; $p < 0,001$) и ЛОК ($F_{8, 1056} = 3,95$; $p < 0,001$), а также взаимодействия факторов СИТ \times ВОЗР ($F_{3, 132} = 5,52$; $p = 0,001$). В группе детей дошкольного возраста различия в индексах реактивности μ -ритма ЭЭГ при ИмНБ и ИмБ достигали уровня статистической значимости в теменных отведениях Pz и P4 ($p = 0,03$). У детей 7–9 лет анализируемые различия были статистически значимыми для локуса Fz ($p = 0,04$). У детей 10–12 лет различия в индексах реактивности μ -ритма не достигали уровня статистической значимости. В группе подростков 13–15 лет анализируемые различия были статистически значимыми во всех исследуемых областях ($p \leq 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования показали, что индивидуальные границы частотного диапазона сенсомоторного ритма у детей 4–15 лет широко варьируют, а их средние величины значимо не различаются у разных возрастных групп. В работе других авторов [19], посвященной анализу реактивности μ -ритма ЭЭГ в индивидуально определенном частотном диапазоне у детей 4–11 лет, полоса сенсомоторного ритма также составляла в среднем 9–11 Гц, были отмечены высокая межиндивидуальная вариативность его параметров и отсутствие связи с возрастом детей. Все это указывает на необходимость определения индивидуального частотного диапазона у детей при проведении исследований реактивности сенсомоторного ритма, а также перед проведением коррекционных мероприятий с использованием параметров μ -ритма (тренингов на основе биологической обратной связи по ЭЭГ, применения интерфейсов мозг-компьютер).

Анализ изменений амплитуды μ -ритма показал, что у детей 4–6 лет при выполнении произвольных

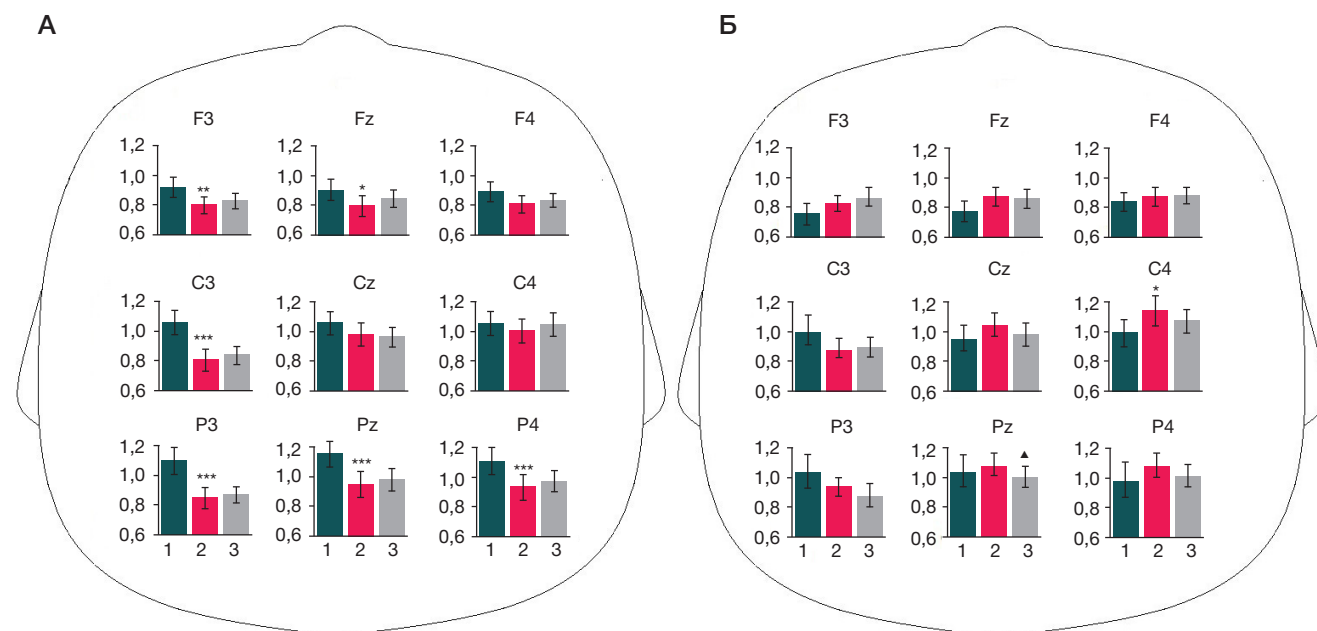


Рис. 2. Амплитуда (A, Lp мкВ) μ -ритма ЭЭГ у детей 4–6 лет при имитации движений визуальных образов небологического (А) и биологического (Б) происхождения. 1 — фон, 2 — выполнение самостоятельных движений с произвольной скоростью, 3 — имитация движений. Различия амплитуд в фоне и при выполнении самостоятельных движений: * — $p < 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; при выполнении самостоятельных движений и имитации: ▲ — $p < 0,05$

перемещений цветного круга (Дв.1) можно наблюдать значимую десинхронизацию μ -ритма ЭЭГ во фронтальном и центральном отведениях левого полушария, медианном фронтальном отведении и всех теменных областях (F3, Fz, C3, P3, Pz, P4). Полученные в настоящем исследовании результаты согласуются с уже имеющимися в литературе данными о десинхронизации сенсомоторного ритма при осуществлении произвольных движений [20]. При выполнении самостоятельных движений компьютерной мышью (Дв.2) значимого падения амплитуды μ -ритма не наблюдалось. Возможно, что для детей данного возраста задание на выполнение относительно простых круговых движений компьютерной мышью было проще задания на захват и перемещение цветного круга при помощи левой кнопки компьютерной мыши и не требовало особого двигательного контроля. При выполнении этого задания был также выявлен значимый рост амплитуды μ -ритма

ЭЭГ в локусе C4, что может быть связано с торможением в ипсилатеральном, относительно задействованной руки, полушарии [21].

В группах детей 7–9 и 10–12 лет десинхронизация μ -ритма при выполнении самостоятельных движений была обнаружена в большинстве исследуемых областей. При этом условие осуществления концентрических перемещений цветного круга (Дв.1), в отличие от условия выполнения движений мышью по кругу (Дв.2), также сопровождалось десинхронизацией сенсомоторного ритма во фронтальных локусах (F3, Fz). Известно, что лобные области коры головного мозга осуществляют планирование и подготовку сложных движений [22]. Предполагается также, что более сложные двигательные акты сопровождаются более широко распространенной десинхронизацией μ -активности [23]. Можно предположить, что выполнение перемещений цветного

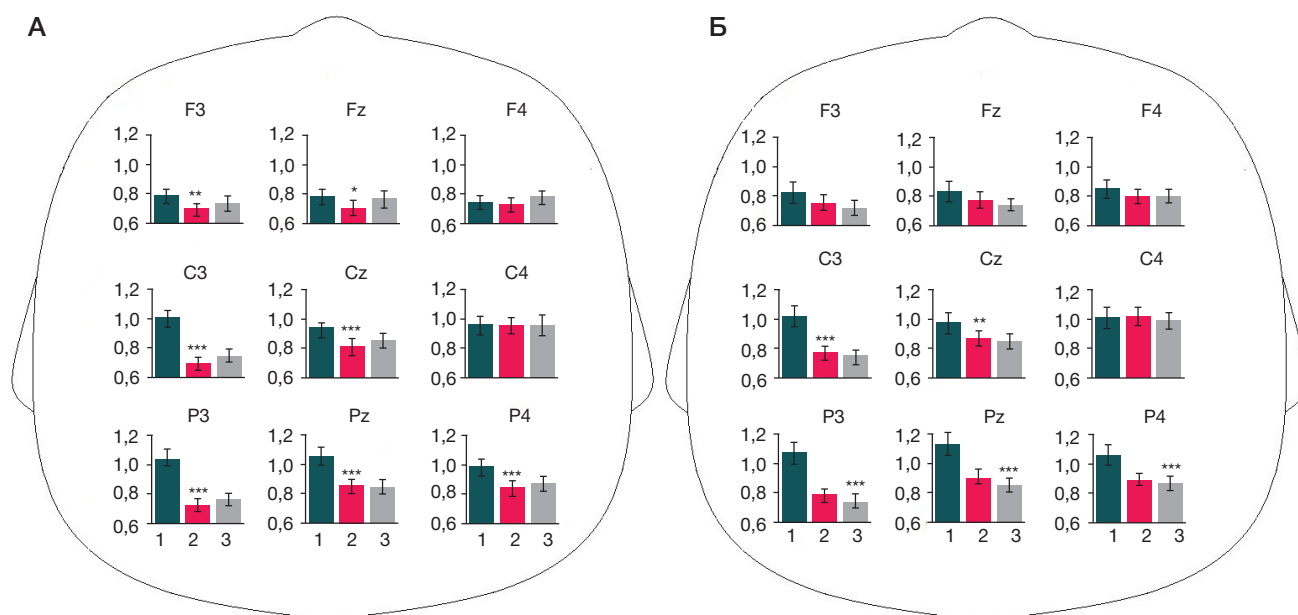


Рис. 3. Амплитуда (A, Lf мкВ) μ -ритма ЭЭГ в группе детей 7–9 лет при имитации движений визуальных образов небологического (А) и биологического (Б) происхождения. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

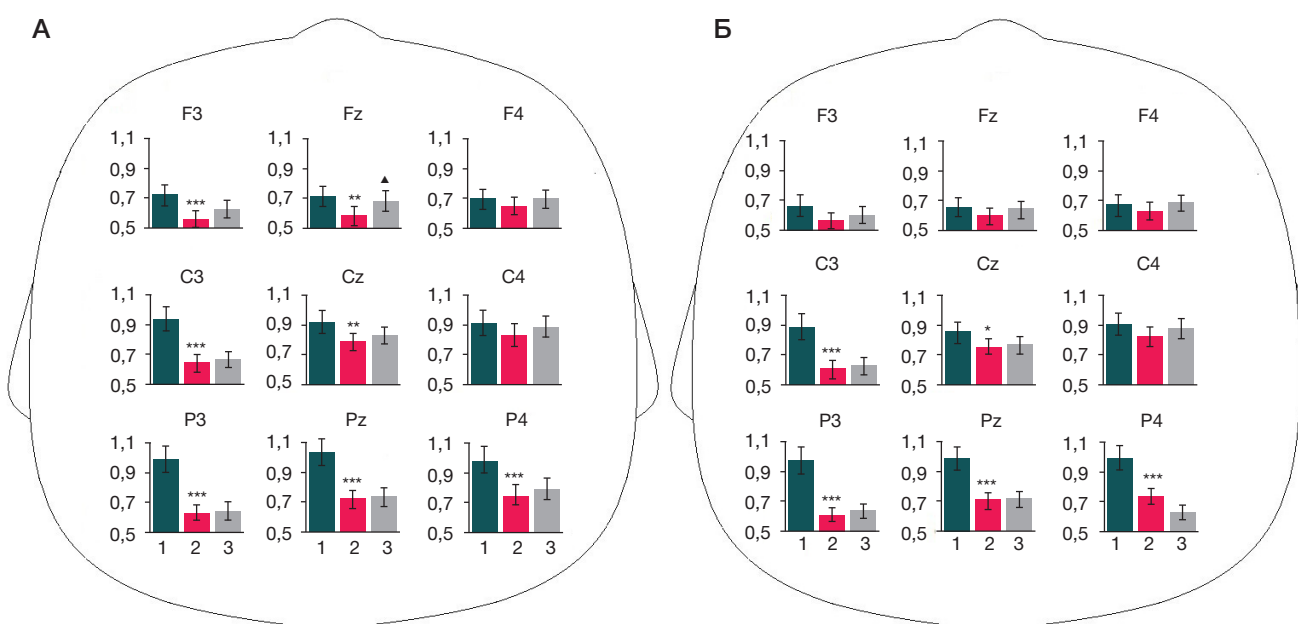


Рис. 4. Амплитуда (A, Lf мкВ) μ -ритма ЭЭГ в группе детей 10–12 лет при имитации движений визуальных образов небологического (А) и биологического (Б) происхождения. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

круга у детей 7–12 лет, как и у младшей группы, требовало значительных усилий, что и приводило к вовлечению фронтальных областей коры.

Ситуации имитации движений визуальных образов биологического и небиологического происхождения у детей 4–6, 7–9 и 10–12 лет почти не сопровождались дополнительной модуляцией μ -ритма относительно выполнения произвольных движений. Выявленный факт может свидетельствовать о том, что у детей данного возраста в условиях подражания дополнительные ресурсы неокортекса, требуемые для переработки разномодальной информации, вовлекаются недостаточно.

В группе подростков 13–15 лет значимая десинхронизация сенсомоторного ритма при выполнении самостоятельных движений была обнаружена во всех исследуемых областях. Снижение амплитуды μ -ритма над фронтальными, центральными и парietальными локусами у детей старшего возраста может быть обусловлено развитием связей между задействованными областями неокортекса. При имитации движений визуальных образов небиологического происхождения наблюдалось меньшее падение амплитуды сенсомоторного ритма, чем при выполнении произвольных движений и подражании движениям визуальных образов биологического происхождения (что особенно заметно во фронтальных и центральных локусах). Можно предположить, что необходимость подражать движениям другого объекта (цветного круга) привела к переключению внимания на его восприятие и, как следствие, к ослаблению моторного контроля собственных движений. У детей данного возраста в ситуации ИмБ выявлена дополнительная, по сравнению с наблюдаемой при выполнении задания Дв.2, значимая десинхронизация μ -ритма во всех отведениях. Обращает на себя внимание наибольшая выраженность такой реакции в парietальных локусах. Известно, что парietальные области коры больше вовлечены в переработку информации при наблюдении движений, выполняемых человеком, в сравнении с наблюдением движений небиологических объектов [24]. Выявленная в настоящем исследовании модуляция сенсомоторного

ритма в данных областях при подражании движениям визуальных образов биологического происхождения может указывать на участие находящихся в теменной коре компонентов СЗН, связанных с кодированием целей, лежащих в основе наблюдаемых действий [25]. Зеркальные нейроны связывают с когнитивной интеграцией визуальных, слуховых и моторных стимулов для обеспечения социального взаимодействия у детей [26] и взрослых [27]. В связи с этим, можно предположить, что дополнительная десинхронизация μ -ритма при имитации движений другого человека вызвана именно наличием социального контекста, к которому чувствительна СЗН.

При сравнении индексов реактивности μ -ритма в заданиях имитации было выявлено, что подражание движениям визуальных образов биологического происхождения у детей старшей группы сопровождается большей десинхронизацией, в сравнении с ситуацией подражания движениям цветного круга. Как уже отмечалось, подобные особенности реактивности сенсомоторного ритма во время наблюдения за движениями биологических и небиологических объектов выявлены у взрослых волонтеров [8].

Сравнительный анализ паттернов реактивности сенсомоторного ритма у детей разного возраста позволяет прийти к следующим заключениям. В группе младших детей (4–6 лет) наибольшая активация фронтальных, центральных и парietальных областей коры мозга, проявляющаяся в снижении амплитуды μ -ритма (более значимого в левом полушарии), наблюдается при движениях компьютерной мышью, ассоциированных с небиологическим объектом (цветной круг) (Дв.1). Выполнение движений компьютерной мышью в произвольном ритме (Дв.2) не приводит к значимому снижению амплитуды μ -ритма, а имитация биологического движения (движения руки другого человека) в большинстве отведений не сопровождается дополнительной активацией. Таким образом, в нашей экспериментальной ситуации у детей дошкольного возраста корковый отдел двигательного анализатора наиболее чувствителен к манипуляциям с небиологическими объектами. У детей более старших возрастных групп (7–9 и 10–12 лет) выявлен

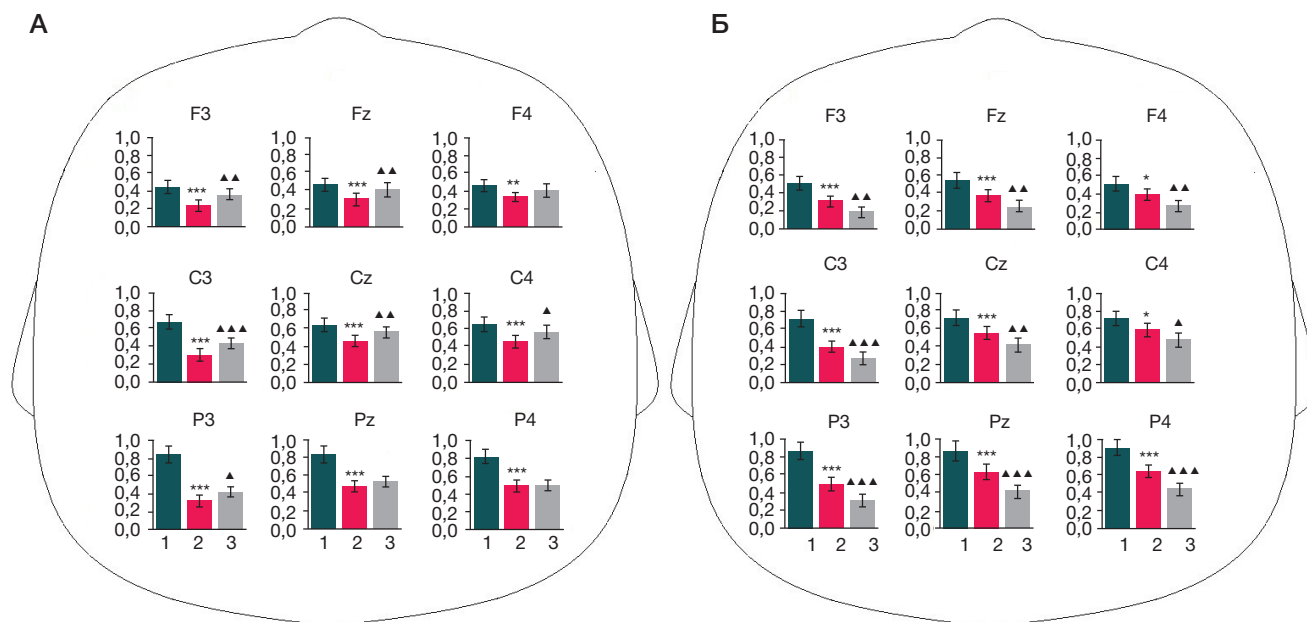


Рис. 5. Амплитуда (A, Ln мкВ) μ -ритма ЭЭГ в группе детей 13–15 лет при имитации движений визуальных образов небиологического (А) и биологического (Б) происхождения. Различия амплитуд при выполнении самостоятельных движений и имитации: ▲▲ — $p \leq 0,01$; ▲▲▲ — $p \leq 0,001$. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

Таблица 1. Средние значения индексов реактивности (с обозначением ошибки среднего) при имитации движений визуальных образов небиологического происхождения

Группа	Отведения ЭЭГ								
	F3	Fz	F4	C3	Cz	C4	P3	Pz	P4
4–6 лет	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,04	-0,02 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,04
7–9 лет	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,05	0,04 ± 0,03	-0,01 ± 0,03	0,03 ± 0,03
10–12 лет	0,06 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,04	0,05 ± 0,05
13–15 лет	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,03

Примечание: положительные значения индекса реактивности соответствуют синхронизации сенсомоторного ритма, отрицательные значения — десинхронизации.

Таблица 2. Средние значения индексов реактивности (с обозначением ошибки среднего) при имитации движений визуальных образов биологического происхождения

Группа	Отведения ЭЭГ								
	F3	Fz	F4	C3	Cz	C4	P3	Pz	P4
4–6 лет	0,04 ± 0,04	-0,01 ± 0,05	0,01 ± 0,05	0,01 ± 0,04	-0,07 ± 0,05	-0,07 ± 0,06	-0,06 ± 0,05	-0,09 ± 0,05	-0,06 ± 0,06
7–9 лет	-0,03 ± 0,03	-0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,03	-0,03 ± 0,02	-0,03 ± 0,03	-0,03 ± 0,04	-0,04 ± 0,04	-0,06 ± 0,03	-0,03 ± 0,03
10–12 лет	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,04	0,05 ± 0,03
13–15 лет	-0,11 ± 0,03	-0,12 ± 0,03	-0,11 ± 0,03	-0,14 ± 0,03	-0,12 ± 0,04	-0,11 ± 0,04	-0,18 ± 0,03	-0,21 ± 0,04	-0,20 ± 0,03

схожий паттерн активации неокортекса при движениях, ассоциированных с небиологическим объектом, при собственных движениях компьютерной мышью, а также при имитации движений биологического объекта (руки экспериментатора). В отличие от уже рассмотренных групп, испытуемые 13–15 лет демонстрируют статистически значимую десинхронизацию μ -ритма во фронтальных, центральных и теменных областях коры обоих полушарий при имитации движений другого человека.

Логично предположить, что процессы восприятия и имитации движений других людей у детей младших возрастных групп находятся на стадии становления, в то время, как у подростков они достаточно развиты и схожи с таковыми у взрослых. Выраженная десинхронизация μ -ритма у подростков при совершении самостоятельных движений и имитации движений визуальных образов биологического происхождения во всех исследуемых областях может быть обусловлена созреванием моторных, сенсомоторных и ассоциативных областей коры, вовлеченных в выполнение и имитацию действий [28]. Выявленные в настоящем исследовании возрастные особенности реактивности сенсомоторного ритма могут быть использованы при совершенствовании уже имеющихся коррекционных методик реабилитации детей с

ДЦП на основе роботизированных устройств, управляемых по характеристикам ЭЭГ [15].

ВЫВОДЫ

При выполнении детьми 4–15 лет самостоятельных движений компьютерной мышью развивается десинхронизация μ -ритма во фронтальных, центральных и парietальных областях неокортекса, более выраженная в левом полушарии. При имитации движений визуальных образов биологического и небиологического происхождения у детей 4–6, 7–9 и 10–12 лет выявлена лишь незначительная, по сравнению с заданием на выполнение самостоятельных движений, дополнительная модуляция μ -ритма. У детей 13–15 лет наибольшая десинхронизация сенсомоторного ритма отмечена в ситуации подражания движениям руки экспериментатора. При разработке программного обеспечения интерфейсов мозг-компьютер, предназначенных для коррекции двигательных расстройств, в качестве зрительных стимулов могут быть использованы элементы движений небиологических объектов, но чем старше дети, тем более эффективным для активации неокортекса может быть предъявление движущихся биологических объектов.

Литература

1. Rizzolatti G, Fogassi L. The mirror mechanism: recent findings and perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369 (1644): 20130420.
2. Hardwick RM, Caspers S, Eickhoff SB, Swinnen SP. Neural correlates of action: Comparing meta-analyses of imagery, observation, and execution. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018; (94): 31–44.
3. Лебедева Н. Н., Зуфман А. И., Мальцев В. Ю. Система зеркальных нейронов мозга: ключ к обучению, формированию личности и пониманию чужого сознания. *Успехи физиологических наук.* 2017; 48 (4): 16–28.
4. Fox NA, Bakermans-Kranenburg MJ, Yoo KH, Bowman LC, Cannon EN, Vanderwert RE, et al. Assessing human mirror activity with EEG mu rhythm: A meta-analysis. *Psychol Bull.* 2016; 142 (3): 291–313.
5. Hobson HM, Bishop DVM. Mu suppression — a good measure of the human mirror neuron system? *Cortex.* 2016; (82): 290–310.
6. Gundlach C, Muller MM, Nierhaus T, Villringer A, Sehm B. Modulation of Somatosensory Alpha Rhythm by Transcranial Alternating Current Stimulation at Mu-Frequency. *Front Hum Neurosci.* 2017; (11): 432.
7. Bimbi M, Festante F, Coude G, Vanderwert RE, Fox NA, Ferrari PF. Simultaneous scalp recorded EEG and local field potentials from monkey ventral premotor cortex during action observation and execution reveals the contribution of mirror and motor neurons to the mu-rhythm. *Neuroimage.* 2018; (175): 22–31.
8. Ulloa ER, Pineda JA. Recognition of point-light biological motion: mu rhythms and mirror neuron activity. *Behav Brain Res.* 2007; 183 (2): 188–94.
9. Oberman LM, Pineda JA, Ramachandran VS. The human mirror

- neuron system: a link between action observation and social skills. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2007; 2 (1): 62–66.
10. Wohlschlagel A, Gattis M, Bekkering H. Action generation and action perception in imitation: an instance of the ideomotor principle. *Philos. Trans. R Soc. Lond., B Biol Sci*. 2003; (358): 501–15.
 11. Фролов А. А., Бобров П. Д. Интерфейс мозг-компьютер: нейрофизиологические предпосылки и клиническое применение. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2017; 67 (4): 365–76.
 12. Левицкая О. С., Лебедев М. А. Интерфейс мозг-компьютер: будущее в настоящем. *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета*. 2016; (2): 4–16.
 13. Lopez-Larraz E, Escolano C, Montesano L, Minguez J. Reactivating the Dormant Motor Cortex After Spinal Cord Injury With EEG Neurofeedback: A Case Study With a Chronic, Complete C4 Patient. *Clin EEG Neurosci*. 2019; 50 (2): 100–10.
 14. Либуркина С. П., Васильев А. Н., Каплан А. Я., Иванова Г. Е., Чуканова А. С. Пилотное исследование идеомоторного тренинга в контуре интерфейса мозг-компьютер у пациентов с двигательными нарушениями. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2018; 9 (2): 63–68.
 15. Ларина Н. В., Корсунская Л. Л., Власенко С. В. Комплекс «Экзокист-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с использованием неинвазивного интерфейса «мозг-компьютер». *Нервно-мышечные болезни*. 2019; 9 (4): 44–50.
 16. Cannon EN, Yoo KH, Vanderwert RE, Ferrari PF, Woodward AL, Fox NA. Action experience, more than observation, influences mu rhythm desynchronization. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e92002.
 17. Махин С. А., Кайда А. И., Эйсмонт Е. В., Михайлова А. А., Павленко В. Б.; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», патентообладатель. Способ определения индивидуального частотного диапазона μ -ритма ЭЭГ. Патент РФ № 2702728. 09.10.2019.
 18. Raymaekers R, Wiersema JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain research*. 2009; (1304): 113–21.
 19. Lepage JF, Théoret H. EEG evidence for the presence of an action observation-execution matching system in children. *Eur J Neurosci*. 2006; 23 (9): 2505–10.
 20. Лебедева Н. Н., Каримова Е. Д., Карпычев В. В., Мальцев В. Ю. Зеркальная система мозга при наблюдении, выполнении и представлении моторных задач — нейрофизиологическое отражение восприятия чужого сознания. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2018; 68 (2): 204–15.
 21. Hummel F, Andres F, Altenmüller E, Dichgans J, Gerloff C. Inhibitory control of acquired motor programmes in the human brain. *Brain*. 2002; 125 (2): 404–20.
 22. Brown MN, Staines WR. Differential effects of continuous theta burst stimulation over left premotor cortex and right prefrontal cortex on modulating upper limb somatosensory input. *Neuroimage*. 2016; (127): 97–109.
 23. Thorpe SG, Cannon EN, Fox NA. Spectral and source structural development of mu and alpha rhythms from infancy through adulthood. *Clin Neurophysiol*. 2016; 127 (1): 254–69.
 24. Saygin AP, Stadler W. The role of appearance and motion in action prediction. *Psychol Res*. 2012; (76): 388–94.
 25. Bonini L, Rozzi S, Serventi FU, Simone L, Ferrari PF, Fogassi L. Ventral premotor and inferior parietal cortices make distinct contribution to action organization and intention understanding. *Cereb Cortex*. 2010; (20): 1372–85.
 26. Filippi CA, Cannon EN, Fox NA, Thorpe SG, Ferrari PF, Woodward AL. Motor system activation predicts goal imitation in 7-month-old infants. *Psychol Sci*. 2016; (27): 675–84.
 27. Yin J, Ding X, Xu H, Zhang F, Shen M. Social Coordination Information in Dynamic Chase Modulates EEG Mu Rhythm. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 4782.
 28. Segalowitz SJ, Santesso DL, Jetha MK. Electrophysiological changes during adolescence: a review. *Brain Cogn*. 2010; 72 (1): 86–100.

References

1. Rizzolatti G, Fogassi L. The mirror mechanism: recent findings and perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 369 (1644): 20130420.
2. Hardwick RM, Caspers S, Eickhoff SB, Swinnen SP. Neural correlates of action: Comparing meta-analyses of imagery, observation, and execution. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018; (94): 31–44.
3. Lebedeva NN, Zufman AI, Mal'cev VJu. Sistema zerkal'nyh neironov mozga: ključ k obucheniju, formirovaniju lichnosti i ponimaniu chuzhogo soznanija. *Uspehi fiziologicheskikh nauk*. 2017; 48(4): 16–28.
4. Fox NA, Bakermans-Kranenburg MJ, Yoo KH, Bowman LC, Cannon EN, Vanderwert RE, et al. Assessing human mirror activity with EEG mu rhythm: A meta-analysis. *Psychol Bull*. 2016; 142 (3): 291–313.
5. Hobson HM, Bishop DVM. Mu suppression — a good measure of the human mirror neuron system? *Cortex*. 2016; (82): 290–310.
6. Gundlach C, Muller MM, Nierhaus T, Villringer A, Sehm B. Modulation of Somatosensory Alpha Rhythm by Transcranial Alternating Current Stimulation at Mu-Frequency. *Front Hum Neurosci*. 2017; (11): 432.
7. Bimbi M, Festante F, Coude G, Vanderwert RE, Fox NA, Ferrari PF. Simultaneous scalp recorded EEG and local field potentials from monkey ventral premotor cortex during action observation and execution reveals the contribution of mirror and motor neurons to the mu-rhythm. *Neuroimage*. 2018; (175): 22–31.
8. Ulloa ER, Pineda JA. Recognition of point-light biological motion: mu rhythms and mirror neuron activity. *Behav Brain Res*. 2007; 183 (2): 188–94.
9. Oberman LM, Pineda JA, Ramachandran VS. The human mirror neuron system: a link between action observation and social skills. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2007; 2 (1): 62–66.
10. Wohlschlagel A, Gattis M, Bekkering H. Action generation and action perception in imitation: an instance of the ideomotor principle. *Philos. Trans. R Soc. Lond., B Biol Sci*. 2003; (358): 501–15.
11. Frolov AA, Bobrov PD. Interfejs mozg-komp'juter: nejrofiziologicheskie predposylki i klinicheskoe primenenie. *Zhurnal vysšej nervnoj dejatel'nosti*. 2017; 67(4): 365–376.
12. Levickaja OS, Lebedev MA. Interfejs mozg-komp'juter: budushhee v nastojashhem. *Vestnik Rossijskogo Gosudarstvennogo Medicinskogo Universiteta*. 2016; (2): 4–16.
13. Lopez-Larraz E, Escolano C, Montesano L, Minguez J. Reactivating the Dormant Motor Cortex After Spinal Cord Injury With EEG Neurofeedback: A Case Study With a Chronic, Complete C4 Patient. *Clin EEG Neurosci*. 2019; 50 (2): 100–10.
14. Liburkina SP, Vasilev AN, Kaplan AJA, Ivanova GE, Chukanova AS. Pilotnoe issledovanie ideomotornogo treninga v konture interfejsa mozg-komp'juter u pacientov s dvigatel'nymi narushenijami. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii*. 2018; 9 (2): 63–68.
15. Larina NV, Korsunskaja LL, Vlasenko SV. Kompleks «Jekzokist'-2» v rehabilitacii verhnej konechnosti pri detskom cerebral'nom paraliche s ispol'zovaniem neinvazivnogo interfejsa «mozg-komp'juter». *Nervno-myshechnye bolezni*. 2019; 9 (4): 44–50.
16. Cannon EN, Yoo KH, Vanderwert RE, Ferrari PF, Woodward AL, Fox NA. Action experience, more than observation, influences mu rhythm desynchronization. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e92002.
17. Mahin SA, Kaida AI, Eismont EV, Mihailova AA, Pavlenko VB; FGAOU VO «Krymskij federal'nyj universitet imeni V.I. Vernadskogo», patentoobladatel'. Sposob opredelenija individual'nogo chastotnogo diapazona mju-ritma JeJeG. Patent RF № 2702728. 09.10.2019.
18. Raymaekers R, Wiersema JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain*

- research. 2009; (1304): 113–21.
19. Lepage JF, Théoret H. EEG evidence for the presence of an action observation-execution matching system in children. *Eur J Neurosci.* 2006; 23 (9): 2505–10.
 20. Lebedeva NN, Karimova ED, Karpichev VV, Malcev VJu. Zerkal'naja sistema mozga pri nabljudenii, vypolnenii i predstavlenii motornykh zadach — nejrofiziologicheskoe otrazhenie vospriyatija chuzhogo soznaniya. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti.* 2018; 68 (2): 204–15.
 21. Hummel F, Andres F, Altenmüller E, Dichgans J, Gerloff C. Inhibitory control of acquired motor programmes in the human brain. *Brain.* 2002; 125 (2): 404–20.
 22. Brown MN, Staines WR. Differential effects of continuous theta burst stimulation over left premotor cortex and right prefrontal cortex on modulating upper limb somatosensory input. *Neuroimage.* 2016; (127): 97–109.
 23. Thorpe SG, Cannon EN, Fox NA. Spectral and source structural development of mu and alpha rhythms from infancy through adulthood. *Clin Neurophysiol.* 2016; 127 (1): 254–69.
 24. Saygin AP, Stadler W. The role of appearance and motion in action prediction. *Psychol Res.* 2012; (76): 388–94.
 25. Bonini L, Rozzi S, Serventi FU, Simone L, Ferrari PF, Fogassi L. Ventral premotor and inferior parietal cortices make distinct contribution to action organization and intention understanding. *Cereb Cortex.* 2010; (20): 1372–85.
 26. Filippi CA, Cannon EN, Fox NA, Thorpe SG, Ferrari PF, Woodward AL. Motor system activation predicts goal imitation in 7-month-old infants. *Psychol Sci.* 2016; (27): 675–84.
 27. Yin J, Ding X, Xu H, Zhang F, Shen M. Social Coordination Information in Dynamic Chase Modulates EEG Mu Rhythm. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 4782.
 28. Segalowitz SJ, Santesso DL, Jetha MK. Electrophysiological changes during adolescence: a review. *Brain Cogn.* 2010; 72 (1): 86–100.

ИЗМЕНЕНИЕ СУТОЧНОГО РИТМА СОДЕРЖАНИЯ ИНГИБИРУЮЩЕГО ЛЕЙКЕМИЮ ФАКТОРА В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

О. А. Радаева¹✉, А. С. Симбирцев², Е. В. Громова¹, М. С. Искандярова¹, С. В. Беляева³

¹ Медицинский институт Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева, Саранск, Россия

² Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³ Санаторно-курортный комплекс «Северокавказский», Пятигорск, Россия

Ингибирующий лейкемию фактор (LIF) обладает неоднозначными физиологическими эффектами при эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ). Опровергается постулат об идентичности STAT3-сигнализации в клетках миокарда и эндотелиальных/гладкомышечных клетках, что значимо при длительном воздействии цитокинов-лигандов gp 130 (в частности LIF). При этом отсутствуют данные о суточных характеристиках содержания LIF в крови с потенциальными вторичными изменениями его патофизиологических эффектов. Целью исследования было проанализировать особенности суточных ритмов содержания LIF в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии, определенного в пяти временных точках в зависимости от применения гипотензивной терапии и частоты развития осложнений в последующие 5 лет наблюдения. У 60 больных ЭАГ II стадии иммуноферментным методом определяли уровни LIF в сыворотке периферической крови в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00, 8.00 ч до и после года гипотензивной терапии. Выявленные закономерности суточного ритма содержания LIF в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии в виде увеличения в 20.00 ч на 15% ($p < 0,001$) и выше с максимальным ростом в 2.00 ч на 22% ($p < 0,001$) и более при сравнении с индивидуальным уровнем в 8.00 ч можно характеризовать как патологические, а их сохранение после года гипотензивной терапии служит признаком прогрессивного течения гипертензии с повышением риска развития сердечно-сосудистых осложнений (инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения) в 6 раз.

Ключевые слова: LIF, ингибирующий лейкемию фактор, суточный ритм цитокинов, эссенциальная гипертензия

Вклад авторов: О. А. Радаева — разработка дизайна исследования, анализ результатов, формулировка выводов, оформление рукописи; А. С. Симбирцев — формулирование цели исследования, корректирование выводов и итогового варианта рукописи; Е. В. Громова — разработка дизайна исследования, проведения лабораторного этапа исследования, оформление рукописи; М. С. Искандярова — работа с литературой, контроль забора материала, динамическое наблюдение за пациентами, работа над первым вариантом рукописи; С. В. Беляева — работа с литературой, контроль забора материала и участие в наблюдении за пациентами.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева (протокол № 12 от 14 декабря 2008 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Получение биологического материала для исследования (кровь) производили с учетом положений Хельсинской декларации ВМА (2008 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999) с учетом дополнительного протокола к Конвенции по правам человека и биомедицине в области биомедицинских исследований (2005).

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Радаева
ул. Ульянова, д. 26а, г. Саранск, 430000; vtlbwbyf_79@mail.ru

Статья получена: 11.03.2020 **Статья принята к печати:** 25.03.2020 **Опубликована онлайн:** 28.03.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.017

CIRCADIAN RHYTHMS OF LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION

Radaeva OA¹✉, Simbirtsev AS², Gromova EV¹, Iskandiarova MS¹, Belyaeva SV³

¹ Institute of Medicine, National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

² State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, Saint Petersburg, Russia

³ North Caucasus Health Center, Pyatigorsk, Russia

Leukemia inhibitory factor (LIF) exerts multidirectional effects in the setting of essential hypertension (EH). There is a mounting body of evidence refuting the postulate about identical STAT3 signaling in cardiomyocytes and endothelial/smooth muscle cells, which is important in the situation of extended exposure to gp 130 ligands (LIF in particular). At the same time, there are no reports on the circadian dynamics of peripheral blood LIF concentrations and possible secondary changes to the pathophysiological effects of this cytokine. This study aimed to analyze the circadian dynamics of LIF concentrations in the peripheral blood serum measured at 5 different time points in patients with stage II EH in the presence/absence of antihypertensive therapy and their relationship with the frequency of complications developing within a 5-year follow-up. Blood serum LIF was measured in 60 patients with stage II EH using ELISA at 8:00, 14:00, 20:00, 2:00, and 8:00 o'clock before putting the patients on antihypertensive therapy and one year after its onset. The identified patterns of diurnal LIF concentrations (a rise by $\geq 15\%$ at 20:00, $p < 0.001$; a further rise by $\geq 22\%$ peaking at 2:00, $p < 0.001$ relative to the values at 8:00) can be regarded as pathologic; their persistence after one year of antihypertensive therapy is a sign of EH progression and puts the patients at 6-fold risk for cardiovascular complications, including myocardial infarction and acute cerebrovascular events.

Keywords: LIF, leukemia inhibitory factor, cytokine circadian rhythms, essential hypertension

Author contribution: Radaeva OA designed the study, analyzed the results, formulated the conclusions and wrote the manuscript; Simbirtsev AS formulated the objective of the study, revised its conclusions and the manuscript itself; Gromova EV designed the study, carried out laboratory tests, and contributed to writing the manuscript; Iskandiarova MS analyzed the literature, supervised blood collection, followed up with the patients, contributed to writing the manuscript; Belyaeva SV analyzed the literature, supervised blood collection, followed up with the patients.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of National Research Mordovia State University (Protocol No. 12 dated December 14, 2008). Written informed consent was obtained from all study participants. Blood samples were collected in compliance with the Declaration of Helsinki (2008), the protocol of European Convention on Human Rights and Biomedicine (1999) and the additional protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine concerning Biomedical Research (2005).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Radaeva
Ulianova, 26a, Saransk, 430000; vtlbwbyf_79@mail.ru

Received: 11.03.2020 **Accepted:** 25.03.2020 **Published online:** 28.03.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.017

Ингибирующий лейкемию фактор (LIF) обладает разнообразными физиологическими эффектами за счет локализации специфичных рецепторов LIF на мембранах эндотелиоцитов, моноцитов, нейронов и др. [1], в физиологически значимых количествах [2]. Сигнальный путь LIF через JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), MAPK (mitogen-activated protein kinases) и PI3K (phosphoinositide-3-kinases) является стабильным, но реализует противоположные эффекты действия в различных типах клеток, включая и стимулирование, и блокирование дифференцировки и выживания этих клеток. Вызывают дискуссию результаты о влиянии LIF на стенку сосудов при эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ), так как механизм активации STAT3 редокс-зависим [3] и меняет вектор при хроническом повышении АД, искажая эффекты LIF. Опровергается постулат об идентичности STAT3-сигналикации в клетках миокарда и эндотелиальных/гладкомышечных клетках, что значимо при длительном воздействии цитокинов-лигандов $gr\ 130$ (в частности LIF) [4]. Ряд научных направлений демонстрирует зависимость компонентов прогрессирования ЭАГ, формирования осложнений от времени суток [5], доказывая значимость научного поиска не только количественных изменений цитокинов, но и вариантов их суточных ритмов синтеза.

Целью исследования было проанализировать особенности суточных ритмов содержания LIF в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии, измеренного в пяти временных точках (8.00, 14.00, 20.00, 2.00 и 8.00 ч), в зависимости от применения гипотензивной терапии и частоты развития осложнений в последующие 5 лет наблюдения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В рамках исследования на тему «Цитокины в патогенезе ЭАГ», выполненного в период с 2008 по 2019 г. на базе Медицинского института НИ МГУ им. Н. П. Огарева, Регионального сосудистого центра ГБУЗ РМ «Республиканская клиническая больница № 4», в 2014 г. сформирована дополнительная группа из 60 больных ЭАГ II стадии (30 мужчин, 30 женщин) для изучения в течение суток изменения содержания LIF в сыворотке крови.

Таблица 1. Содержание LIF (пг/мл) в сыворотке периферической крови больных ЭАГ II стадии в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00 и 8.00 ч (следующие сутки) в зависимости от применения гипотензивных препаратов и развития сердечно-сосудистых осложнений в следующие 5 лет наблюдения (Me (Q25%–Q75%))

Группы		8.00 (первые сутки)	14.00 (первые сутки)	20.00 (первые сутки)	2.00 (вторые сутки)	8.00 (вторые сутки)
Больные ЭАГ (до терапии) $n = 60$ (человек)	<i>a</i>	7,51 [6,58–8,34]	7,58 [6,47–8,41]	9,02 [7,52–9,73] *8.00, 14.00	10,1 [9,44–11,8] *8.00, 14.00, 20.00	7,53 [6,65–8,22] *20.00, 2.00
Группа сравнения (здоровые), $n = 30$	<i>b</i>	1,41 [1,02–1,83]	1,38 [1,04–1,79]	1,45 [1,06–1,78]	1,42 [1,03–1,81]	1,37 [0,99–1,79]
		$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) < 0,001$
Больные ЭАГ (после года терапии), $n = 60$, из них:	<i>c</i>	7,54 [6,57–8,38]	7,61 [6,53–8,44]	8,95 [7,63–9,58] *8.00, 14.00	7,62 [6,84–8,63] *8.00 *20.00	7,58 [6,62–8,31] *20.00
		$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) < 0,001$	$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) < 0,001$	$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) < 0,001$	$p(c-a) < 0,001$ $p(c-b) < 0,001$	$p(c-a) < 0,05$ $p(c-b) < 0,001$
Следующие 5 лет наблюдения — ИМ, ОНМК, $n = 15$	<i>c1</i>	7,66 [6,68–8,22]	7,59 [6,49–8,37]	9,01 [7,56–9,61] *8.00, 14.00	9,69 [8,91–9,98] *8.00, 14.00, 20.00	7,72 [6,71–8,17] *20.00, 2.00
Следующие 5 лет — без осложнений, $n = 45$	<i>c2</i>	7,58 [6,52–8,41]	7,62 [6,5–8,42]	8,79 [7,98–9,62] *8.00, 14.00	7,55 [6,93–8,21] *20.00	7,36 [6,51–8,24] *20.00
		$p(c2-c1) > 0,05$	$p(c2-c1) > 0,05$	$p(c2-c1) > 0,05$	$p(c2-c1) < 0,001$	$p(c2-c1) > 0,05$

Примечание: достоверно при сравнении с указанным временем забора крови или группой (*a*, *b*, *c*, *c1*, *c2*); * — $p < 0,001$; ^ — $p < 0,01$; ' — $p < 0,05$. Для сравнения результатов в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00 и 8.00 ч внутри группы больных ЭАГ II стадии до терапии — парный *t*-критерий Стьюдента, внутри групп «после года терапии» и здоровых (группа сопоставления) — критерий Уилкоксона, между независимыми группами — критерий Манна-Уитни и между зависимыми группами — критерий Уилкоксона.

Критерии включения пациентов в исследование: ЭАГ II стадии, 1955–1956 год рождения, анамнез заболевания 10–14 лет; отсутствие гипотензивной терапии в начале исследования, наличие сопоставимой терапии в течение следующего года (и-АПФ ± диуретик) с достижением «целевого» уровня АД (в соответствии с российскими рекомендациями «Диагностика и лечение артериальной гипертензии», 2010) [6]; уровни общего холестерина менее 5,0 ммоль/л, ЛПНП менее 3,0 ммоль/л, ЛПВП более 1,0 ммоль/л, триглицеридов менее 1,7 ммоль/л, глюкозы менее 5,5 мг/дл, ИМТ менее 30 кг/м²; сопоставимый риск развития осложнений ЭАГ. Критерии исключения: наличие ассоциированных клинических состояний; сахарный диабет 1-го или 2-го типов, аутоиммунные, аллергические заболевания, симптоматическая артериальная гипертензия. Группа сопоставления — условно здоровые 30 человек (15 мужчин, 15 женщин) с САД от 100 до 130 мм рт. ст. и ДАД 70–89 мм рт. ст., сопоставимые по возрасту и основным биохимическим параметрам с пациентами группы наблюдения.

Забор крови (по 2 мл) проводили до начала гипотензивной терапии (2014 г.) и через год терапии (2015 г.) в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00, 8.00 (интервал без приема пищи составлял не менее 6 ч). Временные отрезки были выбраны на основе данных пилотного исследования, включающего забор крови в 7.00, 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00, 00.00, 2.00, 4.00, 6.00, 7.00, 8.00 у 7 человек. Время от забора крови до замораживания сыворотки составляло 60 мин. Определение LIF в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом с использованием тест-систем (Bender MedSystems; США).

С 2014 по 2019 г. проводили ежегодный телефонный опрос участников исследования для регистрации осложнений (инфаркт миокарда (ИМ), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), транзиторное нарушение мозгового кровообращения (ТНМК)) в период наблюдения с последующим подтверждением диагноза на основе данных истории болезни: клинических и диагностических (ЭКГ, ЭХО-КГ, теста на уровень тропонина, данных компьютерной томографии головного мозга).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10.0 (Stat Soft; США). Нормальность распределения

показателей определяли с помощью одновыборочного критерия Колмагорова–Смирнова, что обосновало использование для сравнения результатов, полученных в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00, 8.00 ч внутри группы больных ЭАГ II стадии до терапии, парного *t*-критерия Стьюдента, внутри группы «после года терапии» и здоровых (группа сопоставления) — критерия Уилкоксона, между группами — критериев Манна–Уитни (при независимых выборках) и Уилкоксона (зависимые выборки). Данные представлены в виде медианы (Me) и перцентилей (Q0,25–Q0,75). При разделении групп на подгруппы использовали поправку Бонферрони для множественных сравнений, что подтвердило корректность приведенных в статье данных статистического анализа. Рассчитывали абсолютный и относительный риски развития ИМ, ОНМК с определением 95%-го ДИ, чувствительности и специфичности. Проводили анализ с использованием точного критерия Фишера (двустороннего) ϕ , нормированного значения коэффициента Пирсона (C').

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У больных ЭАГ II стадии при длительности заболевания 10–14 лет без приема гипотензивных препаратов при сравнении со здоровыми (группа сопоставления) зарегистрированы достоверные количественные и качественные различия суточного ритма содержания LIF в сыворотке периферической крови. Уровни LIF у пациентов с ЭАГ II стадии в 8.00, 14.00, 20.00 и 2.00 в 5–7,5 раза выше ($p < 0,001$), чем у лиц без ЭАГ (табл. 1). Значимым является рост LIF у больных ЭАГ в 20.00 (на 20,1% (16,7–24,3%); $p < 0,001$), с максимумом в 2.00 (увеличение на 34% (25,7–43%); $p < 0,001$), при сравнении с результатами данной группы, полученными в 8.00. Важно отметить, что в группе здоровых не зарегистрировано ($p > 0,05$) динамики

показателей в 14.00, 20.00 и 2.00 при сопоставлении с концентрациями в 8.00. После приема гипотензивных препаратов в течение года и достижения целевого уровня АД в соответствии с клиническими рекомендациями РФ (2010) у пациентов не было зарегистрировано снижения LIF в сыворотке крови в 8.00, 14.00, 20.00 ч при сравнении с периодом до терапии ($p < 0,01$), но изменялась суточная динамика содержания цитокина. На фоне гипотензивной терапии с достижением «целевого» АД максимальный рост LIF был зарегистрирован в 20.00, но со снижением в 2.00 (табл. 2), в отличие от периода до терапии. При этом распределение показателей в группе больных на фоне терапии отличалось от распределения Гаусса–Лапласа, что актуализировало анализ индивидуальных суточных графиков больных этой категории для выявления критерия неоднородности. Было выявлено, что 22 пациента, принимающих гипотензивные препараты и достигших целевого АД, сохранили суточные ритмы содержания LIF в крови, характерные для этапа «до гипотензивной терапии» (рост в 20.00 с максимумом в 2.00 и восстановлением уровней в 8.00) (см. табл. 2).

Анализ катмнеза группы на фоне гипотензивной терапии и частичного восстановления суточных закономерностей LIF (снижение в 2.00) показал, что из 42 пациентов только у 4 больных в течение последующих 5 лет развились ОНМК, ИМ (абсолютный риск осложнений составил 9,5% (0,63–18,4%). В группе с сохранением «патологического» суточного ритма содержания LIF в крови (рост в 20.00, пик в 2.00 с восстановлением утренних показателей в 8.00) — у 11 человек из 18 зарегистрированы осложнения (ОНМК, ИМ) — абсолютный риск равен 61,1% (38,6–83,6%). Отношение рисков двух групп составило 6,41 (2,35–17,5%), специфичность — 0,84, чувствительность — 0,73, ϕ — 0,0000 ($p < 0,05$), C' — 0,67 (связь очень сильная).

Таблица 2. Процент отклонения уровней LIF (пг/мл) в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии в 14.00, 20.00, 2.00 и 8.00 ч (следующие сутки) от концентрации в 8.00 ч (первые сутки наблюдения) в зависимости от применения гипотензивной терапии и развития осложнений в следующие 5 лет наблюдения (Me (Q25%–Q75%))

Группы		8.00 (первые сутки)	14.00 (первые сутки)	20.00 (первые сутки)	8.00 (вторые сутки)
Больные ЭАГ (до терапии), $n = 60$	<i>a</i>	0,91 [–1,67–2,54]	20,1 [16,7–24,3] *14.00	34 [25,7–33] *14.00, 20.00	1,06 [–1,05–3,65] *20.00, 2.00
Группа сравнения (здоровые), $n = 30$	<i>b</i>	–1,08 [–2,03–1,19]	2,81 [1,93–3,22]	0,98 [–0,13–2,03]	1,03 [–1,72–2,56]
		$p(b-a) > 0,05$	$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) < 0,001$	$p(b-a) > 0,05$
Больные ЭАГ (после года терапии), $n = 60$, из них:	<i>c</i>	0,93 [–0,61–2,03]	18,9 [15,9–24,1] *14.00	6,32 [2,08–14,4] *14.00, 20.00	0,76 [–0,45–2,21] *20.00, 2.00
		$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) > 0,05$	$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) < 0,001$	$p(c-a) < 0,001$ $p(c-b) < 0,05$	$p(c-a) > 0,05$ $p(c-b) > 0,05$
Следующие 5 лет наблюдения — ИМ, ОНМК, $n = 15$	<i>c1</i>	–0,91 [–2,83–1,8]	19,9 [15,1–23,8] *14.00	26,5 [22,3–28,1] *14.00, 20.00	0,22 [–1,35–2,33] *20.00, 2.00
		$p(c1-a) > 0,05$ $p(c1-b) > 0,05$	$p(c1-a) > 0,05$ $p(c1-b) < 0,001$	$p(c1-a) > 0,05$ $p(c1-b) < 0,001$	$p(c1-a) > 0,05$ $p(c1-b) > 0,05$
Следующие 5 лет — без осложнений, $n = 45$	<i>c2</i>	0,52 [–0,47–1,67]	18,1 [14,8–23,8] *14.00	2,29 [–0,35–5,44] *14.00 *20.00	0,92 [–0,62–2,13] *20.00, 2.00
		$p(c2-c1) > 0,05$ $p(c2-b)$ $> 0,05$ $p(c2-a) > 0,05$	$p(c2-c1) > 0,05$ $p(c2-b)$ $< 0,001$ $p(c2-a) > 0,05$	$p(c2-c1) < 0,001$ $p(c2-b) < 0,05$ $p(c2-a) < 0,001$	$p(c2-c1) > 0,05$ $p(c2-b) > 0,05$ $p(c2-a) > 0,05$

Примечание: достоверно при сравнении с указанным временем забора крови или группой (*a*, *b*, *c*, *c1*, *c2*). * — $p < 0,001$; ^ — $p < 0,01$; ' — $p < 0,05$. Для сравнения результатов в 8.00, 14.00, 20.00, 2.00 и 8.00 ч внутри группы больных ЭАГ II стадии до терапии — парный *t*-критерий Стьюдента, внутри групп «после года терапии» и здоровых (группа сопоставления) — критерий Уилкоксона, между независимыми группами — критерий Манна–Уитни и между зависимыми группами — критерий Уилкоксона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в рамках исследования данные о повышении содержания LIF в сыворотке периферической крови у больных ЭАГ II стадии по сравнению со здоровыми лицами могут иметь патогенетическое объяснение, обоснованное нарушением процесса интегрирования сигналов LIFR/CD118 и gp130 на фоне окислительного стресса при ЭАГ, что сказывается на каталитической активности JAK [7] и может стимулировать образование LIF. Зарегистрированный рост в 20.00 с динамическим увеличением в 2.00 у лиц до приема гипотензивных препаратов, а у части пациентов и на фоне терапии с достижением «целевого» АД патогенетически значим, так как есть сообщения, что в эндотелиоцитах LIF-зависимая стимуляция STAT3 запускает воспалительный каскад [8] с активацией системы IL1, что в вечернее (20.00) и ночное (2.00) время на фоне снижения активности провоспалительных компонентов (IL1ra, IL10) будет более выражено стимулировать прогрессирование ЭАГ через активацию протеинаргининметилтрансферазы и торможения диметиларгинина с последующим дисбалансом в системе синтеза NO. По нашим данным [9], у пациентов с ЭАГ на фоне увеличения LIF более 7,5 пг/мл определен рост индекса массы миокарда левого желудочка со снижением фракции укороченных средних волокон и достоверной связью с формированием выраженной гипертрофии миокарда левого желудочка концентрического типа. Зарегистрированный патофизиологический процесс позволил выдвинуть гипотезу о повышении риска развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с сохранением роста LIF в период с 20.00 до 2.00 на фоне терапии, которая подтвердилась в ходе нашего исследования. LIF-индуцированная кардиальная гипертрофия может характеризоваться ранним снижением сократительной способности миокарда (из-за трансмурального изменения кардиомиоцитов) [10, 11].

При этом на начальных этапах патологического процесса повышение LIF является компенсаторно-приспособительным механизмом, стимулирующим сократимость кардиомиоцитов через усиление активности T-зависимых Ca^{2+} -каналов [12]. Кроме того, такое повышение обладает потенциальными протективными эффектами в отношении воспалительной потери аксонов и способствует выживанию олигодендроцитов путем увеличения экспрессии IGF-1 (инсулиноподобного фактора роста 1) [13]. Однако дальнейший рост с суточными перепадами содержания в крови, зарегистрированный в нашем исследовании, по экспериментальным данным, способствует развитию неблагоприятных форм течения ЭАГ II стадии с потенциальным повреждением миокарда и головного мозга.

ВЫВОДЫ

Выявленные закономерности суточного ритма содержания LIF в крови больных ЭАГ II стадии в виде увеличения в 20.00 на 15% и более с максимальным ростом в 2.00 ч на 22% и выше при сравнении с индивидуальным уровнем в 8.00 ч можно характеризовать как «патологические», а их сохранение на фоне гипотензивной терапии расценивать в качестве потенциального фактора прогрессирования течения гипертензии с повышением риска развития сердечно-сосудистых осложнений, несмотря на клинически благоприятное течение заболевания с достижением «целевого» АД. Представленные данные открывают перспективы дальнейшего изучения роли LIF с целью максимальной персонализации аналитических заключений изменения цитокина. Индивидуальный анализ суточных ритмов содержания в крови цитокинов, в частности LIF, является кандидатным диагностическим подходом для оценки скрытого прогрессирования заболевания при нормализации АД у пациента с эссенциальной гипертензией.

Литература

- Mathieu M-E, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Theze N, Praloran V, et al. LIF-Dependent Signaling: New Pieces in the Lego. *Stem Cell Rev.* 2012; 8 (1): 1–15.
- Nicola NA, Babon JJ. Leukemia Inhibitory Factor (LIF). *Cytokine & growth factor reviews.* 2015; 26 (5): 533–44.
- Wu J, Xia S, Kalionis B, Wan W, Sun T. The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Aging. *BioMed Research International.* [Internet] 2014: 615312. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014>.
- González GE, Rhaleb N-E, D'ambrosio MA, Nakagawa P, Liu Y, Leung P, Dai X, Yang XP, Peterson EL, Carretero OA. Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2015; (33): 144–52.
- Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, Chinnappareddy N, Podobed P, Reitz C, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016; 311 (6): 1243–1254.
- Чазова И. Е., Ратова Л. Г., Бойцов С. А., и др. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Системные гипертензии. 2010; (3): 5–26.
- Zgheib C, Zouein FA, Kurdi M, Booz GW. Differential STAT3 Signaling in the Heart: Impact of Concurrent Signals and Oxidative Stress. *JAK-STAT.* 2012; 1 (2): 101–10.
- Fujio Y, Maeda M, Mohri T, Obana M, Iwakura T, Hayama A, et al. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci.* 2011; 117 (4): 213–22.
- Радаева О. А., Симбирцев А. С. Изменение уровня фактора, ингибирующего лейкемию, в сыворотке периферической крови связано с прогрессированием эссенциальной артериальной гипертензии. *Медицинский академический журнал.* 2015; 15 (1): 34–42.
- Zouein FA, Kurdi M, Booz GW. Dancing rhinos in stiletos: The amazing saga of the genomic and nongenomic actions of STAT3 in the heart. *JAKSTAT.* 2013; 2 (3): 101–10.
- Jia D, Cai M, Xi Y, Du S, Zhenjun T. Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Life Sci.* 2018; (193): 77–86.
- Dey D, Shepherd A, Pachau J, Migue M. Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca^{2+} channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300 (3): 576–87.
- Xu L, Long J, Shi C, Zhang N, Lv Y, Feng J, et al. Effect of leukocyte inhibitory factor on neuron differentiation from human induced pluripotent stem cell-derived neural precursor cells. *Int J Mol Med.* 2018; 41 (4): 2037–49. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3418>.

References

1. Mathieu M-E, Saucourt C, Mournetas V, Gauthereau X, Theze N, Praloran V, et al. LIF-Dependent Signaling: New Pieces in the Lego. *Stem Cell Rev.* 2012; 8 (1): 1–15.
2. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia Inhibitory Factor (LIF). *Cytokine & growth factor reviews.* 2015; 26 (5): 533–44.
3. Wu J, Xia S, Kalionis B, Wan W, Sun T. The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Aging. *BioMed Research International.* [Internet] 2014: 615312. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014>.
4. González GE, Rhaleb N-E, D'ambrosio MA, Nakagawa P, Liu Y, Leung P, Dai X, Yang XP, Peterson EL, Carretero OA. Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2015; (33): 144–52.
5. Bennardo M, Alibhai F, Tsimakouridze E, Chinnappareddy N, Podobed P, Reitz C, et al. Day-night dependence of gene expression and inflammatory responses in the remodeling murine heart post-myocardial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016; 311 (6): 1243–1254.
6. Chazova IE, Ratova LG, Bojcov SA, i dr. Diagnostika i lechenie arteria'noj gipertonii. *Sistemnye gipertenzii.* 2010; (3): 5–26. Russian.
7. Zgheib C, Zouein FA, Kurdi M, Booz GW. Differential STAT3 Signaling in the Heart: Impact of Concurrent Signals and Oxidative Stress. *JAK-STAT.* 2012; 1 (2): 101–10.
8. Fujio Y, Maeda M, Mohri T, Obana M, Iwakura T, Hayama A, et al. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci.* 2011; 117 (4): 213–22.
9. Radaeva OA, Simbirtsev AS. Izmenenie urovnya faktora, ingibiruyushchego lejkemiyu, v syvorotke perifericheskoy krovi svyazano s progressirovaniem essencialnoj arterialnoj gipertenzii. *Meditsinskij akademicheskij zhurnal.* 2015; 15 (1): 34–42. Russian.
10. Zouein FA, Kurdi M, Booz GW. Dancing rhinos in stiletos: The amazing saga of the genomic and nongenomic actions of STAT3 in the heart. *JAKSTAT.* 2013; 2 (3): 101–10.
11. Jia D, Cai M, Xi Y, Du S, Zhenjun T. Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats. *Life Sci.* 2018; (193): 77–86.
12. Dey D, Shepherd A, Pachau J, Migue M. Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300 (3): 576–87.
13. Xu L, Long J, Shi C, Zhang N, Lv Y, Feng J, et al. Effect of leukocyte inhibitory factor on neuron differentiation from human induced pluripotent stem cell-derived neural precursor cells. *Int J Mol Med.* 2018; 41 (4): 2037–49. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3418>.

МЕДИКАМЕНТОЗНАЯ ПРОФИЛАКТИКА САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА: ЭФФЕКТИВНОСТЬ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ НАБЛЮДЕНИИ

В. В. Боева¹✉, А. Н. Завьялов²

¹ Федеральный клинический центр высоких медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Химки, Московская область, Россия

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

Актуальность профилактики сахарного диабета (СД) 2-го типа у пациентов с предиабетом увеличивается из-за неуклонного распространения заболевания. Целью работы было оценить эффективность медикаментозной профилактики в замедлении темпов конверсии впервые выявленных нарушенной толерантности к глюкозе и нарушенной гликемии натощак (НТГ/НГН) в СД 2-го типа. Участникам исследования (1136 человек), считавшимся здоровыми после диспансеризации, повторно провели скрининг СД 2-го типа с соблюдением правил преаналитической подготовки образцов крови. Пациентам с впервые выявленными НТГ/НГН была назначена терапия метформином и/или акарбозой, частоту конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа оценивали через 3 и 10 лет наблюдения. У 18,5% ($n = 210$) обследованных выявили различные категории нарушения углеводного обмена: СД 2-го типа — у 5,0%, НТГ — у 5,5%, НГН — у 8,0%. Пациентам с впервые выявленным СД 2-го типа была назначена сахароснижающая терапия, они были исключены из последующего наблюдения. Пациентам с НТГ/НГН ($n = 151$) рекомендовали изменение образа жизни и назначили терапию метформином (77%) или метформином и акарбозой (23%). Частота конверсии СД 2-го типа в течение 3 лет активного наблюдения составила 6,8% на фоне монотерапии метформином и 11,4% — на фоне комбинированной терапии метформином и акарбозой. По окончании периода активного наблюдения большинство пациентов ($n = 85$) самостоятельно прекратили терапию. Частота конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа через 10 лет после окончания активного наблюдения в группе без медикаментозной профилактики составила 38,8% и 0% — в группе принимающих метформин ($p < 0,01$). Показано, что длительное применение метформина предупредило развитие СД 2-го типа в отдаленном периоде у 83,3% ($p < 0,05$).

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, нарушенная гликемия натощак, нарушенная толерантность к глюкозе, скрининг, метформин, акарбоза, профилактика, глюкоза венозной плазмы натощак

Вклад авторов: В. В. Боева — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. Н. Завьялов — анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 176 от 25 июня 2018 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Валентина Владимировна Боева
ул. Ивановская, д. 15А, г. Химки, Московская область, 141435; boevaVV@yandex.ru

Статья получена: 09.01.2020 **Статья принята к печати:** 08.02.2020 **Опубликована онлайн:** 06.03.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.014

PREVENTIVE PHARMACOTHERAPY OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN PATIENTS WITH EARLY CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS: LONG-TERM EFFICACY AND CLINICAL OUTCOMES

Boeva VV¹✉, Zavyalov AN²

¹ Federal Clinical Center of High Medical Technologies, FMBA, Khimki, Moscow region, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Prevention of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in prediabetic patients is a pressing concern due to its increasing prevalence. The aim of this study was to evaluate the efficacy of preventive pharmacotherapy in delaying progression of incident impaired glucose tolerance (IGT) and impaired fasting glycemia (IFG) to T2DM. The participants of the study (1,136 subjects) found healthy by a regular annual checkup underwent repeat screening for T2DM. Blood samples were processed following the guidelines for good preanalytical sample preparation. Patients with incident IGT/IFG were prescribed medication therapy with metformin or/and acarbose. The rate of IGT/IFG conversion to T2DM was evaluated in years 3 and 10 of observation. Carbohydrate metabolism disorders were detected in 18.5% ($n = 210$) of the re-screened patients: 5.0% had T2DM, 5.5% had IGT, 8.0% had IFG. Patients with incident T2DM were prescribed blood sugar lowering therapy and they were excluded from further analysis. Patients with IGT/IFG ($n = 151$) were given recommendations on lifestyle modification and prescribed metformin (77%) or a combination of metformin and acarbose (23%). Three years after the start of observation, the rate of conversion to T2DM was 6.8% in patients undergoing monotherapy with metformin and 11.4% in patients undergoing combination therapy with metformin and acarbose. After the active follow-up phase was over, the majority of the patients ($n = 85$) decided to discontinue preventive therapy without consulting their physicians. Ten years after the active follow-up phase, the rate of NGT/IFG conversion to T2DM was 38.8% in patients who had discontinued their treatment and 0% in patients still taking metformin ($p < 0.01$). Long-term therapy with metformin prevented progression to T2DM in the long run in 83.3% ($p < 0.05$).

Keywords: type 2 diabetes mellitus, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, screening, metformin, acarbose, prevention, fasting plasma glucose

Author contribution: Boeva VV planned the study; analyzed the literature; collected, analyzed and interpreted study results; wrote the manuscript; Zavyalov AN analyzed the literature; analyzed and interpreted study results; wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 176 dated June 25, 2018). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentina V. Boeva
Ivanovskaya, 15A, Khimki, Moscow region, 141435; boevaVV@yandex.ru

Received: 09.01.2020 **Accepted:** 08.02.2020 **Published online:** 06.03.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.014

Сахарный диабет (СД) 2-го типа — важнейшее социально значимое заболевание, характеризующееся высокой и постоянно растущей распространенностью, повышением риска инвалидизации и ранней смертности. В России на январь 2018 г. зарегистрировано 4,1 млн больных СД 2-го типа [1, 2]. Однако результаты контрольно-эпидемиологических исследований свидетельствуют, что реальное число больных в России может составлять не менее 8 млн человек. Экстраполяция результатов исследования NATION на всех жителей РФ позволяет предполагать, что около 20,7 млн человек имеют недиагностированный предиабет [3] и, следовательно, не получают необходимые рекомендации и терапию.

В настоящее время пациенты с нарушенной толерантностью к глюкозе и нарушенной гликемией натощак (НТГ/НГН) не подлежат обязательному учету, их диспансерное наблюдение не ведется, в связи с чем реальная распространенность предиабета изучена недостаточно.

Главная причина несвоевременной диагностики СД 2-го типа и ранних стадий нарушений углеводного обмена — нарушение правил преаналитической подготовки образцов крови, направленных на подавление гликолиза. Именно гликолиз в форменных элементах крови, находящейся в пробирке после ее забора у пациента, приводит к снижению уровня глюкозы в образце и занижает конечный результат. Таким образом, у части лиц с нарушениями углеводного обмена (в нашем исследовании — 18,5%) во время скрининга выявляют нормальные показатели глюкозы, и данная группа пациентов не попадает под наблюдение врачей.

Врачи первичного звена не всегда придают должное значение выявленным НГН/НТГ. По этой причине советы по изменению образа жизни нередко носят формальный характер, медикаментозную профилактику не назначают, а приверженность пациентов к рекомендациям оказывается низкой. К настоящему времени эффективность медикаментозного лечения лиц с предиабетом подтверждена в многочисленных исследованиях [4–7] и метаанализах [8].

На сегодняшний день необходимы активное выявление ранних форм нарушений углеводного обмена и их коррекция. Целью работы было в условиях реальной клинической практики оценить эффективность медикаментозной профилактики в замедлении темпов конверсии впервые выявленных НТГ/НГН в СД 2-го типа в отдаленном периоде.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

В исследовании приняли участие 1136 взрослых пациентов, проживающих в Тамбовской области, обратившихся в Тамбовскую ЦРБ в рамках программы дополнительной диспансеризации в 2007 г. Все пациенты считались здоровыми после проведенной плановой диспансеризации. Критерии включения пациентов в исследование: отсутствие нарушений углеводного обмена в анамнезе; отсутствие сахароснижающей терапии в анамнезе. Критерии исключения: выявление по результатам скрининга СД 1-го или 2-го типов.

Этапы исследования

1. Скрининг на наличие нарушений углеводного обмена у лиц, которых считали здоровыми после проведенной плановой диспансеризации, медикаментозная профилактика СД 2-го типа при наличии показаний, оценка частоты конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа и нормогликемии в течение трех лет активного наблюдения. 2. Оценка долгосрочных исходов: частоты конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа и нормогликемии через 10 лет после окончания периода активного наблюдения (рис. 1).

Первый этап следует рассматривать как нерандомизированное сплошное проспективное интервенционное исследование, второй этап — нерандомизированное ретроспективное наблюдательное контролируемое исследование.

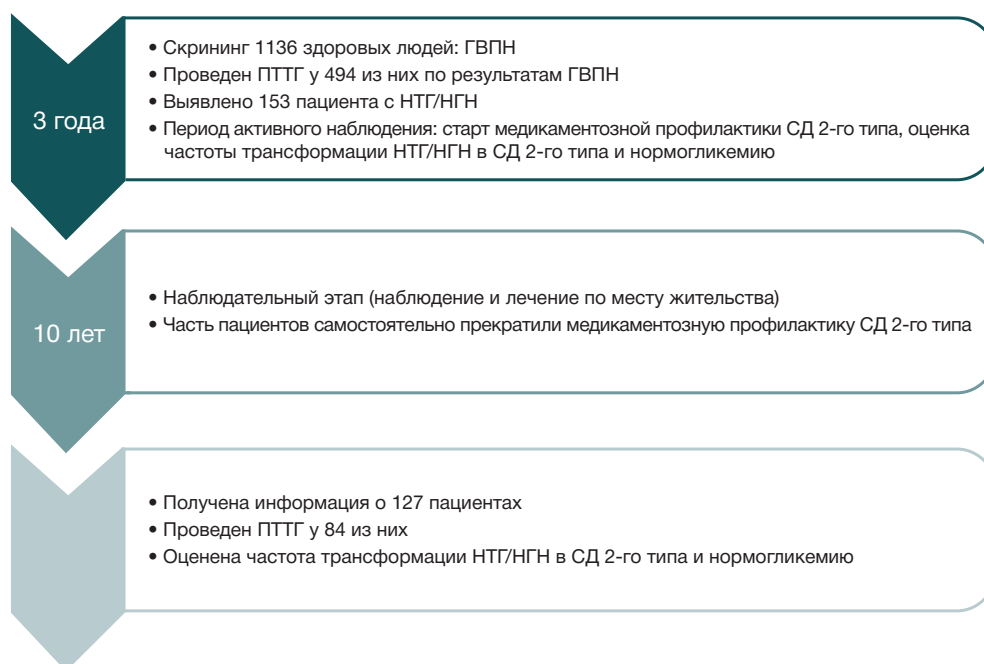


Рис. 1. Схема проведения исследования. ГВПН — глюкоза венозной плазмы натощак, ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе (после нагрузки, включающей прием 75 г глюкозы)

Продолжительность исследования

Продолжительность периода активного наблюдения, в том числе медикаментозной профилактики СД 2-го типа составила 3 года. Часть пациентов продолжила медикаментозную профилактику (максимум 13 лет). Долговременная эффективность терапии была оценена через 10 лет после окончания активного наблюдения.

Описание медицинского вмешательства

Диагностику категорий нарушения углеводного обмена проводили на основании результатов скрининга, включая проведение перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ). При выявлении НТГ/НГН давали рекомендации по модификации образа жизни и назначали медикаментозную терапию. Через 10 лет после окончания периода активного наблюдения все доступные для контакта пациенты ($n = 115$) были обследованы повторно. В качестве основного показателя исследования оценивали частоту конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа и нормогликемию в течение периода активного наблюдения и медикаментозной профилактики (3 года) и через 10 лет после его окончания.

Анализ в подгруппах

На этапе скрининга проводили стратификацию по наличию метаболического синдрома и факторов риска СД 2-го типа.

Исходы по состоянию углеводного обмена через 10 лет стратифицированы в зависимости от наличия/отсутствия долговременной медикаментозной профилактики СД 2-го типа. Соответственно в отдаленном периоде мы подразделили доступных для анализа пациентов ($n = 115$) на две подгруппы: пациенты первой подгруппы самостоятельно прекратили медикаментозную профилактику СД 2-го типа ($n = 85$), пациенты второй подгруппы принимали метформин в течение всего срока наблюдения ($n = 30$).

Методы регистрации исходов

Использовали критерии нарушений углеводного обмена, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 1999 г. Для оценки состояния углеводного обмена применяли общепринятую двухточечную двухчасовую методику ПТТГ с 75 г глюкозы. Во всех случаях концентрацию глюкозы определяли в лаборатории Тамбовской ЦРБ, забор крови проводили в пробирки с фторидом натрия, пробоподготовку — по единой преаналитической методике.

Статистический анализ

Результаты исследования оценивали с помощью программы Statistica 6.1 (TIBCO; США). Использовали методы непараметрической статистики, метод χ^2 Пирсона, точный критерий Фишера, расчет поправки Йетса таблиц сопряженности; достоверность различий оценивали как статистически значимую при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходно скрининг проведен у 1136 человек, считавших себя абсолютно здоровыми. У 73 (6,4%) человек, у которых уровень глюкозы венозной плазмы натощак (ГВПН) составил $\geq 7,0$ ммоль/л, было проведено повторное исследование ГВПН, и у 37 пациентов был подтвержден диагноз СД 2-го типа. Этим больным была назначена терапия и из дальнейшего наблюдения они были исключены. У остальных 36 пациентов гликемия оказалась в пределах 6,1–6,9 ммоль/л. Этим лицам и еще 181 из 1136 обследованных, у которых при скрининге выявили гликемию в тех же пределах, был проведен ПТТГ.

У 882 из 1136 (77,6%) ГВПН оказалась ниже 6,1 ммоль/л, что в соответствии с действующими критериями ВОЗ является нормой и не требует диагностики СД в ближайшее время. Однако IDF (2005 г.) рекомендует проводить ПТТГ

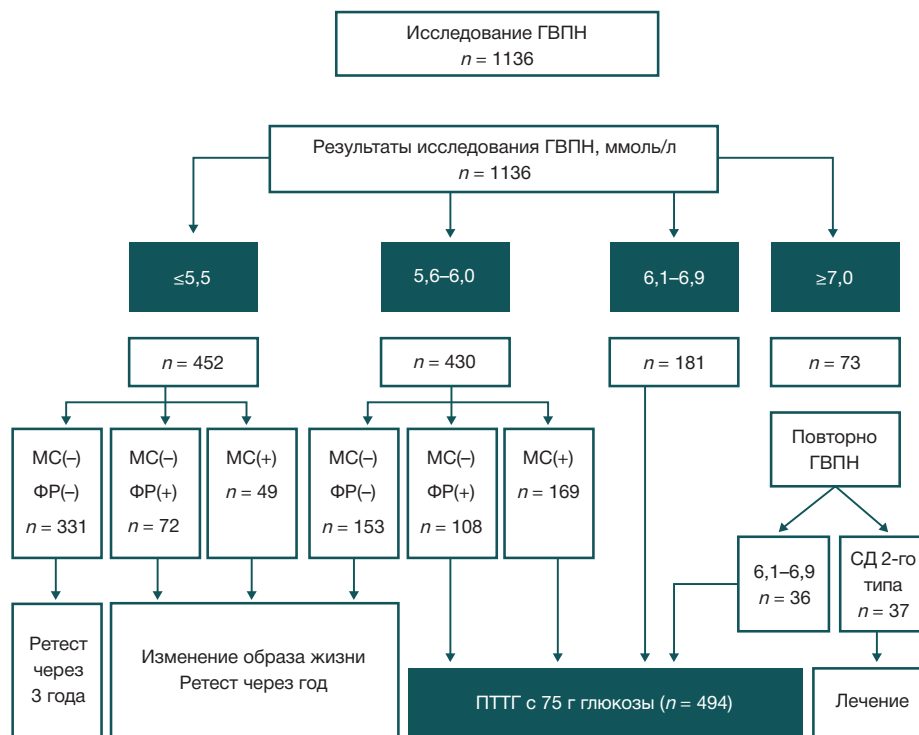


Рис. 2. Распределение больных по результатам скрининга для дальнейшей диагностики СД 2-го типа. ГВПН — глюкоза венозной плазмы натощак; МС — метаболический синдром; ПТТГ — пероральный тест толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы; ФР — факторы риска

всем лицам с метаболическим синдромом (МС), у которых гликемия натощак $\geq 5,6$ ммоль/л. Среди обследуемых нами лиц у 430 человек ГВПН оказалась в пределах 5,6–6,0 ммоль/л. Признаки МС были выявлены у 169 из 430 (39,3%) человек. Им, в соответствии с рекомендациями IDF, был проведен ПТТГ. У оставшегося 261 человека полной картины МС выявлено не было, однако у 108 из них имелись факторы риска развития СД 2-го типа, в связи с чем им тоже был проведен ПТТГ (рис. 2). Таким образом, ПТТГ был выполнен у 494 человек.

В ходе ПТТГ с 75 г глюкозы было выявлено, что у 20 человек (4,0%) — СД 2-го типа, у 62 человек (12,6%) — нарушенная толерантность к глюкозе, у 91 человека (18,4%) — нарушенная гликемия натощак и у 321 человека (65,0%) — нормальная толерантность к глюкозе.

Описание исходных характеристик пациентов, включенных в исследование, опубликовано ранее [9].

Среди 153 пациентов с предиабетом у 2 (1,3%) были выявлены противопоказания к метформину и 26 (16,9%) отказались от приема акарбозы по финансовым причинам. Таким образом, группы обследуемых в первый год активного наблюдения составили: 90 пациентов с НГН на терапии метформинном в дозе 500 мг/сут., 26 пациентов с НТГ на терапии метформинном в дозе 500 мг/сут. и 35 пациентов с НТГ на комбинированном лечении метформинном в дозе 500 мг/сут. и акарбозой с титрацией 50–150 мг по схеме, указанной в инструкции препарата. Повторные ПТТГ в группах предиабета и исходной нормальной толерантности к глюкозе были проведены

на втором и третьем годах периода активного наблюдения. На третий год при проведении контрольного ПТТГ СД 2-го типа был выявлен: в группе нормы у четырех человек (1,4%), в группе НГН на терапии метформинном у одного человека (1,1%), в группе НТГ на терапии метформинном у двух человек (8,7%), в группе НТГ на терапии метформинном и акарбозой у двух человек (6,1%). По окончании третьего года наблюдения количество лиц с НТГ/НГН составляло 156 человек (рис. 3).

После окончания периода активного наблюдения у эндокринолога большинство пациентов самостоятельно прекратили терапию, несмотря на предшествующие рекомендации ее продолжать и поддерживать изменения в образе жизни.

Из 156 пациентов с НТГ/НГН в анализ отдаленных результатов медикаментозной профилактики СД 2-го типа через 10 лет было включено 115 человек. Причины исключения из анализа долгосрочных исходов остальных пациентов представлены на рис. 4.

Из 115 человек, доступных для анализа, 30 (26,1%) принимали метформин в суточной дозе 500 мг как минимум до окончания сбора данных для настоящего исследования (2018 г.) и 85 человек самостоятельно прекратили терапию, из них 74 — практически сразу. Распределение медикаментозной профилактики по типу и продолжительности после окончания периода активного наблюдения представлено на рис. 5.

Причины низкой приверженности не были проанализированы подробно в нашем исследовании, но следует отметить, что пациенты сообщали о факторах

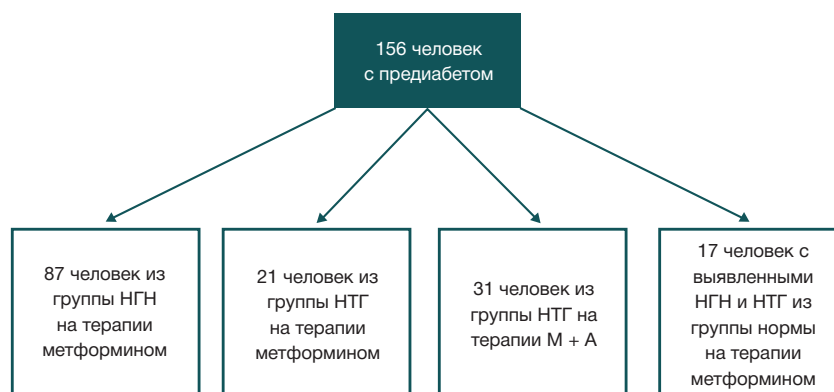


Рис. 3. Распределение больных по окончании третьего года наблюдения в зависимости от исходного состояния углеводного обмена и получаемой терапии. М + А — терапия метформинном и акарбозой

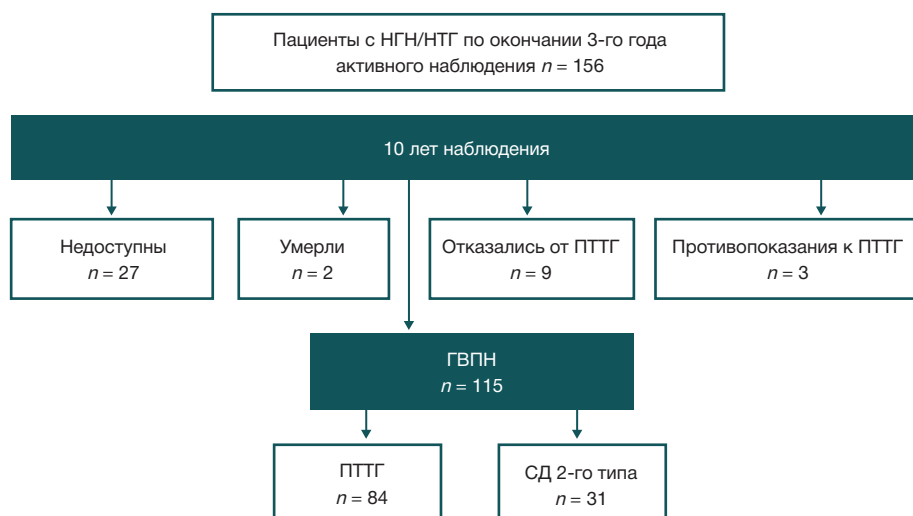


Рис. 4. Распределение больных с НТГ/НГН через 10 лет после окончания периода активного наблюдения

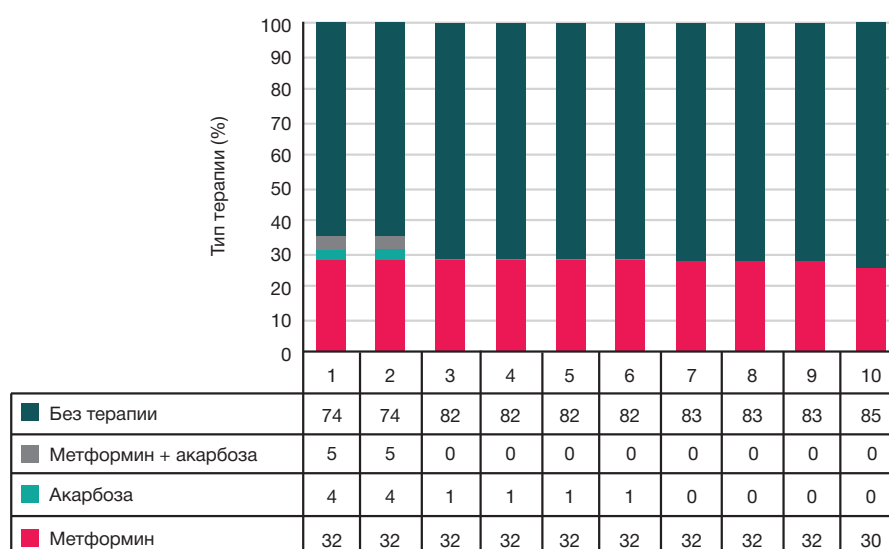


Рис. 5. Распределение медикаментозной профилактики по типу и продолжительности после окончания периода активного наблюдения (с 1-го по 10-й год)

не только медицинского, но и административного/экономического характера. Так, отсутствие постановки на диспансерный учет в лечебно-профилактическом учреждении пациентов с предиабетом и последующий отказ им в выписке препаратов для медикаментозной профилактики чаще всего являлись причиной снижения комплаентности пациентов.

Результаты медикаментозной терапии

В период активного наблюдения из 151 человека группы предиабета у 12 (7,9%) пациентов произошла трансформация начальных нарушений углеводного обмена в СД 2-го типа.

На фоне медикаментозной профилактики повторные ПТТГ были проведены на втором и третьем годах активного наблюдения. В группе НГН на фоне терапии метформином значимые результаты получены у пациентов с исходной ГВПН 5,6–6,0 ммоль/л, у которых нормализация углеводного обмена была достигнута в 47,8% случаев на втором году и в 72,9% случаев на третьем году наблюдения ($\chi^2 = 6,195$; $p = 0,013$). Результаты медикаментозной профилактики СД 2-го типа в группе НГН в период активного наблюдения изложены нами ранее [9].

В группе НТГ пациенты, получавшие лечение метформином и акарбозой, продемонстрировали лучшие результаты по сравнению с монотерапией метформином: нормальная толерантность к глюкозе была зарегистрирована в большей половине случаев на третий год активного наблюдения ($\chi^2 = 7,222$; $p = 0,007$) именно на фоне комбинированной терапии.

Из 115 человек, доступных для анализа через 10 лет, 30 (26,1%) принимали метформин в суточной дозе 500 мг как минимум до окончания сбора данных для настоящего исследования (2018 г.), такого же длительного приема акарбозы зафиксировано не было (табл. 1).

Оценивая состояние углеводного обмена в отдаленном периоде, следует отметить, что у пациентов, находившихся на непрерывном приеме метформина, не было зарегистрировано ни одного случая развития СД 2-го типа и была достигнута более высокая частота нормализации гликемических показателей по сравнению с лицами без медикаментозной профилактики ($p < 0,05$). Через 10 лет после окончания активного наблюдения частота конверсии НТГ/НГН в СД 2-го типа составила 38,8% в

группе без медикаментозной профилактики и 0% в группе метформина ($p < 0,01$).

Метформин одинаково эффективен для профилактики развития СД 2-го типа вне зависимости от вида исходного нарушения углеводного обмена: внутри группы получавших длительную медикаментозную профилактику метформином не было выявлено статистически значимых различий при сопоставлении по исходному диагнозу — НГН или НТГ (табл. 2).

Даже краткосрочная (только в период активного наблюдения, т. е. в течение трех лет) медикаментозная профилактика СД 2-го типа может влиять на результат, полученный через 10 лет наблюдения (табл. 3).

Эффективность краткосрочной медикаментозной профилактики в долгосрочном периоде оказалась выше для НГН, чем для НТГ ($p = 0,012$ — для нормализации гликемии; $p = 0,004$ — для конверсии в СД 2-го типа), что может быть связано с более высокой частотой назначения метформина, чем акарбозы.

Нежелательные явления

В ходе исследования не было зафиксировано непредвиденных нежелательных реакций (ННР), связанных с медикаментозной профилактикой СД 2-го типа. Учет нежелательных явлений, за исключением ННР, в рамках настоящего исследования в связи с особенностями его дизайна не был проведен.

Ограничения исследования

Ограничения исследования следуют из его дизайна: наблюдательный характер и использование только рутинных процедур не позволили сформировать группы положительного и отрицательного контроля. То, что в течение 10 лет пациенты проходили диагностику и лечение по месту жительства, а не под контролем исследователей, не позволяет полностью исключить влияние внешних факторов на результаты исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вопросы приверженности к медикаментозной профилактике СД 2-го типа неотделимы от вопросов скрининга.

Отсутствие мотивации для своевременного выявления ранних нарушений углеводного обмена в медицинском сообществе порождает отсутствие осведомленности, и, как следствие, отсутствие приверженности к медикаментозной терапии ранних нарушений углеводного обмена в сообществе пациентов.

Согласно стандартам медицинской помощи ADA 2019 [10, 11], применение метформина, ингибиторов α -глюкозидазы, орлистата, агонистов ГПП-1 и тиазолидиндионов способствовало снижению заболеваемости СД 2-го типа, однако ни один из этих препаратов не включает предиабет в качестве зарегистрированного показания к применению. Опубликован протокол исследования SiMePred, которое должно оценить эффективность ингибитора ДПП-4 ситаглиптина в профилактике СД 2-го типа, однако результаты данной работы пока недоступны [12]. Эксперты ADA считают метформин предпочтительной терапией для вторичной профилактики СД 2-го типа. Для остальных вышеперечисленных препаратов рекомендуют оценивать соотношение пользы и риска в каждом конкретном случае [10]. Между тем, в рекомендациях IDF от 2019 г. указана возможность назначения как метформина, так и ингибитора α -глюкозидазы акарбозы с целью медикаментозной профилактики СД 2-го типа у лиц с начальными нарушениями углеводного обмена [13]. Следует отметить, что действующие в России инструкции по применению метформина и акарбозы содержат предиабет как показание к применению [14, 15].

В 2005 г. в Российской Федерации в рамках национального проекта «Здоровье» была принята целевая подпрограмма «Сахарный диабет» [16]. Ее целевыми индикаторами были выбраны продолжительность жизни больных сахарным диабетом и доля осложнений при сахарном диабете, т. е. упор был сделан на третичную профилактику.

В качестве программы третичной профилактики также можно рассматривать электронный государственный регистр сахарного диабета, но данных по его долговременной эффективности в качестве профилактического инструмента в настоящее время недостаточно.

В качестве первичной профилактики, на наш взгляд, следует рассматривать проведение диспансеризации населения [17], т. е. активное выявление факторов риска СД 2-го типа с последующим внедрением профилактических мер, направленных на уменьшение вклада модифицируемых факторов риска, а также своевременный скрининг — не только в связи с диспансеризацией, но и в связи с наличием факторов риска. На практике требования по пробоподготовке не всегда выполняются, что приводит к гиподиагностике нарушений углеводного обмена. Согласно докладу экспертов ВОЗ (2006 г.), если при взятии образца крови немедленное отделение плазмы невозможно, образец цельной крови должен быть помещен в пробирку, содержащую ингибитор гликолиза (кодируется крышкой серого цвета), которую следует хранить во льду до выделения плазмы или проведения анализа. Этот цвет крышек утвержден Международной организацией стандартизации (ISO, 2000 г.) [18].

Вторичная профилактика СД 2-го типа включает два направления: наиболее раннее выявление заболевания и систему мер по замедлению конверсии начальных нарушений углеводного обмена в явный СД 2-го типа. Вторичная профилактика тесно связана с первичной, так как для пациентов, имеющих один или несколько факторов риска развития СД 2-го типа, охваченных рамками первичной профилактики, вторичная профилактика должна носить скрининговый характер. Федеральная программа вторичной профилактики СД 2-го типа, т. е. предотвращения прогрессии предиабета

Таблица 1. Результаты обследования пациентов, получавших и не получавших медикаментозную профилактику, в отдаленном периоде наблюдения

Состояние углеводного обмена	Число обследованных больных $n = 115$				χ^2	p
	Медикаментозная профилактика $n = 30$		Без медикаментозной профилактики $n = 85$			
	абс.	%	абс.	%		
Норма	25	83,3	22	25,8	30,28	< 0,05
НГН	1	3,3	13	15,2	3,0	НД
НТГ	4	13,3	17	20,0	0,66	НД
СД 2-го типа	0	0	33	38,8	16,3	< 0,01

Примечание: НД — недостаточно.

Таблица 2. Отдаленные результаты ГТТГ пациентов группы длительной медикаментозной профилактики с учетом их исходного состояния углеводного обмена

Результат обследования через 10 лет	Исходное состояние пациентов группы длительной профилактики ($n = 30$)		χ^2	p
	НГН	НТГ		
Норма	21	4	0,250	$> 0,05$
НГН	1	0	1	$> 0,05$
НТГ	2	2	0,169	$> 0,05$
СД 2-го типа	0	0	—	—

Таблица 3. Результаты обследования пациентов группы без длительной медикаментозной профилактики с учетом их исходного состояния углеводного обмена

Результат обследования через 10 лет	Исходное состояние пациентов группы без длительной медикаментозной профилактики ($n = 85$)		χ^2 (с поправкой Йетса)	p
	НГН	НТГ		
Норма	17 (20,0%)	5 (5,9%)	6,4	0,012
НГН	9 (10,5%)	4 (4,8%)	1,14	0,28
НТГ	8 (9,4%)	9 (10,5%)	0,027	0,82
СД 2-го типа	10 (11,8%)	23 (27,1%)	8,6	0,004

в диабет, на сегодняшний день отсутствует. В связи с этим вторичная медикаментозная профилактика СД 2-го типа, продемонстрировавшая свою эффективность в отдаленном периоде как в нашем, так и в международных исследованиях [19, 20], может быть социально и экономически эффективным методом снижения бремени ранних нарушений углеводного обмена и СД 2-го типа.

ВЫВОДЫ

1. Отсутствие обязательного учета и диспансерного наблюдения пациентов с ранними нарушениями углеводного обмена приводит к недооценке клинического значения НТГ/

НГН, позднему выявлению СД 2-го типа и недостаточной приверженности пациентов к терапии. 2. Показано, что применение метформина позволило в условиях реальной клинической практики отсрочить развитие СД 2-го типа на длительное время. 3. Необходимо включать рекомендации по более активному выявлению НТГ/НГН и более раннему началу медикаментозной профилактики НТГ/НГН в алгоритмы и стандарты диагностики и лечения, используемые в рутинной практике. 4. При отсутствии противопоказаний всем лицам с начальными нарушениями углеводного обмена целесообразно назначение медикаментозной терапии метформином на неопределенно длительный срок.

Литература

1. Государственный регистр сахарного диабета. Профессиональный Всероссийский ресурс по нозологиям диабета под эгидой Эндокринологического Научного Центра. Доступно по ссылке: <http://diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content> (проверено 28.05.18).
2. Дедов И. И., Шестакова М. В., редакторы. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 9-е изд. М., 2019.
3. Дедов И. И., Шестакова М. В., Галстян Г. Р. Распространенность сахарного диабета 2-го типа у взрослого населения России (исследование NATION). Сахарный диабет. 2016; 19 (2): 104–12.
4. Аметов А. С. Сахарный диабет 2-го типа. Проблемы и решения. М.: GEOTAR-Media, 2017; с. 125–44.
5. Barry E. Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. BMJ. 2017 Jan 4; (356): i6538.
6. Аметов А. С., Кривошеева А. А. Профилактика развития сахарного диабета типа 2. Эндокринология. 2017; (4): 14–25.
7. Чазова И. Е., Мычка В. Б., Беленков Ю. Н. Основные результаты Российской программы АПРЕЛЬ (эффективность применения акарбозы у пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе и артериальной гипертензией). Consilium medicum. 2005; (2): 18–22.
8. Madsen KS, Chi Y, Metzendorf MI, Richter B, Hemmingsen B. Metformin for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in persons at increased risk for the development of type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2019; (12): CD008558
9. Демидова И. Ю., Боева В. В. Ранняя диагностика и лечение начальных стадий нарушений углеводного обмена. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2013; (1): 9–13.
10. Diabetes Care. 2019; 42 (Suppl. 1): 29–33.
11. Аметов А. С., Кривошеева А. А. Перспективы ранней фармакологической интервенции на этапе предиабета. Эндокринология. 2018; 7 (3): 75–87.
12. Naidoo P, et al. Effect of Sitagliptin and Metformin on prediabetes progression to type 2 diabetes — a randomized, double-blind, double-arm, multicenter clinical trial: protocol for the sitagliptin and metformin in prediabetes (SiMePreD) study. JMIR Res Protoc. 2016; 5 (3): e145.
13. International Diabetes Federation. Clinical Practice Recommendations for managing Type 2 Diabetes in Primary Care, 2017.
14. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения глюкофаж, изменение № 4 к П N014600/01-140812 от 6.07.2016 г. С. 3. Дата переоформления: 04.04.2018 г.
15. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению препарата глюкобай. Регистрационный номер П N012033/01 от 24.06.2005 г. С. 2. Дата переоформления: 24.08.2017 г.
16. Дедов И. И., Шестакова М. В., редакторы. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы». Сахарный диабет. 2013; (2): 2–48.
17. Приказ Минздрава России от 3 декабря 2012 г. № 1006н. Доступно по ссылке: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=212999>.
18. Долгов В. В., Селиванова А. В. и др. Лабораторная диагностика нарушений обмена углеводов. Метаболический синдром. Сахарный диабет. М.-Тверь: Триада, 2006; 128 с.
19. Chiasson J-L, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. Lancet. 2002 Jun 15; 359 (9323): 2072–7.
20. Wenying Y, Lixiang L, Jinwu Q. The preventive effect of acarbose and metformin on the progression to diabetes mellitus in the IGT population: 3-year multicenter prospective study. Chin J Endocrin Metab. 2001; (17): 131–6.

References

1. State Diabetes Register. Professional All-Russian Resource on Diabetes Nosology under the auspices of Endocrinology Research Center. Available from: <http://diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content>. Verified on May 28, 2018. Russian.
2. Dedov II, Shestakova MV, editors. Algorithms of Specialized Medical Care for Diabetes Mellitus Patients. 9th ed. Moscow, 2019. Russian.
3. Dedov II, Shestakova MV, Galstyan GR. Prevalence of Type 2 Diabetes Mellitus in Adult Russian Population (NATION study). Diabetes Mellitus. 2016; 19 (2): 104–12. Russian.
4. Ametov AS. Saharnyj diabet 2-go tipa. Problemy i reshenija. M.: GEOTAR-Media, 2017; s. 125–144. Russian.
5. Barry E. Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. BMJ. 2017 Jan 4; (356): i6538.
6. Ametov AS, Krivosheyeva AA. Prevention of type 2 diabetes mellitus. Endocrinology. 2017; (4): 14–25.
7. Chazova IE, Mychka VB, Belenkov YuN. Osnovnye rezul'taty Rossijskoj programmy "APREL" (jeffektivnost' primeneniya akarbozy u pacientov s narushennoj tolerantnost'ju k glukoze i arterial'noj gipertonije). Consilium medicum. 2005; (2): 18–22. Russian.
8. Madsen KS, Chi Y, Metzendorf MI, Richter B, Hemmingsen B. Metformin for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in persons at increased risk for the development of type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2019; (12): CD008558

9. Demidova IYu, Boeva VV. Early diagnosis and treatment of the initial stages of carbohydrate metabolism disorders. *Bulletin of The Russian State Medical University*. 2013; (1): 9–13.
10. *Diabetes Care*. 2019; 42 (Suppl. 1): 29–33.
11. Ametov AS, Krivosheyeva AA. Prospects of early pharmacological intervention at the stage of prediabetes. *Endocrinology*. 2018; 7 (3): 75–87.
12. Naidoo P, et al. Effect of Sitagliptin and Metformin on prediabetes progression to type 2 diabetes — a randomized, double-blind, double-arm, multicenter clinical trial: protocol for the sitagliptin and metformin in prediabetes (SiMePreD) study. *JMIR Res Protoc*. 2016; 5 (3): e145.
13. International Diabetes Federation. *Clinical Practice Recommendations for managing Type 2 Diabetes in Primary Care*, 2017.
14. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv. Instrukcija po primeneniju lekarstvennogo preparata dlja medicinskogo primenenija gljukofazh, izmenenie # 4 k P N014600/01-140812 ot 6.07.2016 g. S. 3. Data pereformlenija: 04.04.2018 g. Russian.
15. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv. Instrukcija po medicinskomu primeneniju preparata gljukobaj. Registracionnyj nomer P N012033/01 ot 24.06.2005 g. S. 2. Data pereformlenija: 24.08.2017 g. Russian.
16. Dedov II, Shestakova MV, redaktory. The results of the implementation of the "Diabetes mellitus" subprogram of the Federal target program "Prevention and Control of Socially Significant Diseases 2007–2012". *Diabetes*; 2013; (2): 2–48.
17. Prikaz Minzdrava Rossii ot 3 dekabrya 2012 g. # 1006n. Available from: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=212999>. Russian.
18. Dolgov VV, Selivanova AV, i dr. Laboratornaja diagnostika narushenij obmena uglevodov. *Metabolicheskij sindrom. Saharnyj diabet. M.-Tver': Triada*, 2006; 128 s. Russian.
19. Chiasson J-L, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M, et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*. 2002 Jun 15; 359 (9323): 2072–7.
20. Wenying Y, Lixiang L, Jinwu Q. The preventive effect of acarbose and metformin on the progression to diabetes mellitus in the IGT population: 3-year multicenter prospective study. *Chin J Endocrin Metab*. 2001; (17): 131–6.