

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

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2019: 0,20

Журнал включен в WoS. JCR 2019: 0,21

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 6

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.2020-03

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 30.06.2020
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

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

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

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2019: 0.20

Scopus®

Indexed in WoS. JCR 2019: 0.21

WEB OF SCIENCE™

Five-year h-index is 6

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2018: 1,439

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 37)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2020-03

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 30.06.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

МНЕНИЕ	5
Анализ внеклеточной фракции РНК плазмы как инструмент диагностики в онкологии Е. А. Лоломадзе, В. В. Кометова, В. В. Родионов Circulating RNA in blood plasma as diagnostic tool for clinical oncology Lolomadze EA, Kometova VV, Rodionov VV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	11
Устойчивость карбапенемрезистентных штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> к колистину: молекулярные механизмы и бактериальный фитнес О. В. Шамина, О. А. Крыжановская, А. В. Лазарева, Н. М. Алябьева, Н. А. Маянский Colistin resistance of carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains: molecular mechanisms and bacterial fitness Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Mayanskiy NA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	19
Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE Н. С. Купцов, М. А. Корниченко, Р. Б. Гордичев, Д. И. Данилов, М. В. Малахова, Т. В. Парфенова, Г. И. Макаренко, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens Kuptsov NS, Kornienko MA, Gordnichyev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, Makarenko GI, Shitikov EA, Ilina EN	
МНЕНИЕ	27
Иммунитет к COVID-19 и вопросы проведения скрининговых исследований антител к SARS-CoV-2 Н. А. Маянский Immunity to COVID-19 and issues of screening for SARS-CoV-2 antibodies Mayanskiy NA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	31
Антитела IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 у новорожденных от матерей с COVID-19 А. А. Семешкин, В. И. Вечорко, Б. В. Силаев, Н. Н. Левчук, С. В. Поликарпова, О. В. Аверков IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2 in neonates born to mothers with COVID-19 Semeshkin AA, Vechorko VI, Silaev BV, Levchuk NN, Polikarpova SV, Averkov OV	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	35
Синдром микроцефалии в сочетании с капиллярными мальформациями О. А. Щагина, Н. А. Семенова, Л. А. Бессонова, Е. А. Ларшина, Н. С. Бескоровайный, Е. Ю. Захарова, О. П. Рыжкова, А. В. Поляков Microcephaly-capillary malformation syndrome Shchagina OA, Semenova NA, Bessonova LA, Larshina EA, Beskorovainiy NS, Zakharova EYu, Ryzhkova OP, Poliakov AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	42
Диагностическая значимость выявления <i>Lactobacillus spp.</i> в эякуляте Д. Г. Почерников, Н. Т. Постовойтенко, В. В. Гетьман, И. С. Галкина Diagnostic significance of <i>Lactobacillus spp.</i> identification in ejaculate Pochernikov DG, Postovoytenko NT, Getman VV, Galkina IS	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	49
Клинический случай ДОФА-зависимой дистонии у молодой женщины Н. А. Бельх, М. А. Ахьямова, В. В. Гусев, О. А. Львова A case report of dopa-responsive dystonia in a young woman Belykh NA, Akhkyamova MA, Gusev VV, Lvova OA	

Влияние эмпагlifлозина и L-орнитина L-аспартата на поведенческо-когнитивные функции и физическую работоспособность при экспериментальном стеатогепатите

В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, М. А. Поверяева, А. В. Бунят, В. Е. Карев, Д. Ю. Ивкин, Д. С. Суханов, Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый

Effects of empagliflozin and L-orithine L-aspartate on behavior, cognitive functions, and physical performance in mice with experimentally induced steatohepatitis

Prikhodko VA, Sysyoyev Yul, Poveryaeva MA, Bunyat AV, Karev VE, Ivkin DYU, Sukhanov DS, Shustov EB, Okovityi SV

Особенности свободнорадикального окисления в толстом кишечнике при язвенном колите и болезни Крона

М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, М. С. Бойко, А. Е. Бакеева, Н. В. Кайгородцева, И. Р. Галеева, А. А. Федосов, М. А. Ильиных, Л. В. Воргова

Aspects of free radical oxidation in the large bowel in ulcerative colitis and Crohn's disease

Osikov MV, Davydova EV, Boyko MS, Bakeeva AE, Kaygorodtseva NV, Galeeva IR, Fedosov AA, Ilyinyh MA, Vorgova LV

Диагностика и лечение острых хирургических заболеваний у пациентов с COVID-19

В. И. Вечорко, В. Д. Аносов, Б. В. Силаев

Diagnosis and treatment of acute surgical diseases in patients with COVID-19

Vechyorko VI, Anosov VD, Silaev BV

Структура тревожных переживаний, ассоциированных с распространением COVID-19: данные онлайн-опроса

М. Ю. Сорокин, Е. Д. Касьянов, Г. В. Рукавишников, О. В. Макаревич, Н. Г. Незнанов, Н. Б. Лутова, Г. Э. Мазо

Structure of anxiety associated with COVID-19 pandemic: the online survey results long-term efficacy and clinical outcomes

Sorokin MYu, Kasyanov ED, Rukavishnikov GV, Makarevich OV, Neznanov NG, Lutova NB, Mazo GE

Использование электронных устройств участниками образовательного процесса при традиционной и дистанционной формах обучения

О. Ю. Милушкина, В. И. Попов, Н. А. Скоблина, С. В. Маркелова, Н. В. Соколова

The use of electronic devices by students, parents and teachers before and after the transition to distance learning

Milushkina OYu, Popov VI, Skoblina NA, Markelova SV, Sokolova NV

Анализ результата применения метода гирудотерапии при лечении хронического апикального периодонтита

А. И. Абдуллаева, А. Г. Притыко, П. А. Воронин, Е. Г. Михайлова

Analysis of leech therapy effects in patients with chronic apical periodontitis

Abdullaeva AI, Prityko AG, Voronin PA, Mikhailova EG

АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ФРАКЦИИ РНК ПЛАЗМЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

Е. А. Лоломадзе , В. В. Кометова, В. В. Родионов

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


Одна из ключевых задач современной онкодиагностики — поиск ранних предикторов злокачественных новообразований (ЗНО) при анализе наиболее доступных видов биоматериала. Жидкостная биопсия представляет собой одну из неинвазивных методик и включает в себя обнаружение и выделение циркулирующих опухолевых клеток, циркулирующих опухолевых нуклеиновых кислот и экзосом из плазмы крови у пациентов со злокачественными заболеваниями. Множество работ посвящено исследованию внеклеточной фракции ДНК при ЗНО. Вместе с тем активную пролиферацию трансформированных клеток при развитии опухолей сопровождают значительные изменения экспрессии определенных генов. Обнаружение тканеспецифичных транскриптов в составе внеклеточной РНК плазмы крови (внРНК) позволяет предположить, что представленность циркулирующих в плазме РНК связана с развитием патологического процесса непосредственно в первичном очаге. На наш взгляд, внРНК плазмы крови представляют практическую ценность в качестве молекулярно-генетических маркеров ранней диагностики в онкологии.

Ключевые слова: циркулирующие нуклеиновые кислоты, плазма крови, циркулирующие опухолевые клетки, внРНК, микроРНК, биомаркеры, онкология

Финансирование: исследование выполнено в рамках работ по Государственному заданию №АААА-А18-118053190012-9 «Разработка тест-системы для ранней диагностики рака молочной железы и рака яичников на основе анализа свободно циркулирующих (внеклеточных) РНК периферической крови».

Благодарности: мы благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Университет Пирогова (Москва, Россия) за помощь в интерпретации данных и анализе некоторых результатов.

Вклад авторов: Е. А. Лоломадзе — анализ литературных источников и написание текста; В. В. Кометова, В. В. Родионов — написание и редактирование статьи.

 **Для корреспонденции:** Елена Анатольевна Лоломадзе
ул. Опарина, 4, г. Москва, 117997; 6332424@gmail.com

Статья получена: 23.06.2020 **Статья принята к печати:** 26.06.2020 **Опубликована онлайн:** 30.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.040

CIRCULATING RNA IN BLOOD PLASMA AS DIAGNOSTIC TOOL FOR CLINICAL ONCOLOGY

Lolomadze EA , Kometova VV, Rodionov VV

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


One of the key challenges facing today's oncology is the discovery of early predictors of malignant neoplasms in patients' biological samples. Liquid biopsy is a noninvasive diagnostic technique based on the detection and isolation of tumor cells, tumor-derived nucleic acid and exosomes circulating in the blood plasma of cancer patients. There is a plethora of research studies of circulating tumor DNA in patients with MN. The active proliferation of tumor cells occurs in the backdrop of altered gene expression. The presence of tissue-specific transcripts in the circulating RNA fraction suggests that levels of circulating RNA reflect the development of the primary tumor. We think that cell-free RNA circulating in the blood plasma is a promising molecular biomarker for early cancer detection.

Keywords: circulating nucleic acids, blood plasma, circulating tumor cells, circulating RNA, miRNA, biomarkers, oncology

Funding: the study was conducted under the state assignment АААА-А18-118053190012-9 (*Development of assays for early diagnosis of breast and ovarian cancers based on the analysis of RNA circulating in the peripheral blood*).

Acknowledgements: we thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of Pirogov Russian National Medical Research University (Moscow, Russia) for their help in interpreting the data and analyzing some of the results.

Author contribution: Lolomadze EA — literature analysis and preparation of the manuscript draft; Kometova VV, Rodionov VV — editing and manuscript revision

 **Correspondence should be addressed:** Elena A. Lolomadze
Oparina, 4, Moscow, 117997; 6332424@gmail.com

Received: 23.06.2020 **Accepted:** 26.06.2020 **Published online:** 30.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.040

Один из перспективных скрининговых подходов в онкодиагностике получил название жидкостной биопсии. Он состоит в обнаружении циркулирующих опухолевых клеток, циркулирующей опухолевой ДНК или РНК и экзосом в плазме крови у пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО). Жидкостная биопсия включает различные методы анализа: количественный анализ представленности отдельных молекул, в том числе и белковых, анализ последовательности нуклеиновых кислот, анализ метилирования ДНК и др. [1]. Анализ внеклеточной фракции нуклеиновых кислот плазмы крови дает возможность отслеживать генетическую гетерогенность опухоли в динамике (в ответ на применение различных методов лечения, подавляющих рост опухолевых клеток) [2, 3].

Известно, что апоптотические или некротические клетки высвобождают в кровотоке фрагменты ДНК и

РНК, а также экзосомы (мембранные инкапсулированные субклеточные структуры, содержащие белки и нуклеиновые кислоты, выделяемые опухолевыми клетками) [4]. Клетки от этапа раннего онкогенеза до метастазирования в ходе эволюции опухоли накапливают специфичные мутации и эпигенетические модификации, что может быть отражено во фракции внеклеточных нуклеиновых кислот.

Анализ внеклеточной фракции ДНК

Анализ внеклеточной фракции ДНК как диагностический инструмент в онкологии используют уже более 20 лет, применяя при раках легких [5, 6], головы и шеи [7], пищевода [8], молочной железы [9], печени [10], толстой кишки [11], поджелудочной железы [12], почек [13] и др. Как правило, определяют наличие мутаций онкогенов, генов-супрессоров опухоли или микросателлитные изменения

[6, 9, 13]. Анализ метилирования циркулирующей ДНК также может быть информативен для постановки диагноза, прогнозирования и мониторинга роста опухолей [8, 14]. Кроме примеров с ЗНО, количественные aberrации циркулирующей ДНК описаны в исследованиях ряда других патологических состояний, включая преэклампсию [15], хромосомные анеуплоидии плода [16] и неукротимую рвоту беременных [17].

Анализ внеклеточной фракции мРНК

Поскольку активную пролиферацию опухолевых клеток и эволюцию опухоли сопровождают значительные изменения профиля представленности многих транскриптов (относительно нормы), используя количественную ОТ-ПЦР, можно попытаться детектировать изменение профиля внеклеточных мРНК [18]. Так, ОТ-ПЦР успешно применили для оценки содержания мРНК генов «домашнего хозяйства», циркулирующей в крови в норме и при опухолевой патологии [19]. Циркулирующие РНК изучали при таких ЗНО, как меланома [20–22], фолликулярная лимфома [23], рак молочной железы [22, 24–28], толстой кишки [23, 29], печени [30], пищевода [21], носоглотки [31], щитовидной железы [22], простаты [40, 41], легких [32] и др. При этом внРНК исследовали и при патологических состояниях неонкологического спектра — у пациентов с травмой [33, 34], диабетической ретинопатией [35] или у женщин во время беременности (фетальная мРНК) [36].

Так, для *рака молочной железы* (РМЖ) обнаружили статистически значимое изменение содержания мРНК hTERT в плазме пациентов с начальными стадиями РМЖ по сравнению со здоровыми людьми. При этом было показано, что присутствие мРНК hTERT в плазме пациентов с РМЖ зависит от хирургического удаления опухоли [25]. Однако hTERT, скорее всего, не является РМЖ-специфичным маркером, поскольку его изменение обнаружено и у пациентов с меланомой и раком щитовидной железы [22]. Экспрессия мРНК hMAM в плазме в значительной степени коррелировала с неблагоприятным прогнозом и более низкими показателями выживаемости у пациенток с РМЖ [26]. В другом исследовании продемонстрирован повышенный уровень мРНК Bmi-1 в плазме у пациентов с РМЖ в сравнении со здоровыми [27]. Недавно показано, что уровень циркулирующей мРНК большого межгенного некодирующего РНК-регулятора репрограммирования (LincRNA-ROR) может быть потенциальным биомаркером для диагностики РМЖ, и, учитывая, что его уровни в плазме снижались в послеоперационном периоде по сравнению с предоперационными образцами, данный маркер может быть использован для мониторинга состояния пациентов [28].

При *раке яичников* обнаружены повышенный уровень сывороточного MMP-9 у пациенток с запущенными стадиями и его корреляция с плохим прогнозом, что указывает на потенциальную прогностическую роль этого биомаркера [37]. Выявление циркулирующей внРНК HMGA2 тоже может быть инструментом для диагностики и мониторинга пациенток с раком яичников [38].

При *раке предстательной железы* у пациентов с метастазами наблюдают более высокие уровни циркулирующей мРНК cBMP6 в сравнении с пациентами с контролируемой локализованной опухолью. При этом для H3K27me3 характерно обратное распределение и его уровень был значительно ниже у пациентов с метастазами, чем у пациентов с более ранними стадиями. Таким образом, уровни циркулирующих в плазме

крови мРНК cBMP6 и H3K27 после лечения позволяют отличать метастатический рак предстательной железы от локализованного заболевания [39]. Количественная оценка мРНК hTERT в плазме также может быть опухолевым маркером для различения локализованного и метастатического рака простаты [40].

Анализ состава экзосом

Особое внимание в последнее время уделяют изучению секретируемых опухолью внеклеточных везикул (экзосом и микровезикул), способствующих, как считается, инвазии и метастазированию [41, 42].

Внеклеточные везикулы являются специализированными мембранными органоидами, секретируемыми большинством типов клеток, и содержат различные молекулярные составляющие, включая РНК, белки, липиды и метаболиты [43, 44]. В настоящее время внеклеточные везикулы все чаще признают важными медиаторами межклеточной коммуникации, а именно средством для транспорта мРНК через внеклеточную среду от опухолевых клеток к нормальным клеткам [45, 46].

В микровезикулах стабильно обнаруживаются микроРНК, различные виды длинных РНК (включая мРНК), кольцевая РНК и длинные некодирующие РНК [47, 48]. Профили РНК внеклеточных везикул здоровых людей и пациентов с гепатоцеллюлярным раком достоверно различались [48].

Анализ внеклеточной фракции микроРНК

МикроРНК представляют собой группу некодирующих регуляторных РНК, состоящих примерно из 22 нуклеотидов и играющих важную роль в регуляции экспрессии генов [49]. Они могут иметь определенные преимущества по сравнению с мРНК в качестве циркулирующих биомаркеров из-за своей высокой стабильности. Кроме упомянутой выше экзосомной фракции микроРНК, они циркулируют и вне экзосом [50, 51] и стабильны, по-видимому, благодаря связыванию с белками-агонастами [52] или липопротеиновыми комплексами (например, липопротеинами высокой плотности) [53].

Анализ циркулирующих микроРНК описан для пациентов с *лимфомой* [54], а также в плазме и сыворотке пациентов с *раком простаты* [55]. Уровень представленности miR-26a в плазме может выявлять пациентов с *эпителиальным раком яичников* [56]. Представленность четырех микроРНК (miR-148b, miR-376c, miR-409-3p и miR-801) значительно возрастает в плазме больных РМЖ [57]. Установлено также повышение уровня микроРНК (miR-16, miR-21 и miR-451) и значительное снижение содержания miR-145 в плазме пациенток с РМЖ [58]. При этом комбинация miR-145 и miR-451 была лучшим биомаркером при различении РМЖ от здорового контроля и всех других видов рака, включенных в это исследование.

Проблемы и ограничения метода

Хотя анализ внРНК имеет высокий потенциал применения в различных областях медицины, эта технология содержит и ряд недостатков. Количественную оценку внРНК затрудняют искажения, возникающие в ходе амплификации мишеней, особенно при анализе низкопредставленных молекул [59]. Искажения могут быть обусловлены и разной эффективностью метода обратной транскрипции на разных последовательностях микроРНК и мРНК при различном

молекулярном окружении. Поэтому стратегии обнаружения внРНК без ПЦР представляют большой интерес [60, 61].

На сегодняшний день большинство предложенных диагностических подходов на основе анализа внРНК обладает сравнительно низкой чувствительностью и специфичностью [62]. Для повышения этих показателей необходимо проведение больших проспективных когортных исследований.

Выводы

Анализ внРНК при онкологических заболеваниях, на наш взгляд, демонстрирует высокую диагностическую и

прогностическую ценность этого вида малоинвазивных биомаркеров. Информативность жидкостной биопсии можно повысить за счет дифференциального анализа экзосомной и свободно циркулирующей фракций внРНК, включая анализ микроРНК. Для снижения ложноположительных и ложноотрицательных результатов необходимо применение стандартизованных протоколов отбора проб, выделения внРНК и анализа полученных результатов. Для выбора наиболее чувствительных и специфичных панелей внРНК необходимо проведение более масштабных проспективных когортных исследований.

Литература

- Qiu J, Xu J, Zhang K, Gu W, Nie L. Refining Cancer Management Using Integrated Liquid Biopsy. *Theranostics*. 2020; 10 (5): 2374–84. DOI: 10.7150/thno.40677.
- Shen J, Kong W, Wu Y, Ren H, Wei J, Yang Y, et al. Plasma mRNA as liquid biopsy predicts chemo-sensitivity in advanced gastric cancer patients. *J Cancer*. 2017; 8 (3): 434–2. DOI: 10.7150/jca.17369.
- Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med*. 2017; 15 (1): 75.
- Buder A, Tomuta C, Filipits M. The potential of liquid biopsies. *Curr Opin Oncol*. 2016; 28: 130–134.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3902–8.
- Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2689–92.
- Egyud M, Sridhar P, Devaiah A, Yamada E, Saunders S, Ståhlberg A, et al. Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck*. 2019; 41 (5): 1351–8. DOI: 10.1002/hed.25563.
- Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *JNCI*. 2000; 92 (22): 1805–11. Available from: <https://doi.org/10.1093/jnci/92.22.1805>.
- Shaw JA, Smith BA, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1119–24.
- Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trepo C, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from the Gambia. *J Natl Cancer Inst* (Bethesda). 2000; 92 (2): 148–53. DOI: 10.1093/jnci/92.2.148.
- Koprenski MS, Benko FA, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke C. D. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* (Bethesda). 2000; 92: 918–23.
- Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 1527–32.
- Goessl C, Heicappell R, Muncher R, Anker P, Stroun M, Krause H, et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58: 4728–32.
- Bryzgunova OE, Laktionov PP. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. *Molecular Biology*. 2017; 51 (2): 167–83 DOI: 10.1134/S0026893317010071.
- Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184 (3): 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
- Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenatal Diagn*. 2000; 20 (10): 795–8.
- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*. 2001; 47 (12): 2164–5.
- Tong Y, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta*. 2006; 363: 187–96.
- Pachot A, Blond J-L, Mouglin B, Miossec P. Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *Biotechnol*. 2004; 114 (1–2): 121–4. DOI: 10.1016/j.biotech.2004.07.001.
- Hasselmann DO, Rappl G, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep*. 2001; 8 (1): 115–8. DOI: 10.3892/or.8.1.115.
- El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2004; 50: 564–73. DOI: 10.1373/clinchem.2003.028506.
- Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, Besic N, Stegel V. Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. *Oncology Reports*. 2004; 11 (1): 245–52. DOI: 10.3892/or.11.1.245.
- Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest*. 2001; 81 (5): 767–9. DOI: 10.1038/labinvest.3780285.
- Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res*. 2001; 7 (9): 2821–5.
- Perhavec A, Cerkovnik P, Novakovic S, Zgajnar J. The hTERT mRNA in plasma samples of early breast cancer patients, non-cancer patients and healthy individuals. *Neoplasma*. 2008; 55: 549–54.
- Lee G-W, Kim J-Y, Koh E-H, Kang D, Choi DS, Maeng K-Y, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*. 2012; 11 (4): 4034–42. DOI: 10.4238/2012.November.28.2.
- Silva J, García V, García JM, Peña C, Domínguez G, Díaz R, et al. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2007; 9: R55.
- Zhang K, Luo Z, Zhang Y, Wang Y, Cui M, Liu L, et al. Detection and Analysis of circulating large intergenic non-coding RNA regulator of reprogramming in plasma for breast cancer. *Thorac Cancer*. 2018; 9 (1): 66–74. DOI: 10.1111/1759-7714.12537.
- Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, et al. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res*. 2004; 10 (5): 1613–7.
- Abdelghany AM, Rezk NS, Osman MM, Hamid AI, Al-Breedy AM,

- Abdelsattar HA. Using Lamin B1 mRNA for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma: a cross-sectional diagnostic accuracy study. *F1000Res*. 2018; 7: 1339. DOI: 10.12688/f1000research.14795.1.
31. Fu X, Shen C, Li G, Zhang X, Wen Z. Quantitative detection of plasma level of human telomerase reverse transcriptase mRNA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Southern Medical University*. 2015; 35 (6): 894–7.
32. Leng Q, Tsou J-H, Zhan M, Jiang F. Fucosylation Genes as Circulating Biomarkers for Lung Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018; 144 (11): 2109–15. DOI: 10.1007/s00432-018-2735-0.
33. Rainer TH, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Chiu RW, Joynt GM, et al. Effects of filtration on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA in the plasma of trauma patients and healthy individuals. *Clin Chem*. 2004; 50 (1): 206–8. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022533.
34. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem*. 2004; 50: 1668–70.
35. Hamaoui K, Butt A, Powrie J, Swaminathan R. Realtime quantitative PCR measurement of circulatory rhodopsin mRNA in healthy subjects and patients with diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1022: 152–6. DOI: 10.1196 / annals.1318.025.
36. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet*. 2004; 41: 461–7. DOI: 10.1136/jmg.2003.016881.
37. Hu X, Li D, Zhang W, Zhou J, Tang B, Li L. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2012; 286 (6): 1537–43. DOI: 10.1007/s00404-012-2456-6.
38. Galdiero F, Romano A, Pasquinelli R, Pignata S, Greggi S, Vuttariello E, et al. Detection of high mobility group A2 specific mRNA in the plasma of patients affected by epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015; 6 (22): 19328–35. DOI: 10.18632/oncotarget.2896.
39. Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, et al. Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411 (19–20): 1452–6. DOI: 10.1016/j.cca.2010.05.040.
40. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaría J, Aliño SF, Dasí F. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12: 69–77. DOI: 10.1517/14712598.2012.685716.
41. Peinado H, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012; 18: 883–91.
42. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015; 527 (7578): 329–35. DOI: 10.1038/nature15756.
43. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 255–89. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
44. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19 (4): 213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
45. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med*. 2018; 379 (10): 958–66. DOI: 10.1056/NEJMra1704286.
46. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Na Cell Biol*. 2007; 9 (6): 654–59. DOI: 10.1038/ncb1596.
47. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13 (1): 17–24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.
48. Li Y, Zhao J, Yu S, Wang Z, He X, Su Y, et al. Extracellular Vesicles Long RNA Sequencing reveals abundant mRNA, circRNA, and lncRNA in human blood as potential biomarkers for cancer diagnosis. *Clin Chem*. 2019; 65 (6): 798–808. DOI: 10.1373/clinchem.2018.301291.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116 (2): 281–97. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
50. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010; 56 (11): 1733–41. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.
51. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33 (2): 186–92. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.
52. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 (12): 5003–8. DOI: 10.1073/pnas.1019055108.
53. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13: 423–33. DOI: 10.1038/ncb2210.
54. Van Eijndhoven MA, Zijlstra JM, Groenewegen NJ, Drees EE, van Niele S, Baglio SR, et al. Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. *JCI Insight*. 2016; 1 (19): e89631. DOI: 10.1172/jci.insight.89631.
55. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, et al. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (4): 7757–70. DOI: 10.3390/ijms14047757.
56. Shen W, Song M, Liu J, Qiu G, Li T, Hu Y, et al. MiR-26a Promotes Ovarian Cancer Proliferation and Tumorigenesis. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e86871. DOI: 10.1371/journal.pone.0086871.
57. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2013; 132 (7): 1602–12. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.27799>.
58. Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One*. 2013; 8 (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0053141.
59. Müllauer L. Next generation sequencing: Clinical applications in solid tumours. *Memo*. 2017; 10 (4): 244–7. DOI: 10.1007/s12254-017-0361-1.
60. Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances. *Biosens Bioelectron*. 2017; 90: 174–86. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.045.
61. Giuffrida MC, Zanolini LM, D'Agata R, Finotti A, Gambiari R, Spoto G. Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (6): 1533–43. DOI: 10.1007/s00216-014-8405-4.
62. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14 (9): 623–31. DOI: 10.1038/nrc3820.

References

1. Qiu J, Xu J, Zhang K, Gu W, Nie L. Refining Cancer Management Using Integrated Liquid Biopsy. *Theranostics*. 2020; 10 (5): 2374–84. DOI: 10.7150/thno.40677.
2. Shen J, Kong W, Wu Y, Ren H, Wei J, Yang Y, et al. Plasma mRNA as liquid biopsy predicts chemo-sensitivity in advanced gastric cancer patients. *J Cancer*. 2017; 8 (3): 434–2. DOI: 10.7150/jca.17369.
3. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med*. 2017; 15 (1): 75.
4. Buder A, Tomuta C, Filipits M. The potential of liquid biopsies.

- Curr Opin Oncol. 2016; 28: 130–134.
5. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3902–8.
 6. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 2689–92.
 7. Egyud M, Sridhar P, Devaiah A, Yamada E, Saunders S, Ståhlberg A, et al. Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck*. 2019; 41 (5): 1351–8. DOI: 10.1002/hed.25563.
 8. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *JNCI*. 2000; 92 (22): 1805–11. Available from: <https://doi.org/10.1093/jnci/92.22.1805>.
 9. Shaw JA, Smith BA, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1119–24.
 10. Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trepo C, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from the Gambia. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*. 2000; 92 (2): 148–53. DOI: 10.1093/jnci/92.2.148.
 11. Koprenski MS, Benko FA, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke C. D. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*. 2000; 92: 918–23.
 12. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 1527–32.
 13. Goessl C, Heicappell R, Muncher R, Anker P, Stroun M, Krause H, et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58: 4728–32.
 14. Bryzgunova OE, Laktionov PP. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. *Molecular Biology*. 2017; 51 (2): 167–83 DOI: 10.1134/S0026893317010071.
 15. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184 (3): 414–9. DOI: 10.1067/mob.2001.109594.
 16. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenatal Diagn*. 2000; 20 (10): 795–8.
 17. Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*. 2001; 47 (12): 2164–5.
 18. Tong Y, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta*. 2006; 363: 187–96.
 19. Pachot A, Blond J-L, Mouglin B, Miossec P. Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *Biotechnol*. 2004; 114 (1–2): 121–4. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.07.001.
 20. Hasselmann DO, Rappl G, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Detection of tumor-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep*. 2001; 8 (1): 115–8. DOI: 10.3892/or.8.1.115.
 21. El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2004; 50: 564–73. DOI: 10.1373/clinchem.2003.028506.
 22. Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, Besic N, Stegel V. Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. *Oncology Reports*. 2004; 11 (1): 245–52. DOI: 10.3892/or.11.1.245.
 23. Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest*. 2001; 81 (5): 767–9. DOI: 10.1038/labinvest.3780285.
 24. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res*. 2001; 7 (9): 2821–5.
 25. Perhavec A, Cerkovnik P, Novakovic S, Zgajnar J. The hTERT mRNA in plasma samples of early breast cancer patients, non-cancer patients and healthy individuals. *Neoplasma*. 2008; 55: 549–54.
 26. Lee G-W, Kim J-Y, Koh E-H, Kang D, Choi DS, Maeng K-Y, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*. 2012; 11 (4): 4034–42. DOI: 10.4238/2012.November.28.2.
 27. Silva J, García V, García JM, Peña C, Domínguez G, Díaz R, et al. Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2007; 9: R55.
 28. Zhang K, Luo Z, Zhang Y, Wang Y, Cui M, Liu L, et al. Detection and Analysis of circulating large intergenic non-coding RNA regulator of reprogramming in plasma for breast cancer. *Thorac Cancer*. 2018; 9 (1): 66–74. DOI: 10.1111/1759-7714.12537.
 29. Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, et al. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res*. 2004; 10 (5): 1613–7.
 30. Abdelghany AM, Rezk NS, Osman MM, Hamid AI, Al-Breedy AM, Abdelsattar HA. Using Lamin B1 mRNA for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma: a cross-sectional diagnostic accuracy study. *F1000Res*. 2018; 7: 1339. DOI: 10.12688/f1000research.14795.1.
 31. Fu X, Shen C, Li G, Zhang X, Wen Z. Quantitative detection of plasma level of human telomerase reverse transcriptase mRNA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Southern Medical University*. 2015; 35 (6): 894–7.
 32. Leng Q, Tsou J-H, Zhan M, Jiang F. Fucosylation Genes as Circulating Biomarkers for Lung Cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018; 144 (11): 2109–15. DOI: 10.1007/s00432-018-2735-0.
 33. Rainer TH, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Chiu RW, Joynt GM, et al. Effects of filtration on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA in the plasma of trauma patients and healthy individuals. *Clin Chem*. 2004; 50 (1): 206–8. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022533.
 34. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschann H, et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem*. 2004; 50: 1668–70.
 35. Hamaoui K, Butt A, Powrie J, Swaminathan R. Realtime quantitative PCR measurement of circulatory rhodopsin mRNA in healthy subjects and patients with diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1022: 152–6. DOI: 10.1196 / annals.1318.025.
 36. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet*. 2004; 41: 461–7. DOI: 10.1136/jmg.2003.016881.
 37. Hu X, Li D, Zhang W, Zhou J, Tang B, Li L. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2012; 286 (6): 1537–43. DOI: 10.1007/s00404-012-2456-6.
 38. Galdiero F, Romano A, Pasquinielli R, Pignata S, Greggi S, Vuttariello E, et al. Detection of high mobility group A2 specific mRNA in the plasma of patients affected by epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015; 6 (22): 19328–35. DOI: 10.18632/oncotarget.2896.
 39. Deligezer U, Yaman F, Darendeliler E, Dizdar Y, Holdenrieder S, Kovancilar M, et al. Post-treatment circulating plasma BMP6 mRNA and H3K27 methylation levels discriminate metastatic prostate cancer from localized disease. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411 (19–20): 1452–6. DOI: 10.1016/j.cca.2010.05.040.
 40. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaría J, Aliño SF, Dasí F. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12: 69–77. DOI: 10.1517/14712598.2012.685716.
 41. Peinado H, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012; 18: 883–91.

42. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015; 527 (7578): 329–35. DOI: 10.1038/nature15756.
43. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 255–89. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
44. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19 (4): 213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
45. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med*. 2018; 379 (10): 958–66. DOI: 10.1056/NEJMr1704286.
46. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Na Cell Biol*. 2007; 9 (6): 654–59. DOI: 10.1038/ncb1596.
47. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13 (1): 17–24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.
48. Li Y, Zhao J, Yu S, Wang Z, He X, Su Y, et al. Extracellular Vesicles Long RNA Sequencing reveals abundant mRNA, circRNA, and lncRNA in human blood as potential biomarkers for cancer diagnosis. *Clin Chem*. 2019; 65 (6): 798–808. DOI: 10.1373/clinchem.2018.301291.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116 (2): 281–97. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
50. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010; 56 (11): 1733–41. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.
51. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33 (2): 186–92. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.
52. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108 (12): 5003–8. DOI: 10.1073/pnas.1019055108.
53. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13: 423–33. DOI: 10.1038/ncb2210.
54. Van Eijndhoven MA, Zijlstra JM, Groenewegen NJ, Drees EE, van Niele S, Baglio SR, et al. Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. *JCI Insight*. 2016; 1 (19): e89631. DOI: 10.1172/jci.insight.89631.
55. Watahiki A, Macfarlane RJ, Gleave ME, Crea F, Wang Y, Helgason CD, et al. Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (4): 7757–70. DOI: 10.3390/ijms14047757.
56. Shen W, Song M, Liu J, Qiu G, Li T, Hu Y, et al. MiR-26a Promotes Ovarian Cancer Proliferation and Tumorigenesis. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e86871. DOI: 10.1371/journal.pone.0086871.
57. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2013; 132 (7): 1602–12. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.27799>.
58. Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One*. 2013; 8 (1). DOI: 10.1371/journal.pone.0053141.
59. Müllauer L. Next generation sequencing: Clinical applications in solid tumours. *Memo*. 2017; 10 (4): 244–7. DOI: 10.1007/s12254-017-0361-1.
60. Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances. *Biosens Bioelectron*. 2017; 90: 174–86. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.045.
61. Giuffrida MC, Zanolini LM, D'Agata R, Finotti A, Gambari R, Spoto G. Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (6): 1533–43. DOI: 10.1007/s00216-014-8405-4.
62. Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14 (9): 623–31. DOI: 10.1038/nrc3820.

УСТОЙЧИВОСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* К КОЛИСТИНУ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФИТНЕС

О. В. Шамина¹✉, О. А. Крыжановская¹, А. В. Лазарева¹, Н. М. Алябьева¹, Н. А. Маянский²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

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

В последние годы широкое использование колистина в лечении инфекционных заболеваний привело к появлению и распространению колистинрезистентности. По данным литературы, формирование устойчивости может приводить к затратам внутренних биологических ресурсов и снижению уровня приспособленности и поддержания жизнедеятельности (бактериального фитнеса). Целью исследования было изучить молекулярные механизмы резистентности к колистину и их влияние на бактериальный фитнес карбапенемрезистентных (карба-Р) штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов в г. Москве в 2012–2017 гг. Из 159 карба-Р-изолятов 71 изолят (45%) обладал резистентностью к колистину (минимальная подавляющая концентрация больше 2 мг/л); секвенирование по методу Сенгера позволило обнаружить механизмы устойчивости у 26 (37%) изолятов. Кривые роста были построены путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм в течение 15 ч. Конкурентный рост колистинрезистентных (кол-Р) изолятов *K. pneumoniae* оценивали относительно колистинчувствительного (кол-С) изолята. Кол-Р- и кол-С-изоляты в экспоненциальной фазе роста смешивали в пропорции 1 : 1, инкубировали в среде Луриа–Бертани и затем наносили на агар Луриа–Бертани, содержащий 10 мг/л колистина, и без него. Индекс конкуренции рассчитывали как отношение выросших кол-Р- и кол-С-колоний. Резистентность к колистину не влияла на кинетику роста *K. pneumoniae*, но снижала конкурентоспособность относительно кол-С-изолята. Тем не менее были обнаружены кол-Р-изоляты с высоким уровнем конкурентоспособности по сравнению с кол-С-изолятами такого же сиквенс-типа. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования влияния резистентности к колистину на бактериальный фитнес.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, бактериальный фитнес, колистинрезистентность, *mgrB*, сиквенс-тип

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Благодарности: авторы благодарят С. В. Поликарпову из Городской клинической больницы № 15 имени О. М. Филатова и О. В. Карасеву из Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии за предоставление изолятов *K. pneumoniae*.

Вклад авторов: О. В. Шамина — планирование и проведение исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста публикации; О. А. Крыжановская, А. В. Лазарева, Н. М. Алябьева — планирование и проведение исследования; Н. А. Маянский — научное руководство, планирование и проведение исследования, анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование было проведено с соблюдением всех правил безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Вячеславовна Шамина
Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, г. Москва, 119991; olga.shamina@inbox.ru

Статья получена: 18.05.2020 **Статья принята к печати:** 02.06.2020 **Опубликована онлайн:** 12.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032

COLISTIN RESISTANCE OF CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS: MOLECULAR MECHANISMS AND BACTERIAL FITNESS

Shamina OV¹✉, Kryzhanovskaya OA¹, Lazareva AV¹, Alyabieva NM¹, Mayanskiy NA²

¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The increasing use of colistin in the clinic has led to the emergence and spread of colistin resistance. According to the literature, antibiotic resistance can have a metabolic cost, resulting in poor adaptation and survival, i.e. reduced bacterial fitness. The aim of this study was to investigate molecular mechanisms underlying resistance to colistin and their effect on the bacterial fitness of carbapenem-resistant (carba-R) strains of *K. pneumoniae* isolated from the patients of Moscow hospitals in 2012–2017. Of 159 analyzed carba-R isolates, 71 (45%) were resistant to colistin (minimum inhibitory concentration over 2 mg/L). By conducting Sanger sequencing, we were able to identify the mechanisms underlying colistin resistance in 26 (37%) isolates. Growth curves were constructed by measuring optical density at 600 nm wavelength for 15 hours. The competitive growth of colistin-resistant (col-R) *K. pneumoniae* isolates was assessed relative to the colistin-susceptible (col-S) isolate. Col-R and col-S cultures harvested in the exponential phase were combined at the ratio of 1:1, incubated in the Luria-Bertani medium and plated onto Luria-Bertani agar plates with 10 mg/L colistin and without it. The competition index was calculated as the ratio of grown col-R and col-S colonies. Resistance to colistin did not affect the growth kinetics of *K. pneumoniae*, but did reduce the competitive ability of the bacteria as compared to the col-S isolates. However, some col-R isolates were more competitive than the col-S strains of the same sequence type. Further research is needed to elucidate the effects of colistin resistance on bacterial fitness.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, bacterial fitness, colistin resistance, *mgrB*, sequence type

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235).

Acknowledgements: the authors thank Polikarpova SV of Filatov City Clinical Hospital № 15 and Karaseva OV of the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology for *K. pneumoniae* isolates.

Author contribution: Shamina OV planned and conducted the study, analyzed the literature, analyzed and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript; Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM planned and conducted the study; Mayanskiy NA planned, conducted and supervised the study, analyzed the literature, collected, analyzed and interpreted the obtained data, and wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was carried out following the safety guidelines on the manipulations with pathogens of hazard groups III and IV.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Shamina
Lomonosovskiy prospect, 2, str. 1, Moscow, 119991; olga.shamina@inbox.ru

Received: 18.05.2020 **Accepted:** 02.06.2020 **Published online:** 12.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.032

Klebsiella pneumoniae — одна из наиболее частых причин заболеваний, требующих оказания медицинской помощи [1]. Особую обеспокоенность вызывают появление и глобальное распространение отдельных сиквенс-типов *K. pneumoniae* высокого риска, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [2, 3]. В первую очередь это относится к карбапенмрезистентным (карба-Р) *K. pneumoniae*, поскольку устойчивость к карбапенмам в большинстве случаев сочетается с резистентностью к другим антимикробным препаратам, что существенно ограничивает возможности терапии. Согласно данным мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ), большинство карба-Р-изолятов принадлежит к узкому ряду сиквенс-типов, доминирующих в структуре госпитальных популяций повсеместно [4, 5]. В настоящее время к числу глобально диссеминированных относят МЛУ-сиквенс-типы ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST258, ST395 [5, 6], а также ST307, который приобрел значимость сравнительно недавно [7].

Одним из препаратов, сохраняющих активность в отношении карба-Р грамотрицательных организмов, является поликатионный антибиотик колистин (полимиксин Е). Возросшее использование колистина в клинике на фоне распространения устойчивости к карбапенмам привело к появлению колистинрезистентности [4, 8], которая может существенно снижать эффективность антимикробной терапии и проявляться увеличением показателей смертности инфицированных колистинрезистентными (кол-Р) *K. pneumoniae* [9].

Устойчивость к колистину обусловлена модификацией липополисахарида (ЛПС), например, путем изменения его структуры, что снижает связывание антибиотика с клеточной стенкой бактерии [10]. Модификация ЛПС связана с повреждением двухкомпонентной системы PhoPQ/PmrAB и ее регулятора MgrB в результате мутаций гена *mgrB*, а также с плазмидными *mcr*-подобными генами [8, 10].

Мутации, приводящие к развитию устойчивости, дают бактериям преимущество перед чувствительными штаммами в присутствии антибиотика, однако формирование и поддержание резистентности могут быть сопряжены с определенными биологическими затратами. Последние могут быть выражены в снижении темпов роста и уменьшении конкурентоспособности (т. е. уровня поддержания жизнедеятельности, который обозначают термином «бактериальный фитнес») [11, 12] по сравнению с чувствительными штаммами в отсутствие селективного действия антибиотика [13, 14]. С учетом того, что устойчивость к колистину связана с модификацией важнейшего компонента клеточной стенки бактерий — ЛПС, колистинрезистентность может быть сопряжена со снижением бактериального фитнеса.

Целью работы было охарактеризовать генотипы карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов хирургических отделений и отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) в г. Москве, и описать молекулярные механизмы устойчивости к колистину, а также исследовать влияние колистинрезистентности на кинетику роста и конкурентоспособность этой популяции бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 159 карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* (минимальная подавляющая концентрация (МПК)

меропенема больше 8 мг/л и МПК имипенема больше 4 мг/л, согласно критериям EUCAST) [15], чувствительные и резистентные к колистину, собранные в течение 2012–2017 гг. в г. Москве от пациентов хирургических отделений и ОРИТ. В коллекцию были включены только недублирующиеся изоляты, т. е. от одного пациента — один изолят *K. pneumoniae*, включая изоляты из стерильных локусов (кровь, моча, ликвор), из респираторного тракта (аспират, мокрота), стомы, раны, зева, ануса.

МПК к меропенему, имипенему и тигециклину определяли с помощью метода Е-тестов (BioMerieux; Франция) на среде Мюллера–Хинтона (Bio Rad; Франция). Чувствительность к аминогликозидам (гентамицину, нетилмицину, амикацину), ципрофлоксацину, фосфомицину, цефотаксиму, цефепиму, цефтазидиму оценивали на автоматизированном бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux; Франция). Субстанцию колистина в форме порошка (Sigma Aldrich; Германия) использовали для определения МПК колистина с помощью метода микроразведений в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010). В качестве контроля использовали штамм *Escherichia coli* ATCC 25922. Согласно критериям EUCAST [15], пограничные значения МПК колистина для *K. pneumoniae* составляют: чувствительные ≤ 2 мг/л, резистентные > 2 мг/л.

Выявление и/или секвенирование по методу Сенгера генов *mcr-1*, *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ*, исследование аминокислотных последовательностей белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ проводили согласно ранее описанным процедурам [16]. В качестве контроля выявления гена *mcr-1* использовали *mcr-1*-положительный штамм *E. coli* (штамм предоставил НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России). Для генотипирования штаммов *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ [17]. Идентификацию вставочных элементов проводили с помощью базы данных ISfinder [18].

Для исследования бактериального фитнеса были отобраны колистинчувствительные (кол-Ч) изоляты и колистинрезистентные (кол-Р) изоляты с поврежденными *mgrB* и *mgrB* дикого типа. Использовали суточные культуры *K. pneumoniae*, выращенные на агаре Лурия–Бертани, или LB (HiMedia Laboratories Pvt. Limited; Индия), согласно ранее описанным протоколам исследования бактериального фитнеса [14]. Готовили взвесь из одной колонии в среде LB и инкубировали в орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan; Латвия) при 37 °C в течение 3 ч при постоянном перемешивании 250 об./мин. Концентрацию микроорганизмов измеряли на проточном цитометре Novocyte (ACEA Biosciences; США).

Для сравнительного анализа кривых роста кол-Ч- и кол-Р-бактерий суспензию доводили до концентрации бактериальных клеток 5×10^6 в 1 мл. Полученную бактериальную взвесь в объеме 250 мкл инкубировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в трех повторах для каждого штамма в присутствии колистина в концентрации 0, 1, 4, 16, 64 мг/л. Инкубацию проводили в многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200 (Tecan; Австрия) в течение 15 ч при 37 °C с параллельной оценкой оптической плотности при длине волны 600 нм (OP_{600}) каждые 30 мин. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (Tecan; Австрия). В качестве индикатора интенсивности роста использовали значение площади под кривой роста (ПКР), которую рассчитывали от начала экспоненциального роста до выхода кривой на плато (рис. 1) и выражали в OP_{600} за 1 ч.

Для оценки конкурентоспособности кол-Р- и кол-Ч-изолятов *K. pneumoniae* рассчитывали индекс конкуренции (ИК). Для этого суспензию кол-Р- и кол-Ч-изолятов доводили до концентрации $1,5 \times 10^3$ в 1 мл и смешивали в соотношении 1 : 1 ($1,5 \times 10^3$ в 1 мл КОЕ каждого штамма). Смесь кол-Р- и кол-Ч-изолятов, а также суспензии кол-Р- и кол-Ч-изолятов по отдельности выращивали в среде LB при 37 °C и 180 об./мин в течение 16–18 ч. По окончании инкубации бактериальные суспензии разводили в 10^5 раз и с помощью автомата для посева easySpiral (Interscience; Франция) наносили по 10 мкл на чашки Петри с агаром LB без колистина и с агаром LB, содержащим 10 мг/л колистина. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 16–18 ч. Подсчет КОЕ производили с помощью автоматического счетчика Scan 500 (Interscience; Франция). ИК рассчитывали как отношение числа кол-Р-КОЕ на чашке LB с колистином к числу кол-Ч-КОЕ на чашке LB без колистина. ИК < 1 означал сниженную конкурентоспособность кол-Р-изолята по сравнению с кол-Ч-изолятом. Эксперименты выполняли в трех повторях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS Inc; США). Значения ПКР и числа колоний представляли в виде медианы (P_{25} ; P_{75}), значения ИК выражали в виде среднего (стандартное отклонение). Различия ПКР оценивали при помощи теста Краскела–Уоллиса, парные сравнения проводили с использованием теста Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*

Все 159 карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* обладали МЛУ-фенотипом, т. е. были резистентными по меньшей мере к трем классам антимикробных препаратов. Все штаммы были устойчивы к цефалоспорином 3-го и 4-го поколений, а также имели высокий уровень резистентности к ципрофлоксацину (93%), фосфомицину (90%), нетилимицину (82%), гентамицину (84%), амикацину (50%) и колистину (45%). Большинство карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* сохраняло чувствительность к тигециклину: только у 7% была отмечена резистентность.

По данным МЛСТ, исследованные карба-Р-изоляты были распределены между 18 сиквенс-типами, но большинство (86%) относилось к пяти доминирующим сиквенс-типам: ST307 ($n = 46$, 29%), ST395 ($n = 40$, 25%), ST377 ($n = 17$, 10%), ST48 ($n = 17$, 10%) и ST23 ($n = 16$, 10%).

Механизмы устойчивости к колистину

Резистентностью к колистину обладал 71 (45%) карба-Р-изолят *K. pneumoniae*, МПК колистина для которых варьировала от 4 до 1024 мг/л и более. Расшифровка молекулярных механизмов устойчивости к колистину была начата с поиска плазмидного гена *mcr-1*, который, по данным литературы, служит наиболее частой причиной резистентности [19]. Ни в одном из 71 кол-Р-изолята *K. pneumoniae* ген *mcr-1* обнаружен не был.

Далее мы исследовали структуру гена *mgrB*, с повреждением которого может ассоциироваться устойчивость к колистину. Изменения *mgrB* были обнаружены у 23 (32%) кол-Р-изолятов (табл. 1). В 4 (17%) изолятах была выявлена делеция всего локуса *mgrB*. У 13 (56%) изолятов *mgrB* был поврежден вставочными

элементами четырех различных типов (IS1A, IS1R, ISKpn14 и ISKpn26) из семейств IS-1 и IS-5, внедренными в разные позиции *mgrB* (см. табл. 1). В гене *mgrB* у 6 (26%) кол-Р-изолятов был обнаружен новый мобильный элемент MITEKpn1, который охарактеризован в нашей недавней публикации [16].

Таким образом, 48 из 71 (68%) кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* содержали ген *mgrB* дикого типа, что требовало поиска других механизмов устойчивости к колистину. С этой целью во всех 48 кол-Р-изолятах, имевших *mgrB* дикого типа, мы проанализировали аминокислотные последовательности белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ, участвующих в процессах модификации ЛПС, повреждение которых может вызывать устойчивость к колистину [10]. Значимые изменения PmrA и/или PmrB были выявлены у трех изолятов, которые принадлежали к трем разным сиквенс-типам (ST307, ST395, ST48) с МПК колистина в диапазоне от 128 до 1024 мг/л и более (см. табл. 1).

Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес

Кинетика роста кол-Р- и кол-Ч-изолятов *K. pneumoniae* в отсутствие колистина различалась незначимо, медианы ПКР составили 4,2 (3,9; 4,3) и 4,05 (3,9; 4,6) ОП₆₀₀ за 1 ч соответственно ($p = 0,842$; табл. 2). Добавление 1 мг/л колистина резко снижало ПКР кол-Ч-изолятов до 1,9 (0,95; 4,13) ОП₆₀₀ за 1 ч ($p = 0,065$), а более высокие концентрации колистина ожидаемо полностью подавляли рост чувствительных изолятов (см. табл. 2). Кол-Р-изоляты *K. pneumoniae* сохраняли обычную кинетику роста при содержании колистина 1 мг/л и демонстрировали ее значимое снижение в присутствии 4 и 16 мг/л колистина ($p = 0,016$ и $p < 0,001$ соответственно). Почти полное угнетение роста кол-Р-изолятов обнаружено при добавлении колистина в концентрации 64 мг/л, когда ПКР составила 0,9 (0; 3,0) ОП₆₀₀ за 1 ч (см. табл. 2).

При сравнении ПКР кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB* и *mgrB* дикого типа (см. табл. 2) оказалось, что статус *mgrB* незначимо влиял на кинетику роста бактериальной популяции вне зависимости от концентрации колистина.

Затем мы провели исследование 26 кол-Р-изолятов и рассчитали ИК в экспериментах по оценке конкурентоспособности относительно карба-Ч/кол-Ч-

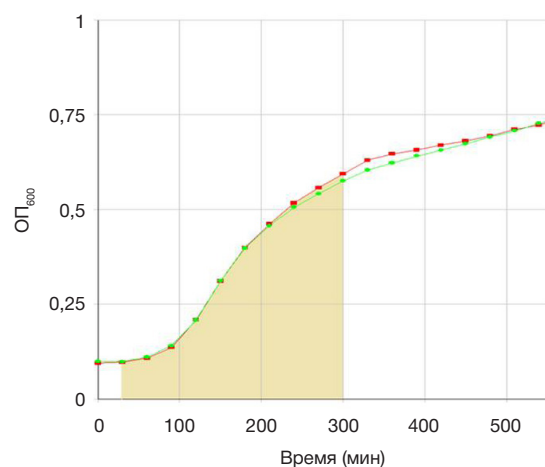


Рис. 1. Типичные кривые роста изолятов *K. pneumoniae* в среде без колистина. Заштрихованная область — площадь под кривой роста (ПКР). Красная линия — кривая роста кол-Ч-изолята; зеленая линия — кривая роста кол-Р-изолята

Таблица 1. Генотипы, фенотип и механизмы устойчивости к колистину у карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* (n = 26)

№ изолята	ST	МПК колистина, мг/л	Статус <i>mgrB</i> ^a
69-77	23	128	IS 1A, семейство IS-1 (+127/+128)
56-1790	307	64	IS 1R, семейство IS-1 (+36/+37)
68-66-1	48	16	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-2876	48	128	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-3431	48	128	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
58-2966	48	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
56-1678	48	≥ 1024	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
56-1053	48	≥ 1024	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
71-1375	307	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
76-2089	377	512	ISKpn14, семейство IS-1 (+141/+142)
64-574	307	256	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
4469	395	128	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
52-1659	395	256	ISKpn26, семейство IS-5 (+74/+75)
58-1363	307	16	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
55-148	307	64	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
56-566	307	128	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
58-1286	307	128	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
56-613	307	512	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
48-1594	307	≥ 1024	MITEKpn1, семейство IS-5 (+74/+75)
78-296	37	16	Δ <i>mgrB</i> локуса
37262	147	64	Δ <i>mgrB</i> локуса
29423	70	128	Δ <i>mgrB</i> локуса
36-2246	395	128	Δ <i>mgrB</i> локуса
46-1574	307	128	Дикий тип ^b
48-2246	395	≥ 1024	Дикий тип ^c
56-410	48	128	Дикий тип ^d

Примечание: ST — сиквенс-тип; МПК — минимальная подавляющая концентрация; ^a — в скобках указана нуклеотидная позиция встраивания вставочного элемента; ^b — изменения PmrB (T157P); ^c — изменения PmrA (A141T) и PmrB (L213M, G256R); ^d — изменения PmrB (делеция 27–30 (QLIS)).

изолята *K. pneumoniae* при их совместном культивировании (рис. 2; см. табл. 2). Среднее значение ИК составило 0,15 (0,21), при этом у 25/26 (96%) кол-Р-изолятов ИК был < 1 и варьировал от 0,01 до 0,53, а один изолят имел ИК = 1. Изоляты с диким типом и повреждением *mgrB* обладали похожими ИК, которые составили 0,19 (0,26) и 0,1 (0,1) соответственно ($p = 0,283$; см. табл. 2). Таким образом, резистентность к колистину у подавляющего числа кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* была ассоциирована со снижением конкурентоспособности по отношению к карба-Ч/кол-Ч-изолятам *K. pneumoniae*, которое не зависело от статуса гена *mgrB*.

Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес было дополнительно исследовано в карба-Р/кол-Ч и карба-Р/кол-Р парах *K. pneumoniae*, относившихся к одному сиквенс-типу. Для данных экспериментов были отобраны изоляты пяти наиболее распространенных (ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395) и одного редкого (ST147) сиквенс-типов, среди которых в коллекции имелся минимум один кол-Ч-изолят (табл. 3). Конкурентоспособность всех кол-Р-изолятов ST48, ST147, ST307 и ST377 относительно кол-Ч-изолятов аналогичных сиквенс-типов была снижена, о чем свидетельствовал ИК < 1. Результаты исследования изолятов двух других сиквенс-типов, ST23 и ST395, не были так однозначны. Один кол-Р-изолят ST23 (ИК = 1,3) и два кол-Р-изолята ST395 (ИК = 1,87 и ИК = 2,5) продемонстрировали повышенный фитнес относительно своих кол-Ч-аналогов (см. табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* в нашей коллекции относилось к пяти глобальным сиквенс-типам, причем два генотипа, ST307 и ST395, суммарно составляли 54%. По данным ряда авторов, ST307 ранее не входил в число доминирующих сиквенс-типов на территории нашей страны [20, 21], но в настоящее время становится одним из ведущих международных сиквенс-типов высокого риска [7], что согласуется с полученными нами данными.

Существенная доля (45%) исследованных нами карба-Р-изолятов была устойчива к колистину. По данным многоцентрового исследования «МАРАФОН» [2, 3], в большой выборке госпитальных *K. pneumoniae* распространенность кол-Р-изолятов была низкой, хотя и возросла с 4,5% в 2012 г. до 7,9% в 2014 г. Наши данные могут отражать общую тенденцию к повышению антибиотикорезистентности, которая затрагивает и устойчивость к колистину. Например, 15-летнее ретроспективное исследование в крупном госпитале в Афинах показало резкое увеличение доли кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* из гемокультур с 0% в 2002 г. до 26,9% в 2016 [22]. Вместе с тем высокая частота встречаемости кол-Р-штаммов в нашей коллекции могла быть связана с преобладанием изолятов, полученных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, где, по данным Feretzakis и соавт. [23], доля кол-Р-изолятов

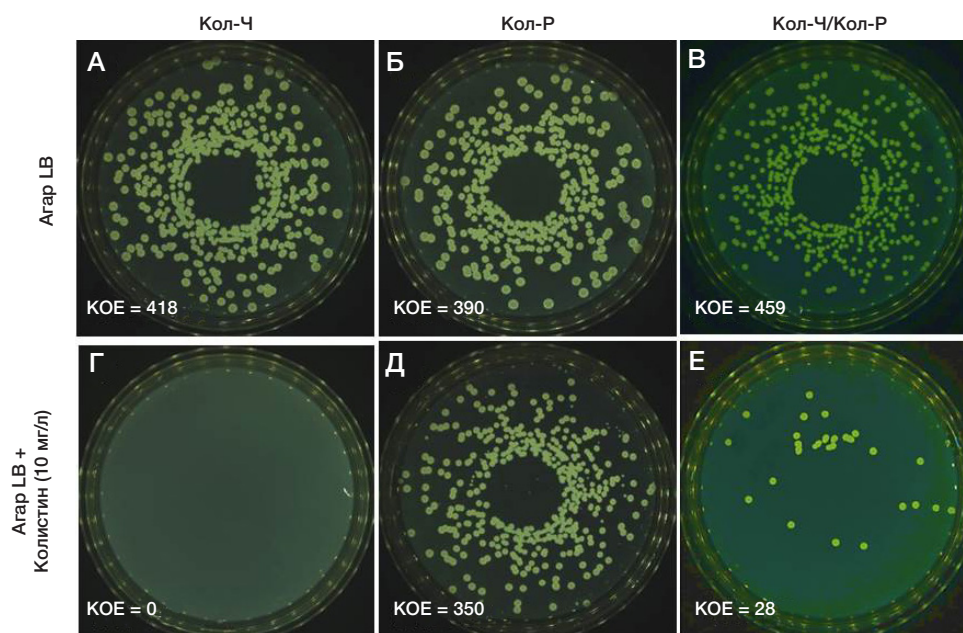


Рис. 2. Репрезентативный эксперимент по оценке конкурентоспособности колистинрезистентных *K. pneumoniae*. Кол-Ч — колистинчувствительные; кол-Р — колистинрезистентные; кол-Ч/кол-Р — смесь колистинчувствительных и колистинрезистентных изолятов; КОЕ — колониеобразующие единицы. Фотографии чашек Петри демонстрируют характер роста кол-Ч-изолятов (А, Г), кол-Р-изолятов (Б, Д) и смеси кол-Р / кол-Ч-изолятов (В, Е) *K. pneumoniae* на агаре LB без колистина (А–В) и агаре LB с содержанием 10 мг/л колистина (Г–Е). Цифры указывают число КОЕ на каждой чашке. Индекс конкурентоспособности (ИК) рассчитан как число КОЕ на LB + колистин / (число КОЕ на LB — число КОЕ на LB + колистин), т. е. КОЕ «Е» / (КОЕ «Б» — КОЕ «Е»)

K. pneumoniae можеткратно превышать долю таковых в других отделениях (40 против 13,8%). Кроме того, прямое сравнение исследований, в которых использованы различные способы тестирования устойчивости к колистину, может иметь известные трудности. Так, эпидемиологические Е-тесты могут давать высокую долю ошибочных результатов по сравнению с референсным методом микроразведений, препятствуя выявлению реальной частоты колистинрезистентности [9, 20].

Наличие устойчивости к колистину не влияло на кинетику роста в отсутствие антибиотика и не зависело от статуса гена *mgrB*, что согласуется с результатами предыдущих исследований [24]. В противоположность этому, устойчивость к колистину у *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* сопровождается выраженными нарушениями динамики роста бактериальной популяции [13, 25], что может объяснять сравнительно высокую

распространенность энтеробактерий с хромосомной устойчивостью к колистину по сравнению с кол-Р *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

В то же время подавляющее большинство кол-Р-изолятов демонстрировали снижение конкурентоспособности по сравнению с кол-Ч-изолятами *K. pneumoniae*, что характерно и для других видов бактерий, в частности *A. baumannii* [13] и *P. aeruginosa* [25]. Описано снижение бактериального фитнеса у кол-Р *K. pneumoniae*, являющихся носителями гена *mcr-1* [26].

Интересные результаты были получены в конкурентных экспериментах с кол-Р- и кол-Ч-изолятами *K. pneumoniae* одного сиквенса-типа, т. е. бактериями с очень схожим генотипом, но различающимися чувствительностью к колистину. Было исследовано шесть разных сиквенса-типов, и большинство протестированных кол-Р-изолятов демонстрировали снижение ИК. В то же время у двух кол-

Таблица 2. Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес (кинетику роста и индекс конкуренции) карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*

Изоляты	МПК колистина, мг/л; Ме (P ₂₅ ; P ₇₅)	ПКР (ОП ₆₀₀ за 1 ч), Ме (P ₂₅ ; P ₇₅)					ИК, среднее (СО)
		Концентрация колистина, мг/л					
		0	1	4	16	64	
Кол-Ч (n = 6)	< 1 (< 1; < 1)	4,05 (3,9; 4,6)	1,9 (0,95; 4,13)	0 (0; 4,03)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	НП
Кол-Р (n = 32)	256 (128; 512)	4,2 (3,9; 4,3) ^a	4,1 (3,7; 4,2) ^б	3,9 (3,2; 4,15) ^a	3,3 (2,2; 3,45) ^г	0,9 (0; 3) ^г	0,15 (0,21) ^е
Из них:							
<i>mgrB</i> , поврежденный (n = 15)	256 (128; 512)	4,1 (3,9; 4,2)	4 (3,9; 4,2)	3,9 (3,1; 4,1)	3,4 (0,9; 3,7)	1,1 (0; 3,3)	0,1 (0,1) ^ж
<i>mgrB</i> , дикий тип (n = 17)	256 (96; 512)	4,3 (3,85; 4,4) ^а	4,2 (3,53; 4,25) ^а	3,8 (3,18; 4,25) ^а	3,25 (2,75; 3,43) ^а	0,9 (0; 3) ^а	0,19 (0,26) ^{а, и}

Примечание: МПК — минимальная подавляющая концентрация; ПКР — площадь под кривой роста; Ме — медиана; P_{25} и P_{75} — 25-й и 75-й перцентили; ИК — индекс конкуренции; СО — стандартное отклонение; кол-Ч — колистинчувствительные; кол-Р — колистинрезистентные; НП — не применимо; ^a — $p = 0,842$ при сравнении с ПКР кол-Ч-изолятов; ^b — $p = 0,19$ при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^c — $p = 0,016$ при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^d — $p < 0,001$ при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов при концентрации колистина 0 мг/л; ^e — $p > 0,05$ при сравнении с ПКР кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB*; ^k — $n = 26$; ^{*} — $n = 11$; ^u — $n = 15$; ^u — $p = 0,283$ при сравнении с ИК кол-Р-изолятов с поврежденным *mgrB*.

Таблица 3. Индекс конкуренции кол-Р- и кол-Ч-изолятов карба-Р *K. pneumoniae* одинаковых сиквенс-типов

Кол-Р-изоляты		Механизм кол-Р	Число КОЕ (СО)		ИК (СО)
ST	№ изолята		Кол-Р (агар LB + колистин, 10 мг/л)	Кол-Ч + кол-Р (агар LB)	
ST23	37261	Неизвестный	80	141	1,3
	69–77	Поврежденный <i>mgrB</i>	39	168	0,3
	37243	Неизвестный	25	112	0,29
	37224	Неизвестный	5	114	0,05
Итого ST23:			37 (32)	134 (26)	0,48 (0,56)
ST395	52–1659	Поврежденный <i>mgrB</i>	88	135	1,87
	78–1127	Неизвестный	3	138	0,02
	59–397	Неизвестный	110	153	2,5
	4469	Поврежденный <i>mgrB</i>	17	141	0,14
Итого ST395:			55 (53)	142 (8)	1,1 (1,24)
ST377	76–1648	Неизвестный	90	335	0,37
	76–2053	Неизвестный	38	282	0,16
	76–2089	Поврежденный <i>mgrB</i>	79	232	0,52
Итого ST377:			69 (27)	283 (52)	0,35 (0,18)
ST307	64–574	Поврежденный <i>mgrB</i>	33	287	0,13
	56–566	Поврежденный <i>mgrB</i>	68	210	0,48
	71–1375	Поврежденный <i>mgrB</i>	63	196	0,47
Итого ST307:			55 (19)	231 (49)	0,36 (0,2)
ST147	37–262	Поврежденный <i>mgrB</i>	3	201	0,02
ST48	58–2966	Поврежденный <i>mgrB</i>	8	152	0,06

Примечание: ИК — индекс конкуренции; СО — стандартное отклонение.

Р-ST395-изолятов и одного кол-Р-ST23-изолята уровень конкурентоспособности оказался выше, чем у кол-Ч-изолятов аналогичных ST.

Это можно объяснить наличием в их геноме возможных компенсаторных мутаций, как было описано в случае с резистентностью к фторхинолонам и колистину у *Escherichia coli* [27] и *A. baumannii* [28]. Компенсаторные мутации в противовес мутациям, приводящим к резистентности, увеличивают бактериальный фитнес резистентных изолятов и тем самым способствуют распространению устойчивости даже в отсутствие селективного воздействия антибиотика [27, 28].

Таким образом, устойчивость к колистину широко распространена в популяции карба-Р-изолятов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов в г. Москве. Настораживающая эпидемиологическая ситуация в отношении кол-Р-бактерий требует проведения дальнейшего тщательного мониторинга.

ВЫВОДЫ

Среди сиквенс-типов карба-Р-изолятов *K. pneumoniae* в нашей коллекции лидируют ST307 и ST395, а ведущим механизмом устойчивости к колистину является изменение гена *mgrB* различными вставочными элементами.

Изучение бактериального фитнеса кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* позволило определить, что устойчивость к колистину не влияет на кинетику роста в его отсутствие и не зависит от статуса гена *mgrB*; подавляющее большинство кол-Р-изолятов *K. pneumoniae* имеют сниженную конкурентоспособность по сравнению с кол-Ч-изолятами, однако в рамках одного сиквенс-типа встречаются кол-Р-изоляты с повышенной конкурентоспособностью. Это определяет необходимость дальнейшего исследования бактериального фитнеса для понимания причин распространения резистентности к колистину среди энтеробактерий.

Литература

1. Суворова М. П., Яковлев С. В., Белобородов В. Б., Басин Е. Е., Елисеева К. В., Ковеленов С. В. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. Антибиотики и химиотерапия. 2016; 61 (5–6): 32–42.
2. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В., Микотина А. В., Дехнич А. В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017; 19 (1): 49–56.
3. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю., Иванчик Н. В., Тимохова А. В., Дехнич А. В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 г. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 16 (4): 254–65.
4. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front Microbiol. 2016; 7: 1–30.
5. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. Trends Microbiol. 2016; 24 (12): 944–56.

6. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, et al. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (3): 620–25.
7. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74 (3): 577–81.
8. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014; 44 (1): 8–15.
9. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017; 64 (6): 711–8.
10. Poirel L, Aurelie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (2): 557–96.
11. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (4): 928–32.
12. Ternent L, Dyson RJ, Krachler AM, Jabbari S. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-virulence treatment. *J Theor Biol.* 2015; 372: 1–11.
13. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (1): 518–26.
14. Choi MJ, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (11): 6763–73.
15. eucast.org [Internet]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Break- point tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0; c2018 [cited 2018 Dec 25]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
16. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Polikarpova SV, Karaseva OV, et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the *mgrB* gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55 (2): 105850.
17. *Klebsiella pneumoniae* MLST [база данных]. Доступно по ссылке: <http://www.pasteur.fr/mlst/>.
18. ISfinder database [Internet] [cited 2018 Nov 18]. Available from: <http://www-is.biotoul.fr/is.html>.
19. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48 (6): 583–91.
20. Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Поликарпова С. В., Карасёва О. В., Чеботарь И. В. и др. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 646–50.
21. Агеев В. А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в Санкт-Петербурге [диссертация]. СПб., 2016.
22. Tansarli GS, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52 (3): 397–403.
23. Feretzakis G, Loupelis E, Sakagianni A, Skarmoutsou N, Michelidou S, Velentza A, et al. A 2-year single-centre audit on antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* strains from an intensive care unit and other wards in a general public hospital in Greece. *Antibiotics (Basel).* 2019; 8 (2): 62.
24. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59 (5): 2898–900.
25. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (2): 1019–30.
26. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnelli RA, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (6): 1604–10.
27. Marcusson LL, Fridtjof-Møller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (8): e1000541.
28. Mu X, Wang N, Li X, Shi K, Zhou Z, Yu Y, et al. The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1715.

References

1. Suvorova MP, Yakovlev SV, Beloborodov VB, Basin EE, Eliseeva KV, Kovelonov SV. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nykh infektsiy v lechebnykh uchrezhdeniyakh Rossii: issledovanie ERGINI. Antibiotiki i khimioterapiya. 2016; 61 (5–6): 32–42. Russian.
2. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Mikotina AV, Dekhnich AV et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013–2014. *CMAC.* 2017; 19 (1): 49–56.
3. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Timokhova AV, Dekhnich AV et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study «MARATHON» 2011–2012. *CMAC.* 2014; 16 (4): 254–65.
4. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1–30.
5. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* 2016; 24 (12): 944–56.
6. Izdebski R, Baraniak A, Zabicka D, Machulska M, Urbanowicz P, Fiett J, et al. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (3): 620–25.
7. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, et al. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74 (3): 577–81.
8. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2014; 44 (1): 8–15.
9. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA et al. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis.* 2017; 64 (6): 711–8.
10. Poirel L, Aurelie J, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30 (2): 557–96.
11. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67 (4): 928–32.
12. Ternent L, Dyson RJ, Krachler AM, Jabbari S. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-

- virulence treatment. J Theor Biol. 2015; 372: 1–11.
13. Beceiro A, Moreno A, Fernandez N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (1): 518–26.
 14. Choi MJ, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (11): 6763–73.
 15. eucast.org [Internet]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Break- point tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0; c2018 [cited 2018 Dec 25]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
 16. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Alyabieva NM, Polikarpova SV, Karaseva OV, et al. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEKpn1 in the *mcrB* gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia. Int J Antimicrob Agents. 2020; 55 (2): 105850.
 17. *Klebsiella pneumoniae* MLST [baza dannyh]. Available from: <http://www.pasteur.fr/mlst/>. Russian.
 18. ISfinder database [Internet] [cited 2018 Nov 18]. Available from: <http://www-is.biotoul.fr/is.html>.
 19. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. 2016; 48 (6): 583–91.
 20. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Polikarpova SV, Karaseva OV, Chebotar IV et al. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Klin Lab Diagn. 2018; 63 (10): 646–50.
 21. Ageevets VA. Molekulyarnaya kharakteristika produktentov karbapenemaz semeystva Enterobacteriaceae, vydelennykh v Sankt-Peterburge [dissertatsiya]. Spb., 2016. Russian.
 22. Tansarli GS, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. Int J Antimicrob Agents. 2018; 52 (3): 397–403.
 23. Feretzakis G, Loupelis E, Sakagianni A, Skarmoutsou N, Michelidou S, Velentza A, et al. A 2-year single-centre audit on antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* strains from an intensive care unit and other wards in a general public hospital in Greece. Antibiotics (Basel). 2019; 8 (2): 62.
 24. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mcrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (5): 2898–900.
 25. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56 (2): 1019–30.
 26. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, et al. Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2018; 73 (6): 1604–10.
 27. Marcusson LL, Frimodt-Møller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. PLoS Pathog. 2009; 5 (8): e1000541.
 28. Mu X, Wang N, Li X, Shi K, Zhou Z, Yu Y, et al. The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2016; 7: 1715.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ ПАТОГЕНОВ ГРУППЫ ESKAPE

Н. С. Купцов , М. А. Корниенко, Р. Б. Горodничев, Д. И. Данилов, М. В. Малахова, Т. В. Парфенова, Г. И. Макаренко, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Ежегодный рост числа случаев выявления бактерий с множественной лекарственной устойчивостью делает актуальной задачу поиска альтернативы применяемым антибиотикам. Такой альтернативой могут быть препараты на основе вирулентных бактериофагов. Целью работы было оценить эффективность коммерческих фаговых препаратов и моноизолятов бактериофагов, выделенных из природных источников, против клинических штаммов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Была собрана коллекция из 147 штаммов, типированных методом МЛСТ. Оценка эффективности бактериофагов проводили методом спот-тестирования. Наиболее эффективными оказались препараты против *S. aureus* («Бактериофаг стафилококковый», 86%), *K. pneumoniae* («Пиобактериофаг поливалентный очищенный», 87,8%) и *P. aeruginosa* («Бактериофаг псевдомонас аэругиноза», 87,5%; «Пиобактериофаг комплексный», 79,5–90%; «Пиобактериофаг поливалентный очищенный», 90–92,5%). Для *E. faecium* эффективность препарата «Интести-бактериофаг» составила лишь 4,2%. При этом эффективность терапевтических препаратов, активных против *S. aureus* и *K. pneumoniae*, была выше эффективности отдельных моноизолятов бактериофагов (фаг *S. aureus* vB_SauP-436-3w — 60%, фаг *K. pneumoniae* vB_Kp_M_Seu621 — 5,9%). Таким образом, исследуемые препараты обладают высокой активностью против штаммов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. aureus*. В свою очередь препаратов, действующих против остальных членов группы ESKAPE-патогенов (*Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter cloacae*), а также эффективных против *E. faecium*, не представлено на рынке, что подчеркивает необходимость поиска новых бактериофагов.

Ключевые слова: бактериофаги, бактериофаговая терапия, микробиология, ESKAPE-патогены, бактерии

Финансирование: исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка персонализированного подхода терапии инфекционных процессов с применением вирулентных бактериофагов» (ШИФР: Бактериофаг).

Благодарности: авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за секвенирование бактериальных генов для мультилокусного секвенирования-типирования штаммов.

Вклад авторов: Н. С. Купцов — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; М. А. Корниенко — план исследований, обработка данных, написание статьи; Р. Б. Горodничев, Т. В. Парфенова — набор и обработка данных; Д. И. Данилов, М. В. Малахова — набор данных; Г. И. Макаренко — сбор материала; Е. А. Шитиков — обработка данных, написание статьи; Е. Н. Ильина — написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: вся экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ Для корреспонденции: Никита Сергеевич Купцов
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; kuptsovns@gmail.com

Статья получена: 06.05.2020 Статья принята к печати: 20.05.2020 Опубликована онлайн: 25.05.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.029

EFFICACY OF COMMERCIAL BACTERIOPHAGE PRODUCTS AGAINST ESKAPE PATHOGENS

Kuptsov NS , Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, Makarenko GI, Shitikov EA, Ilna EN

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The ever-rising prevalence of multidrug-resistant bacteria necessitates the search for a therapeutic alternative to antibiotics. Using therapeutic products based on virulent bacteriophages might provide such an alternative. The aim of our study was to evaluate the efficacy of commercial phage products and natural bacteriophage monoisolates recovered from environmental sources against clinical strains of *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. We compiled a collection of 147 strains that were subsequently genotyped using the MLST method. The efficacy of bacteriophages was evaluated in spot tests. The highest efficacy was demonstrated by "Staphylococcal bacteriophage" (86%, effective against *S. aureus*), "Purified polyvalent pyobacteriophage" (87.8%, effective against *K. pneumoniae*), and a group of phage products against *P. aeruginosa*, including "Pseudomonas aeruginosa bacteriophage" (87.5%), "Complex pyobacteriophage" (79.5–90%) and "Purified polyvalent pyobacteriophage" (90–92.5%). The efficacy of "Intesti bacteriophage", which targets *E. faecium*, was 4.2%. The efficacy of commercial phage products against *S. aureus* and *K. pneumoniae* was higher than the efficacy of individual phage monoisolates (60% for the *S. aureus* phage vB_SauP-436-3w and 5.9% for the *K. pneumoniae* phage vB_Kp_M_Seu621). Thus, all tested commercial phage products were highly effective against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. There are no commercial phage products on the market against other ESKAPE pathogens, including *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacter cloacae*. Besides, there are no effective phage products against *E. faecium*. This dictates the need for new effective bacteriophages against these species.

Keywords: bacteriophages, phage therapy, microbiology, ESKAPE pathogens, bacteria

Funding: all study expenses were covered by the funds allocated for the State Assignment on the *Development of a personalized approach to the therapy of infections using virulent bacteriophages* (Code: Bacteriophage).

Acknowledgements: the authors thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, the Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency for their help with bacterial gene sequencing and for subsequent multilocus sequencing typing.

Author contribution: Kuptsov NS — study plan; data acquisition and analysis; manuscript preparation; Kornienko MA — study plan; data analysis; manuscript preparation; Gorodnichev RB, Parfenova TV — data acquisition and analysis; Danilov DI, Malakhova MV — data acquisition; Makarenko GI — sample collection; Shitikov EA — data analysis; manuscript preparation; Ilna EN — manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in strict compliance with the sanitary norms and epidemiological safety standards specified in the guidelines on the work with microorganisms belonging to hazard groups III–IV and causative agents of parasitic diseases (Guidelines 1.3.2322-08); supplementary guidelines № 1 to the guidelines on the work with microorganisms belonging to hazard groups III–IV and causative agents of parasitic diseases (Guidelines 1.3.2518-09), sanitary and epidemiologic requirements for the handling of medical waste (Sanitary norms and regulations 2.1.7.2790-10), and Federal clinical recommendations on the rational use of bacteriophages in clinical and epidemiological practice.

✉ Correspondence should be addressed: Nikita S. Kuptsov
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; kuptsovns@gmail.com

Received: 06.05.2020 Accepted: 20.05.2020 Published online: 25.05.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.029

С каждым годом в мире растет доля бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Под определение МЛУ-штаммов попадают штаммы бактерий, обладающие устойчивостью к трем и более антибактериальным препаратам [1]. Бактериальные инфекции, вызываемые МЛУ-штаммами, входят в список самых опасных угроз для мирового общественного здравоохранения. Наибольшее количество случаев устойчивости детектируют среди так называемых ESKAPE-патогенов (от начальных букв *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*). Бактерии этой группы вызывают угрожающие жизни внутрибольничные инфекции, особенно у людей с ослабленным иммунитетом и хроническими заболеваниями [2–4].

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, бактериальные патогены можно отнести к трем уровням приоритета опасности: критический, высокий и средний [1]. Карбапенем-устойчивые *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacteriaceae spp.*, а также *K. pneumoniae* относят к критическому уровню опасности. Доля таких изолятов в мировой популяции может достигать 50 и 64% для *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* соответственно [5]. Метициллин-устойчивые *S. aureus* (MRSA — от англ. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) и ванкомицин-устойчивые *E. faecium* относят к высокому уровню опасности. Доля MRSA может достигать 43%, а ванкомицин-устойчивых *E. faecium* — 59,1% [5]. При этом с каждым годом количество устойчивых изолятов только возрастает.

Инфекции, вызванные лекарственно-устойчивыми ESKAPE-патогенами, требуют искать новые подходы к лечению пациентов. Один из таких подходов — применение вирулентных бактериофагов в качестве дополнения или альтернативы антибактериальным препаратам. Попытки применения бактериофагов были сделаны еще в начале XX в. В настоящее время бактериофаги зарекомендовали себя как эффективные антибактериальные агенты [6, 7]. Применение вирулентных бактериофагов имеет ряд преимуществ, главное из которых в том, что взаимодействие между бактериофагом и бактерией не зависит от профиля устойчивости к антибактериальным препаратам. Надо также отметить, что бактериофаги постоянно коэволюционируют совместно с бактериями-хозяевами, что позволяет им преодолевать защитные системы последних.

На фармацевтическом рынке нашей страны представлена линейка препаратов на основе вирулентных бактериофагов (или фагов). Все они представляют собой коктейли из нескольких вирулентных бактериофагов. Использование таких коктейлей обеспечивает расширение спектра действия по отношению к различным штаммам бактерий. В основном коммерческие препараты вирулентных бактериофагов на территории России выходят под торговыми марками АО НПО «Микроген» и НПЦ «Микромир». Надо отметить, что производитель указывает широкий спектр активности препаратов против таких ESKAPE-патогенов, как *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. К сожалению, на сегодняшний день на рынке не представлены препараты бактериофагов, действующие против *A. baumannii* и *Enterobacter spp.*, что подчеркивает необходимость их разработки.

Целью работы было оценить эффективность коммерческих фаговых препаратов и моноизолятов

бактериофагов, выделенных из природных источников, против клинических штаммов *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные изоляты

В исследование включены изоляты *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* ($n = 147$), выделенные от пациентов, проходивших лечение в стационаре Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России в 2018–2019 гг. Культивирование бактерий проводили в течение 18–24 ч на колумбийском агаре (Oxoid; Великобритания) или на соевом бульоне (Oxoid; Великобритания) при температуре 37 °C.

Видовую идентификацию проводили с помощью метода прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата по методике, описанной ранее [8]. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics; Германия)) в 50%-м ацетонитриле и 2,5%-й трифторуксусной кислоте. Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics; Германия). Для калибровки использовали бактериальный тест-стандарт (Bruker Daltonics; Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров применяли программное обеспечение flexControl 3.0 и flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics; Германия). Видовую идентификацию проводили с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics; Германия).

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Оценку чувствительности бактериальных штаммов к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом по международным лабораторным стандартам (CLSI, the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) [9]. Для грамотрицательных микроорганизмов (*K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*) тестировали следующие антибактериальные препараты: цефтриаксон, гентамицин, ципрофлоксацин и меропенем. Для грамположительных микроорганизмов (*S. aureus* и *E. faecium*) устанавливали профиль чувствительности к эритромицину, ципрофлоксацину и тетрациклину. *S. aureus* дополнительно тестировали на устойчивость к оксациллину и гентамицину. Чувствительность *E. faecium* к ванкомицину оценивали методом серийных разведений в соответствии со стандартами CLSI [9].

Молекулярно-генетическое типирование штаммов коллекции

Типирование штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *E. faecium* проводили методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) с использованием стандартных схем [10–14]. Для *S. aureus* использовали метод *spa*-типирования, основанный на установлении последовательности гена стафилококкового белка A (*Staphylococcus protein A*), с применением стандартного протокола [15].

Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-экспресс» («Литех»; Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Пробы ДНК хранили при -20°C . Реакцию амплификации генов, входящих в схемы молекулярно-генетического типирования, проводили на TETRAD DNA ENGINE (MJ Research; США). Амплификацию осуществляли в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 66 мМ Tris-HCl (pH 9), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мМ MgCl_2 , 250 мкМ каждого dNTP, 1 ед. Taq ДНК полимеразы («Литех»; Россия) и по 10 пмоль соответствующих праймеров. Продукты амплификации анализировали в 2%-м агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Секвенирование по Сэнгеру выполняли на приборе 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific; Великобритания). Последовательности генов анализировали с помощью программного обеспечения Ridom StaphType TM (Ridom GmbH; Würzburg, Германия), а также комплекса программ Vector NTI Suite 9 (Thermo Fisher Scientific; Великобритания). Для определения аллельных профилей и сиквенс-типов штаммов методом МЛСТ сравнивали полученные нуклеотидные последовательности с аналогичными последовательностями, доступными в международной базе данных PubMLST [11].

Препараты бактериофагов

В исследовании оценивали эффективность 14 коммерческих терапевтических препаратов вирулентных бактериофагов различных серий фирмы АО НПО «Микроген» (табл. 1). Все препараты были приобретены в аптеках г. Москвы и разрешены для клинического применения.

Выделение бактериофагов из природных источников

Бактериофаги, эффективные в отношении отдельных штаммов *K. pneumoniae* и *S. aureus*, выделяли из природных источников (проб воды из различных водоемов) методом накопительных культур. Для этого образец воды в объеме 50 мл пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм (Merck Millipore; США). К пробе добавляли двукратный бульон LB (от англ. *lysogeny broth*) (Oxoid; Великобритания), вносили 300 мкл ночной культуры

бактериального штамма и инкубировали на качалке при 37°C в течение 18 ч. После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3500 g, надосадов пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore; США). Моноизолаты получали последовательным (трехкратным) выделением из отдельных негативных колоний. В дальнейшем бактериофаги наращивали в 50 мл бульона LB, содержащего 300 мкл ночной культуры бактериального штамма. Концентрацию бактериофага в фаговом лизате оценивали стандартным методом титрования по Грациа [16].

Оценка эффективности препаратов бактериофагов и фаголизатов бактериофагов

Оценку эффективности литических бактериофагов (титр более 10^7) проводили методом спот-тестирования. Для этого 0,1 мл ночной культуры смешивали с полужидким LB-агаром (0,6% агара). Полученную взвесь распределяли по поверхности чашки Петри, содержащей слой LB-агара (1,5% агара). После застывания верхнего слоя с полужидким агаром на поверхность наносили по 5 мкл исследуемых препаратов и инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Через сутки на местах нанесения капли наблюдали образование прозрачного пятна лизиса либо отдельных негативных колоний. В таком случае бактериальный штамм считали чувствительным к действию препарата. Если пятно лизиса отсутствовало, бактериальный штамм считали устойчивым. Эффективность действия препарата бактериофагов по отношению к бактериальным штаммам одного вида определяли как процент чувствительных к данному препарату штаммов бактерий этого вида в общем пуле штаммов коллекции соответствующего вида.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования создана коллекция из 147 бактериальных штаммов: *K. pneumoniae* (33 штамма; 22,5%), *P. aeruginosa* (40 штаммов; 27,2%), *S. aureus* (50 штаммов; 34%) и *E. faecium* (24 штамма; 16,3%). Для всех штаммов коллекции определен профиль устойчивости к антибактериальным препаратам (рис. 1).

Таблица 1. Характеристика препаратов бактериофагов, используемых в работе

Наименование препарата	Спектр антибактериальной активности	Серия	Место производства
«Бактериофаг стафилококковый»	<i>Staphylococcus aureus</i> и ряд других видов коагулазоотрицательных стафилококков	H33	г. Нижний Новгород
		P332	г. Пермь
«Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный)»	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H7	г. Нижний Новгород
«Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный»	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P252	г. Пермь
		P251	
«Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный»	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Y27	г. Уфа
«Пиобактериофаг поливалентный очищенный»	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>	Y1	г. Уфа
		Y25	
«Пиобактериофаг комплексный»	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , энтеропатогенных <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	H74	г. Нижний Новгород
		H45	
«Интести-бактериофаг»	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H101	г. Нижний Новгород
		H123	
		H86	
		H175	

Согласно нашим данным, 9 из 33 штаммов (27,3%) *K. pneumoniae* были чувствительны ко всем тестируемым антибактериальным препаратам; 4 из 33 (12,1%) были устойчивы к одному антибактериальному препарату, а 17 из 33 (51,5%) были классифицированы как МЛУ. Для штаммов *P. aeruginosa* чувствительность ко всем тестируемым антибактериальным препаратам была определена для 7 из 40 (17,5%) штаммов; 15 из 40 (37,5%) штаммов были устойчивы к одному антибактериальному препарату, а 6 из 40 (15%) *P. aeruginosa* были классифицированы как МЛУ.

Среди *S. aureus* чувствительными ко всем тестируемым антибактериальным препаратам были 19 из 50 (38%) штаммов; 7 из 50 (14%) были устойчивы к одному антибактериальному препарату, а 22 из 50 (44%) классифицированы как МЛУ. Устойчивость к оксациллину проявляли 27 штаммов (54%). Среди *E. faecium* чувствительных штаммов выявлено не было; 3 из 24 (12,5%) штаммов были устойчивы к одному антибактериальному препарату, а 19 из 24 (19,2%) классифицированы как МЛУ. Доля штаммов *E. faecium*, устойчивых к ванкомицину, составила 12%.

На основании проведенного молекулярно-генетического типирования методом МЛСТ штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к 15 сиквенс-типам (рис. 2А). Наиболее представленными сиквенс-типами оказались ST395 и ST23, к ним относились 14 из 33 (42,4%) и 5 из 33 (15,2%) штаммов соответственно. Было также обнаружено два уникальных сиквенс-типа (2-1-1-1-9-4-1 и 2-1-1-1-9-4-18). По результатам типирования выявлено, что штаммы *P. aeruginosa* относились к 26 различным сиквенс-типам (рис. 2Б). Сиквенс-тип ST12 был наиболее представленным (5 из 40 штаммов; 12,5%). Кроме того, было выявлено три уникальных сиквенс-типа: 15-5-11-8-4-4-1 (2 штамма), 15-2-11-3-3-38-3 (2 штамма) и 17-5-12-3-14-4-7 (1 штамм). Штаммы *E. faecium* характеризовались 12 сиквенс-типами, а большинство из них относились к сиквенс-типам ST18 (4 из 24; 16,7%), ST17 (3 из 24; 12,5%), ST78 (3 из 24; 12,5%) и ST192 (3 из 24; 12,5%) (рис. 2В).

Методом *spa*-типирования установлено разнообразие штаммов *S. aureus* (рис. 2Г). Для штаммов коллекции было характерно 18 *spa*-типов, среди которых доминировали *spa*-типы t008 (20 из 50; 40%) и t308 (6 из 50; 12%).

Созданную коллекцию охарактеризованных штаммов ESKAPE-патогенов использовали для оценки эффективности 14 препаратов бактериофагов, включенных в исследование (см. табл. 1; рис. 3). Наиболее эффективным препаратом против *K. pneumoniae* был «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» серии У1 (29 из 33; 87,9%) (рис. 3А). В отношении штаммов *P. aeruginosa* эффективность препаратов варьировала от 76,9 до 92,5% (рис. 3Б). Эффективность препарата «Бактериофаг стафилококковый» против штаммов *S. aureus* составила 43 из 50 (86%) штаммов (рис. 3В). Единственный доступный препарат «Интести-бактериофаг» П86, действующий против *E. faecium*, показал эффективность на одном из 24 (4,2%) штаммов.

Для сравнения эффективности коммерческих препаратов с эффективностью отдельных бактериофагов были выделены моноизоляты бактериофагов из природных источников (vB_Kp_M_Seu621 и vB_SauP-436-3w), активные в отношении штаммов видов *K. pneumoniae* и *S. aureus* соответственно. Их титр составил 10^{12} БОЕ/мл (для vB_Kp_M_Seu621) и 10^{11} БОЕ/мл (для vB_SauP-436-3w). Эффективность моноизолятов vB_Kp_M_Seu621 и vB_SauP-436-3w, установленная на штаммах коллекции, составила 5,9 и 60% соответственно (см. рис. 3А и 3В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам исследования эффективность поливидовых препаратов вирулентных бактериофагов по отношению к виду *K. pneumoniae* варьировала в широком диапазоне от 42,4 до 87,9%, для монопрепаратов этот диапазон составил 33,3–78,1% (см. рис. 3А). Последнее показывает неоднородность состава препаратов и говорит о необходимости обновления и периодического тестирования препаратов против коллекций актуальных бактериальных штаммов. Эффективность бактериофага

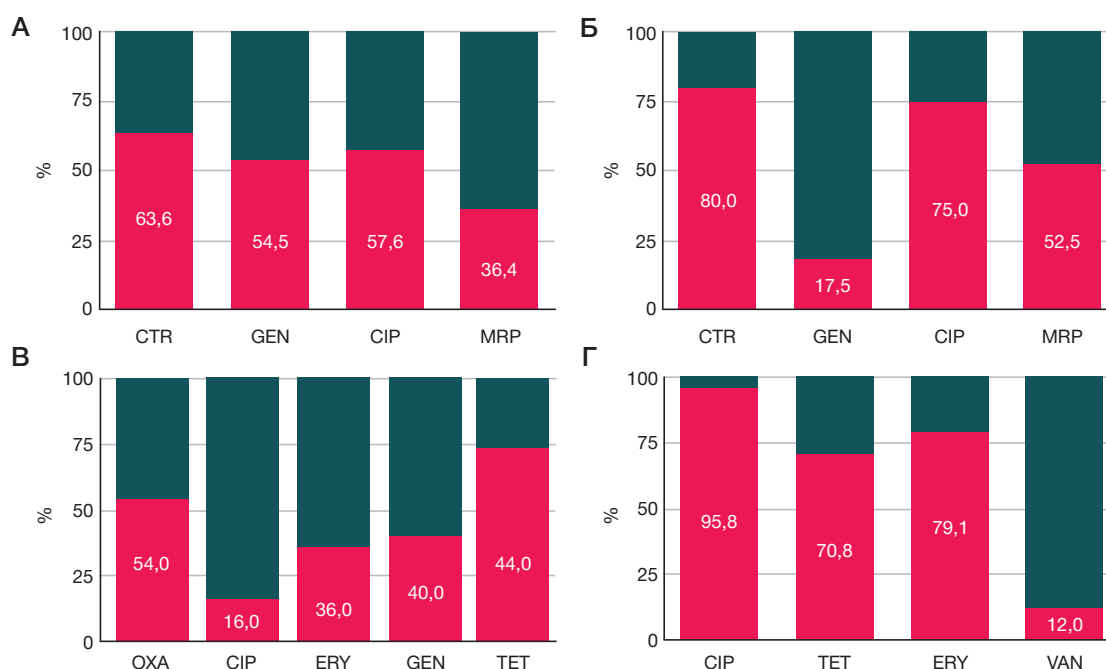


Рис. 1. Устойчивость к антибактериальным препаратам штаммов *K. pneumoniae* (А), *P. aeruginosa* (Б), *S. aureus* (В) и *E. faecium* (Г). Красным цветом показан процент устойчивых штаммов. CIP — ципрофлоксацин, TET — тетрациклин, ERY — эритромицин, MRP — меропенем, VAN — ванкомицин, OXA — оксациллин, CTR — цефтриаксон, GEN — гентамицин

vB_Kp_M_Seu621 (5,9%), выделенного из природного источника, была значительно ниже, чем эффективность коммерческих препаратов бактериофагов, что может быть связано с разнообразием видов капсулы у *K. pneumoniae*. Капсула может служить рецептором для бактериофагов и определять эффективность взаимодействия бактериофага с хозяином [17].

В целом нужно отметить, что практически все штаммы *K. pneumoniae* (32 из 33; 97,9%) были чувствительны к какому-либо тестируемому препарату бактериофагов. При этом не было достоверных различий в эффективности лизиса МЛУ-штаммов и штаммов, чувствительных к действию антибактериальных препаратов. Наибольшее количество МЛУ-штаммов относилось к сиквенс-типу ST395. Штаммы, входящие в этот сиквенс-тип, наиболее распространены среди внутрибольничных и ассоциированы с распространением гена *blaOXA-48*, ответственного за устойчивость к β -лактамам антибиотикам [18]. Для МЛУ-штаммов этого сиквенс-типа показана высокая эффективность препарата «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» серии У1 (9 из 11; 81,8%). Данный препарат вызывал лизис и остальных МЛУ-штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к сиквенс-типам ST15, ST23, ST268.

Наибольшую эффективность препараты вирулентных бактериофагов показали в отношении штаммов *P. aeruginosa*. Для поливидовых препаратов эффективность составила 76,2–90%, а для моновидового препарата — 87,5% (см. рис. 3Б). Полученные результаты коррелируют с опубликованными данными. Согласно исследованию

турецких коллег, проведенному на небольшой выборке штаммов *P. aeruginosa* (10 штаммов), эффективность препаратов «Пиобактериофаг комплексный» и «Интести-бактериофаг» составила 90 и 80% соответственно [19].

Как и в случае со штаммами *K. pneumoniae*, тестируемые препараты вызывали лизис практически всех штаммов *P. aeruginosa* коллекции (39 из 40; 97,5%). Что касается МЛУ-штаммов, относящихся к сиквенс-типам ST235, ST357 и ST654, то их лизис вызывало большинство тестируемых препаратов.

В отношении штаммов *S. aureus* моновидовые препараты вирулентных бактериофагов показали эффективность 86% для обеих серий препарата «Бактериофаг стафилококковый» (см. рис. 3В). Высокая эффективность препарата продемонстрирована в работах и других исследователей. К примеру, эффективность бактериофага vB_SauM-fRuSau02, выделенного из данного препарата, была оценена на 135 штаммах стафилококков, в том числе 30 штаммах коагулазоотрицательных видов [20]. Надо отметить, что штаммы *S. aureus* отличались своим происхождением: 51 штамм был получен от людей, а 54 штамма выделены от свиней. Для *S. aureus*, выделенных от людей, эффективность бактериофага vB_SauM-fRuSau02 была крайне высока (96%). В свою очередь для штаммов коагулазоотрицательных видов и штаммов *S. aureus*, выделенных от животных, эффективность была ниже и составила 50 и 33% соответственно [20]. Кроме того, проведена оценка эффективности другого коммерческого препарата, активного против *S. aureus* — «Stafal phage» (Bohemia Pharmaceuticals; Чешская республика).

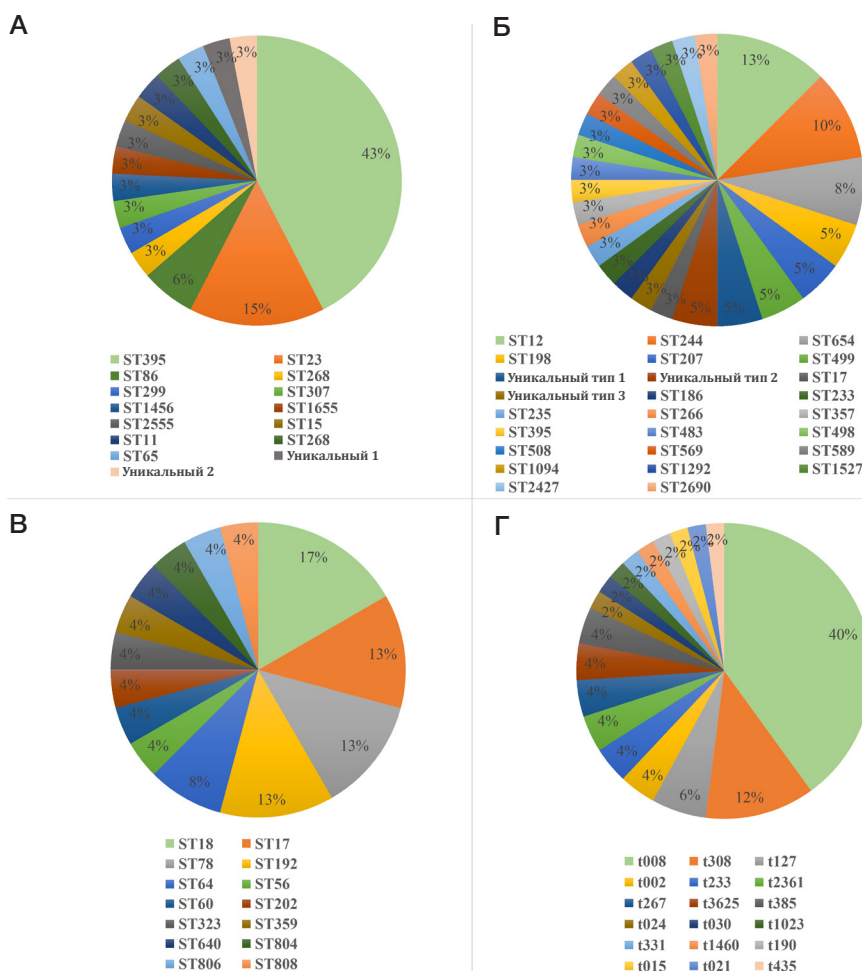


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического типирования для видов *K. pneumoniae* (А), *P. aeruginosa* (Б), *E. faecium* (В) и *S. aureus* (Г)

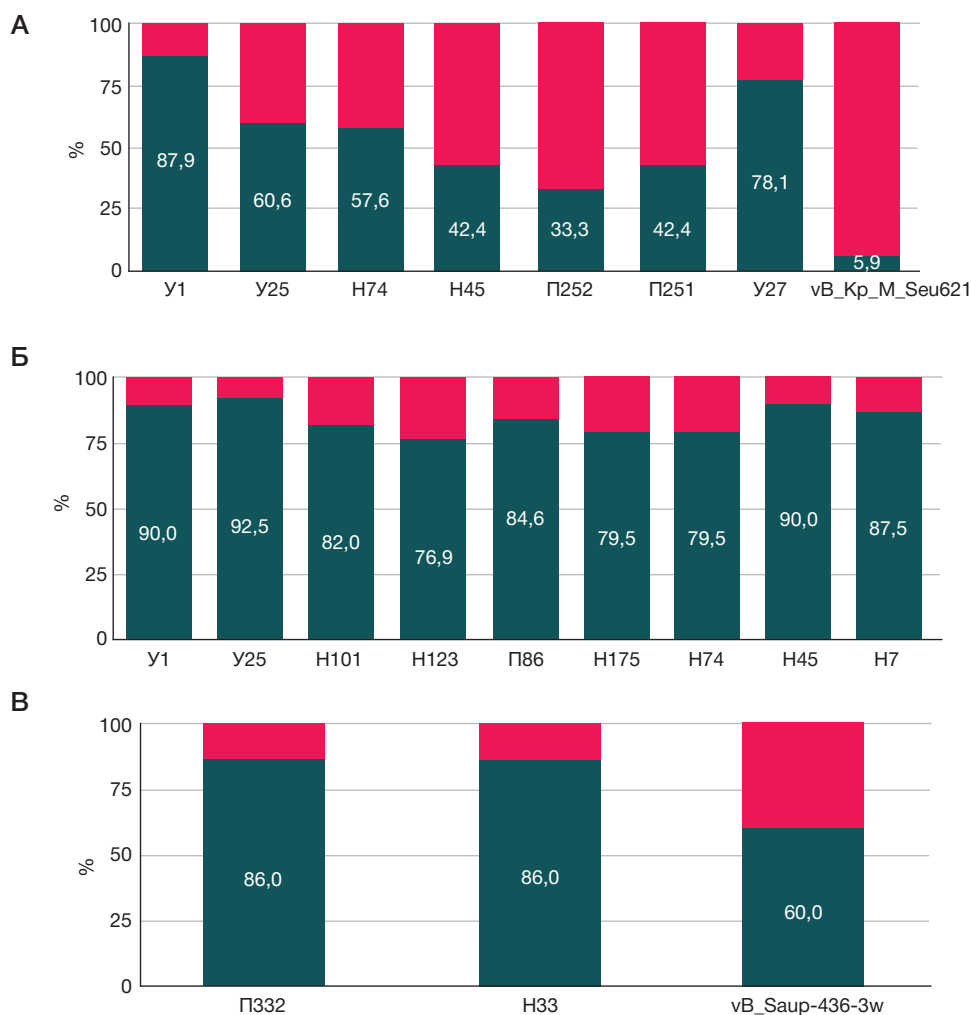


Рис. 3. Эффективность коммерческих препаратов бактериофагов против бактерий видов *K. pneumoniae* (А), *P. aeruginosa* (Б) и *S. aureus* (В). Зеленым показан процент чувствительных к фаговым препаратам штаммов. На рисунке обозначены серии препаратов: «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» (Y1, Y25); «Пиобактериофаг комплексный» (H74, H45); «Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный» (P252, P251); «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» (Y27); «Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный)» (H7); «Бактериофаг стафилококковый» (P332, H33)

Бактериофаги, выделенные из этого препарата, были активны против 83% MRSA и 99% MSSA (от англ. *methicillin susceptible Staphylococcus aureus*) [21].

По данным нашего исследования, все MRSA-штаммы (а также МЛУ-штаммы) были чувствительны к препарату «Бактериофаг стафилококковый» серии H33. К серии P332 этого же препарата был устойчив один MRSA-штамм, который также относился к МЛУ-штаммам. Данный штамм представлял *sra*-тип t127.

Эффективность моноизolata бактериофага vB_Saup-436-3w на штаммах коллекции (30 из 50; 60%) была ниже эффективности коммерческого препарата «Бактериофаг стафилококковый» (43 из 50; 86%), однако значительно выше, чем аналогичная величина для бактериофага vB_Kp_M_Seu621, активного против *K. pneumoniae*. Данный факт связан с тем, что в качестве рецепторов для бактериофагов стафилококков выступают тейхоевые кислоты бактериальных клеток [22], вариабельность которых значительно ниже, чем вариабельность капсул грамотрицательных бактерий.

Крайне низкая эффективность была выявлена для коммерческих препаратов, активных в отношении *E. faecium* (1 из 24; 4,2%). Чувствительный к действию препарата бактериофагов штамм относился к ST-17. Надо отметить, что бактериофаги, активные против этого вида, входили в состав препаратов с широким спектром действия.

Моновидовых препаратов вирулентных бактериофагов для *E. faecium* не представлено на российском рынке.

Для клинической медицины интересны данные о наличии корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и их устойчивостью к антибактериальным препаратам, а также корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и принадлежностью бактерий к определенному клональному комплексу. Поиск таких корреляций был осуществлен в рамках данной работы. Было установлено, что препараты бактериофагов вызывают лизис штаммов как чувствительных к антибактериальным препаратам, так и устойчивых, что является ключевым моментом в применении бактериофагов в медицине в качестве альтернативы антимикробным веществам. Корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и их устойчивостью к антибактериальным препаратам обнаружено не было ($p > 0,05$). Что касается корреляции между устойчивостью штаммов к бактериофагам и принадлежностью бактерий к определенному клональному комплексу, то штаммы одного МЛСТ сиквенс-типа могут быть как чувствительными, так и устойчивыми к воздействию бактериофага. Это справедливо для всех исследуемых бактериальных видов. Таким образом, нет четкой корреляции между типом взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой и ее МЛСТ сиквенс-типом ($p > 0,05$).

ВЫВОДЫ

Результаты данного исследования показывают, что штаммы собранной коллекции относятся к различным генетическим группам и обладают повышенной устойчивостью к антибактериальным препаратам, что делает их пригодными для оценки эффективности коммерческих терапевтических препаратов. Существующие на рынке препараты бактериофагов обладают высокой

эффективностью против таких представителей ESKAPE-патогенов, как *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Однако не все испытываемые препараты одинаково эффективны против штаммов *K. pneumoniae*. Следует также подчеркнуть, что для терапевтических целей предпочтительно использование коктейлей бактериофагов, особенно при терапии инфекционных процессов, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в частности *K. pneumoniae*.

Литература

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Heal Organ. 2014; 1–257.
2. Rice LB. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. Cambridge University Press (CUP). 2010; 31 (S1): S7–S10.
3. Земко В. Ю., Окулич В. К., Дзядзько А. М. Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара. Трансплантология. 2018; 10 (4): 284–97.
4. Склеенова Е. Ю. и др. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018; 3: 164–71.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC, 2019.
6. Jennes S, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. Critical Care. 2017; 21 (1).
7. Breederveld RS. Phage therapy 2.0: where do we stand? The Lancet Infectious Diseases. 2019; 19 (1): 2–3.
8. Корниенко М. А., Ильина Е. Н., Боровская А. Д., Эдельштейн М. В., Сухорукова М. В., Кострцева М. и др. Штаммовая классификация *staphylococcus aureus* посредством прямого масс-спектрометрического профилирования. Биомедицинская химия. 2012; 58 (5): 501–13.
9. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
10. Institut Pasteur MLST databases and software. *Klebsiella pneumoniae*: Доступно по ссылке: <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>.
11. Pubmlst: Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. Доступно по ссылке: <https://pubmlst.org/databases/>.
12. Diancourt L, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43 (8): 4178–82.
13. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome open Res. 2018; 3: 124.
14. Pubmlst: Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Enterococcus faecium*. Доступно по ссылке: <https://pubmlst.org/efaecium/>.
15. Harmsen D, et al. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. J Clin Microbiol. 2003; 41 (12): 5442–8.
16. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. Methods Mol Biol. 2009; 501: 81–85.
17. Lin T-L, et al. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment. J Infect Dis. 2014; 210 (11): 1734–44.
18. Cubero M, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). Clin Microbiol Infect. 2016; 22 (2): 154–60.
19. Ozkan I, et al. Lytic Activity of Various Phage Cocktails on Multidrug-Resistant Bacteria. Clin Invest Med. 2016; 39 (6): 27504.
20. Leskinen K, et al. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a t2-like bacteriophage isolated from a therapeutic phage cocktail. Viruses. 2017; 9 (9): E258.
21. Dvořáčková M, et al. Antimicrobial effect of commercial phage preparation Stafal® on biofilm and planktonic forms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Folia Microbiol. 2019; 64 (1): 121–26.
22. Xia G, et al. Wall teichoic acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. J Bacteriol. 2011; 193 (5): 4006–9.

References

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Heal Organ. 2014; 1–257.
2. Rice LB. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. Cambridge University Press (CUP). 2010; 31 (S1): S7–S10.
3. Zemko VY, Okulich VK, Dzyadzk AM. Monitoring the antibiotic resistance in the intensive care unit of a multidisciplinary hospital. *Transplantologia. The Russian Journal of Transplantation*. 2018; 10 (4): 284–97.
4. Skleenova EYu, Azizov IS, Shek EA, Edelstein MV, Kozlov RS, Dekhnich AV. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. Clin Microbiol Antimicrob Chemother. 2018; 3: 164–71.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC, 2019.
6. Jennes S, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. Critical Care. 2017; 21 (1).
7. Breederveld RS. Phage therapy 2.0: where do we stand? The Lancet Infectious Diseases. 2019; 19 (1): 2–3.
8. Kornienko MA, Ilina EN, Borovskaya AD, Edelstein MV, Sukhorukova MV, Kostorzewa M, et al. Strain differentiation of *staphylococcus aureus* by means of direct maldi tof mass spectrometry profiling. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2012; 58 (5): 501–13. Russian.
9. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th Edition. January 2019.
10. Institut Pasteur MLST databases and software. *Klebsiella pneumoniae*: Available from: <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>.
11. Pubmlst: Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. Available from: <https://pubmlst.org/databases/>.

12. Diancourt L, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (8): 4178–82.
13. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open Res.* 2018; 3: 124.
14. Pubmlst: Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. *Enterococcus faecium*. Available from: <https://pubmlst.org/efaecium/>.
15. Harmsen D, et al. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (12): 5442–8.
16. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 81–85.
17. Lin T-L, et al. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment. *J Infect Dis.* 2014; 210 (11): 1734–44.
18. Cubero M, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22 (2): 154–60.
19. Ozkan I, et al. Lytic Activity of Various Phage Cocktails on Multidrug-Resistant Bacteria. *Clin Invest Med.* 2016; 39 (6): 27504.
20. Leskinen K, et al. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a twort-like bacteriophage isolated from a therapeutic phage cocktail. *Viruses.* 2017; 9 (9): E258.
21. Dvořáčková M, et al. Antimicrobial effect of commercial phage preparation Stafal® on biofilm and planktonic forms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 2019; 64 (1): 121–26.
22. Xia G, et al. Wall teichoic acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. *J Bacteriol.* 2011; 193 (5): 4006–9.

ИММУНИТЕТ К COVID-19 И ВОПРОСЫ ПРОВЕДЕНИЯ СКРИНИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ АНТИТЕЛ К SARS-COV-2

Н. А. Маянский ✉

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

В работе кратко представлены известные данные об иммунном ответе на SARS-CoV-2, а также проанализированы возможности и ограничения серологического тестирования на антивирусные антитела, которые следует учитывать при планировании популяционных исследований и интерпретации их результатов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, иммунитет, антитела, скрининг

Вклад авторов: Н. А. Маянский — анализ литературы и написание текста.

✉ **Для корреспонденции:** Николай Андреевич Маянский
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; mayanskiy.nikolay@gmail.com

Статья получена: 01.06.2020 **Статья принята к печати:** 15.06.2020 **Опубликована онлайн:** 23.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.035

IMMUNITY TO COVID-19 AND ISSUES OF SCREENING FOR SARS-COV-2 ANTIBODIES

Mayanskiy NA ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

This paper briefly presents the known data on the immune response to SARS-CoV-2, and also analyzes the possibilities and limitations of serological testing for antibodies that should be accounted for when planning population studies and interpreting their results.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, immunity, antibodies, screening

Author contribution: Mayanskiy NA — literature analysis, text authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikolay A. Mayanskiy
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; mayanskiy.nikolay@gmail.com

Received: 01.06.2020 **Accepted:** 15.06.2020 **Published online:** 23.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.035

Развивающаяся пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, носит беспрецедентный характер в современной истории. SARS-CoV-2 быстро распространился по всему миру, поразил более 5 млн, вызвав гибель более 300 тыс. человек (данные ВОЗ на 25 мая 2020 г.) [1], драматически изменил уклад жизни во многих странах, угрожая дальнейшими экономическими потрясениями. Реакция научного сообщества на это событие также отличается скоростью и размахом. Ведущие мировые журналы публикуют «с колес» самые последние данные о возбудителе и его воздействии на организм, подходах к лечению и принципах сдерживания распространения вируса. Эти исследования позволили в кратчайшие сроки разработать инструменты для выявления РНК SARS-CoV-2 и тестирования антивирусных антител. В настоящей публикации кратко представлены известные данные об иммунном ответе на SARS-CoV-2, а также проанализированы возможности и ограничения серологического тестирования на антивирусные антитела, которые следует учитывать при планировании популяционных исследований и интерпретации их результатов.

Иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2

Накопленная к настоящему времени информация позволяет с определенной уверенностью говорить о том, что иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2 протекает по типовому сценарию. У большинства инфицированных SARS-CoV-2 специфичные антитела различных классов появляются через 1–2 недели от начала симптомов [2]. В одном из исследований к 5–7 дню они были выявлены у 40–55% пациентов, госпитализированных по поводу

COVID-19, а через 17–19 дней обнаруживались у 100% пациентов [3]. При этом сероконверсия (т. е. появление специфичных антител в сыворотке) сопровождалась нарастанием титра антител в 2–4 раза за время наблюдения (до 27 дня от начала симптомов). По другим данным, сероконверсия у инфицированных SARS-CoV-2 с наличием симптомов происходит в среднем через 10–15 дней [4]. Важно и то, что у большинства пациентов, перенесших COVID-19, в том числе в легкой форме, появляются специфичные функциональные, т. е. вируснейтрализующие антитела, которые обеспечивают эффективный иммунитет. Через две недели от начала симптомов такие антитела были обнаружены у 94% пациентов с COVID-19 [5].

Параллельно с антительным ответом активно вырабатывается клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. В течение 2–4 недель после инфицирования формируется пул вирусспецифичных Т-лимфоцитов [7, 8]. Предполагается, что CD4- и CD8-Т-лимфоциты памяти смогут обеспечить надежный иммунитет от реинфекции SARS-CoV-2 для индивидов, у которых не выявлены антитела.

На данном этапе развития пандемии пока недостаточно данных о длительности иммунитета против SARS-CoV-2. Представление об этом можно получить из проведенных ранее исследований родственных коронавирусов MERS-CoV и SARS-CoV-1, а также сезонных коронавирусов. Так, после инфекции SARS-CoV-1 концентрация IgG оставалась высокой на протяжении 4–5 месяцев, а затем в течение 2–3 лет постепенно снижалась, при этом до 90% переболевших сохраняли вируснейтрализующие антитела через 2,5 года. Схожим образом развивался антительный ответ при MERS-CoV-инфекции с сохранением антител у выздоровевших до 34 месяцев [4, 6].

Открытым остается вопрос о возможности повторного заражения SARS-CoV-2. Подтвержденных случаев реинфицирования SARS-CoV-2 пока описано не было. Исследование, проведенное на приматах, показало, что перенесенная SARS-CoV-2-инфекция предотвращала реинфицирование этим вирусом [6]. Не описаны случаи повторного заражения SARS-CoV-1 и MERS-CoV. Нередки повторные инфицирования сезонными коронавирусами, которые протекают в виде нетяжелых острых респираторных заболеваний. Здесь реинфекция может быть связана с быстрым угасанием протективного иммунитета или встречей с новым серовариантом вируса [4, 6].

Сероэпидемиология COVID-19

Пока большинство исследований по сероэпидемиологии COVID-19 ограничено когортами госпитализированных пациентов и заболевших с симптомами инфекции. Не исключено, что у лиц, перенесших инфицирование без симптомов или с минимальными симптомами, динамика выработки антител, как и характеристики постинфекционного иммунитета, могут выглядеть по-другому [9]. Сообщения различной степени достоверности о частоте бессимптомной (или субклинической) сероконверсии в тех или иных территориальных или профессиональных популяциях встречаются в различных средствах массовой информации, вместе с тем научных публикаций на эту тему пока крайне мало. Серологическое обследование, проведенное среди жителей Лос-Анджелеса с целью оценить кумулятивную заболеваемость COVID-19, показало наличие IgG и/или IgM антител у 35 (4,65%) из 863 обследованных [10]. При этом у 10 (29%) из 35 лиц с положительными антителами в течение последних двух месяцев отсутствовали какие-либо симптомы ОРВИ, что могло указывать на сероконверсию в результате бессимптомно перенесенной SARS-CoV-2-инфекции. Возможность субклинической сероконверсии была продемонстрирована в небольшом исследовании, показавшем появление анти-SARS-CoV-2 IgM и/или IgG через 21 день после контакта с зараженным COVID-19 пациентом у 3 (23%) из 13 пациентов и 11 (44%) из 25 сотрудников амбулаторного диализного центра в США, причем у большинства антителопозитивных обследованных (у 2 из 3 пациентов и 9 из 11 сотрудников) симптомы, подобные коронавирусным, отсутствовали [11].

Проблемы серологического тестирования анти-SARS-CoV-2

Серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2, несомненно, могут быть чрезвычайно полезны для диагностики инфекции, исследования популяционного иммунитета, оценки ответа на вакцинацию и других задач. В то же время следует не только использовать возможности, но и осознавать ограничения серологических тестов. Предостережения по поводу нерационального применения серологического тестирования на анти-SARS-CoV-2 с использованием несовершенных тест-систем (которых сейчас большинство) и без критической оценки результатов были высказаны в целой серии публикаций уважаемых научных журналов [6, 9, 12–14].

Как и любое серологическое исследование, тест на анти-SARS-CoV-2 неизбежно будет давать определенную долю ошибочных (ложноположительных и ложноотрицательных) результатов. Очевидно, что их

число будет зависеть от аналитических характеристик тест-системы, таких как чувствительность (способность выявлять носителей антител; доля истинно положительных результатов) и специфичность (избирательность теста; доля истинно отрицательных результатов).

Показатели чувствительности и специфичности, достигающие 90–95%, нередко вводят в заблуждение, и их интерпретируют как низкую вероятность ошибки, соответственно 5–10%, которой можно просто пренебречь. Однако не следует забывать о том, что число ошибочных результатов будет меняться в зависимости от частоты носительства антител в той или иной популяции. Часто этот факт игнорируют, что ведет к неточной интерпретации результатов. Проиллюстрируем это на примерах. Допустим, у нас имеется тест-система с заявленной чувствительностью и специфичностью 95%. С ее помощью мы исследуем: 1) популяцию переболевших COVID-19 (ожидаемая частота носительства антител 90%); 2) популяцию не болевших COVID-19 и не имевших симптомов ОРВИ в последние 2 месяца (ожидаемая частота носительства антител 5%). Для оценки достоверности результата теста рассчитывают положительное прогностическое значение (ППЗ), т. е. вероятность того, что положительный результат теста истинно положителен, по формуле [14]:

$$\text{ППЗ} = \frac{\text{Чувствительность} \times \text{Частота}}{\text{Чувствительность} \times \text{Частота} + (1 - \text{Специфичность}) \times (1 - \text{Частота})}$$

Для первой популяции (переболевших COVID-19) мы получим $\text{ППЗ} = 0,99$, т. е. вероятность того, что при положительном результате теста у индивида действительно будут присутствовать антитела, составляет 99%. Радикально по-другому будет выглядеть ситуация во второй гипотетической популяции, для которой значение ППЗ (отметим: при тех же показателях чувствительности и специфичности тест-системы) будет только 50%. Так, избирательность тест-системы со специфичностью в 95% оказывается недостаточной для популяции с низкой частотой антител и дает ложноположительные результаты в половине (!) случаев.

Таким образом, судить о «высоте» чувствительности и специфичности тест-системы следует в зависимости от того, какую популяцию планируется исследовать, а результаты тестирования необходимо интерпретировать с поправкой на возможную ошибку. Несложные расчеты показывают, что для достижения $\text{ППЗ} > 80\%$ в популяции с частотой встречаемости антител 5% тест-система должна иметь специфичность $> 99\%$.

К настоящему времени на рынке появились десятки тест-систем различных производителей для определения антител к SARS-CoV-2. Их продвижение сопровождают активные маркетинговые кампании, декларирующие точность и надежность тестирования. Не все производители открыто сообщают об аналитических характеристиках своих изделий, некоторые, вероятно, не имеют о них представления, так как не проводили нужных исследований [9]. Использование таких ненадежных тестов в период пандемии может быть опасно как для конкретного человека, так и для популяции в целом. Решения, связанные с вопросами допуска к работе медицинского персонала, смягчения/усиления ограничительных мер, а также стигматизация «безантительных» лиц и, наоборот, полная индульгенция индивидам с «антителами» к SARS-CoV-2 вплоть до выдачи так называемых «иммунологических паспортов» на основе единственного исследования, обладающего неопределенной достоверностью, могут привести к серьезным последствиям [9, 13].

Кроме того, «массовость» серологического тестирования должна быть разумной, тестировать всю популяцию непрактично и не нужно. Например, есть методические указания Роспотребнадзора, где детально прописан порядок организации и проведения серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям [15]. В них описаны индикаторные репрезентативные группы, подлежащие тестированию, кратность их обследования и т. д. Скрининг анти-SARS-CoV-2-антител должен быть четко спланирован, чтобы результаты, полученные на сравнительно небольших выборках, могли дать надежное представление о ситуации с коллективным иммунитетом как по популяции в целом, так и в отдельных группах повышенного риска (в частности, среди медицинских работников) или уязвимых группах населения (пожилые люди, пациенты с хроническими заболеваниями и др.).

В связи с высказанными соображениями гигантские масштабы скрининга населения на анти-SARS-CoV-2, начатого в мае 2020 г. в Москве, с планируемым охватом 3–6 млн человек, стоимость которого может составить 0,5–1 млрд руб. [16], вызывают по меньшей мере недоумение. Заметим, что тест-система, используемая для этого проекта, имеет специфичность 95,38%¹, что явно недостаточно для использования в популяции

с низкой частотой антител, о чем говорилось выше. С высокой долей уверенности можно утверждать, что в настоящий момент жители Москвы, пробывшие в условиях самоизоляции почти два месяца, составляют именно такую популяцию. Даже если предположить, что реальная доля серопозитивных лиц составляет 10%, то тест с указанной специфичностью будет давать > 30% ложноположительных результатов.

ВЫВОДЫ

Массовое тестирование лиц, не болевших COVID-19 (т. е. популяции с низкой частотой анти-SARS-CoV-2), может генерировать большое число ложноположительных результатов, значительно превышающее число истинно положительных результатов. Размер выборки для таких исследований необходимо планировать по принципу разумной достаточности, а данные следует интерпретировать с учетом аналитических характеристик тест-систем, используемых для определения антител. Эти характеристики должны быть публично доступны и проверяемы. В противном случае, широкое использование несовершенных серологических тестов может стать источником серьезных ошибок при принятии медицинских и управленческих решений.

¹ Это значение указано в решении Клинического комитета по COVID-19 Департамента здравоохранения г. Москвы от 12.05.2020 (официально не опубликовано). Других источников об аналитических характеристиках данной тест-системы обнаружить не удалось.

Литература

1. WHO: Coronavirus disease (COVID-19). Situation Report — 126. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports>. Доступ 26 мая 2020.
2. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 May 6. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.
3. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nat Med. 2020 Apr 29. DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1.
4. Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. J Gen Virol. 2020 May 20. DOI: 10.1099/jgv.0.001439.
5. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. Preprint at medRxiv. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>.
6. Kirkcaldy RD, King BA, Brooks JT. COVID-19 and Postinfection Immunity: Limited Evidence, Many Remaining Questions. JAMA. 2020 May 11. DOI: 10.1001/jama.2020.7869.
7. Melgaço JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: What can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? Cell Immunol. 2020 Apr 28; 353: 104114. DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104114.
8. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. Immunity. 2020 May 3. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.
9. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike-Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? Lab Med. 2020 May 6; 51 (3): 236–8. DOI: 10.1093/labmed/lmaa025.
10. Sood N, Simon P, Ebner P, Eichner D, Reynolds J, Bendavid E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-Specific Antibodies Among Adults in Los Angeles County, California, on April 10–11, 2020. JAMA. 2020 May 18: e208279. DOI: 10.1001/jama.2020.8279.
11. Hains DS, Schwaderer AL, Carroll AE, Starr MC, Wilson AC, Amanat F, et al. Asymptomatic Seroconversion of Immunoglobulins to SARS-CoV-2 in a Pediatric Dialysis Unit. JAMA. 2020 May 14: e208438. DOI: 10.1001/jama.2020.8438.
12. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. Ann Clin Biochem. 2020 May 14: 4563220927053. DOI: 10.1177/0004563220927053.
13. Krammer F, Simon V. Serology assays to manage COVID-19. Science. 2020 May 15: eabc1227. DOI: 10.1126/science.abc1227.
14. Mathur G, Mathur S. Antibody Testing For Covid-19. Am J Clin Pathol. 2020 May 15: aqaa082. DOI: 10.1093/ajcp/aqaa082.
15. Методические указания МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит B)».
16. Available from: <https://vademec.ru/news/2020/05/25/mgfoms-opredelil-stoimost-provedeniya-testa-na-antitela-k-covid-19>. Доступ 26 мая 2020.

References

1. WHO: Coronavirus disease (COVID-19). Situation Report — 126. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports>. Доступ 26 мая 2020.
2. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 May 6. DOI: 10.1001/jama.2020.8259.
3. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19.

- Nat Med. 2020 Apr 29. DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1.
4. Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J Gen Virol*. 2020 May 20. DOI: 10.1099/jgv.0.001439.
5. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. Preprint at medRxiv. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>.
6. Kirkcaldy RD, King BA, Brooks JT. COVID-19 and Postinfection Immunity: Limited Evidence, Many Remaining Questions. *JAMA*. 2020 May 11. DOI: 10.1001/jama.2020.7869.
7. Melgaço JG, Azamor T, Ano Bom APD. Protective immunity after COVID-19 has been questioned: What can we do without SARS-CoV-2-IgG detection? *Cell Immunol*. 2020 Apr 28; 353: 104114. DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104114.
8. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 2020 May 3. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.
9. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike-Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? *Lab Med*. 2020 May 6; 51 (3): 236–8. DOI: 10.1093/labmed/lmaa025.
10. Sood N, Simon P, Ebner P, Eichner D, Reynolds J, Bendavid E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-Specific Antibodies Among Adults in Los Angeles County, California, on April 10–11, 2020. *JAMA*. 2020 May 18: e208279. DOI: 10.1001/jama.2020.8279.
11. Hains DS, Schwaderer AL, Carroll AE, Starr MC, Wilson AC, Amanat F, et al. Asymptomatic Seroconversion of Immunoglobulins to SARS-CoV-2 in a Pediatric Dialysis Unit. *JAMA*. 2020 May 14: e208438. DOI: 10.1001/jama.2020.8438.
12. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. *Ann Clin Biochem*. 2020 May 14: 4563220927053. DOI: 10.1177/0004563220927053.
13. Krammer F, Simon V. Serology assays to manage COVID-19. *Science*. 2020 May 15: eabc1227. DOI: 10.1126/science.abc1227.
14. Mathur G, Mathur S. Antibody Testing For Covid-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 May 15: aqaa082. DOI: 10.1093/ajcp/aqaa082.
15. Metodicheskie ukazaniya MU 3.1.2943-11 "Organizatsiya b provedenie serologicheskogo monitoring sostoyaniya kolektivnogo immuniteta k infektsiyam, upravlyayemyim sredstvami spetsificheskoi profilaktiki (difteriya, stolbnyakm koklyush, korj, krasnukha, gepatit B)". Russian.
16. Available from: <https://vademec.ru/news/2020/05/25/mgfoms-opredelil-stoimost-provedeniya-testa-na-antitela-k-covid-19>. Доступ 26 мая 2020.

АНТИТЕЛА IgM И IgG К ВИРУСУ SARS-COV-2 У НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ МАТЕРЕЙ С COVID-19

А. А. Семешкин, В. И. Вечорко, Б. В. Силаев [✉], Н. Н. Левчук, С. В. Поликарпова, О. В. Аверков

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

Исследование иммунитета у новорожденных, родившихся от матерей с доказанной новой коронавирусной инфекцией COVID-19, — малоизученный в настоящее время вопрос. Целью работы было проанализировать уровень иммуноглобулинов IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2. Исследование проводили у 20 матерей в возрасте 19–39 лет и 21 новорожденного (родилась одна двойня). В случае обнаружения повышенного уровня иммуноглобулинов IgM, IgG к вирусу SARS-CoV-2 у матери у новорожденного выявляли повышенный уровень IgG. Имеется предположение, что иммуноглобулины IgM к вирусу SARS-CoV-2 не проникают через плаценту от матери к ребенку. Во всех наблюдениях исследование с помощью ПЦР у новорожденных показало отрицательный результат, таким образом, вертикального пути передачи COVID-19, по всей видимости, нет. Необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, COVID-19, SARS-CoV-2, пути передачи инфекции, новорожденные, матери, иммунитет новорожденных, иммуноглобулины, IgM, IgG, плацента

Вклад авторов: А. А. Семешкин — сбор материала, забор крови для исследования IgM и IgG у новорожденных, взятие мазков для ПЦР-диагностики у новорожденных, анализ полученных данных, написание статьи; В. И. Вечорко, О. В. Аверков — планирование исследования, анализ полученных данных; Б. В. Силаев — планирование исследования, забор крови для исследования IgM и IgG у матерей, взятие мазков для ПЦР-диагностики у матерей, анализ полученных данных, поиск литературных источников, написание статьи; Н. Н. Левчук — сбор материала, выполнение лабораторных исследований IgM и IgG, анализ полученных данных; С. В. Поликарпова — сбор материала, выполнение ПЦР-диагностики у матерей и новорожденных, поиск литературных источников, анализ полученных данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Городской клинической больницы № 15 имени О. М. Филатова (протокол № 5 от 12 мая 2020 г.) все участники исследования и их законные представители подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Борислав Владимирович Силаев
ул. Вешняковская, д. 23/1, г. Москва, 115117; drsilae@yandex.ru

Статья получена: 26.05.2020 **Статья принята к печати:** 13.06.2020 **Опубликована онлайн:** 26.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.036

IgM AND IgG ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 IN NEONATES BORN TO MOTHERS WITH COVID-19

Semeshkin AA, Vechorko VI, Silaev BV [✉], Levchuk NN, Polikarpova SV, Averkov OV

Filatov City Clinical Hospital № 15, Moscow, Russia

Immunity against the novel coronavirus infection in neonates born to mothers with PCR-confirmed COVID-19 is an understudied field of research. The aim of this study was to analyze the levels of IgM and IgG antibodies against SARS-CoV-2. The study was carried out in 20 mothers aged 19 to 39 years and 21 neonates (including a pair of twins). Babies born to mothers with elevated IgM and IgG against SARS-CoV-2 also had elevated IgG. There is a hypothesis that anti-SARS-CoV-2 IgM are not passed on to the child across the placenta. In all cases studied in this work, neonates were PCR-negative for the virus, which suggests the absence of vertical COVID-19 transmission. Further research is needed.

Keywords: novel coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, transmission routes, neonate, mother, neonatal immunity, immunoglobulin, IgM, IgG, placenta

Author contribution: Semeshkin AA — data acquisition, blood collection for antibody tests in neonates, nasopharyngeal swab collection for PCR tests in neonates, analysis of the obtained data, manuscript preparation; Vechorko VI, Averkov OV — study planning, analysis of the obtained data; Silaev BV — study planning, blood collection for antibody tests in mothers, nasopharyngeal swab collection for PCR tests in mothers, data analysis, literature analysis, manuscript preparation; Levchuk NN — data acquisition, laboratory tests for IgM and IgG, analysis of the obtained data; Polikarpova SV — data acquisition, PCR tests in mothers and neonates, literature analysis, analysis of the obtained data.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Filatov City Clinical Hospital No. 15 (Protocol No. 5 dated May 12, 2020). Informed consent was obtained from all study participants or their legal representatives.

✉ **Correspondence should be addressed:** Borislav V. Silaev
Veshnyakovskaya, 23/1, Moscow, 115117; drsilae@yandex.ru

Received: 26.05.2020 **Accepted:** 13.06.2020 **Published online:** 26.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.036

Исследование иммунитета новорожденных, рожденных от матерей с генетически доказанной новой коронавирусной инфекцией COVID-19, представляет большой интерес в связи с продолжающейся пандемией, вызванной COVID-19. В зарубежной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные этому вопросу. Представленные авторами данные в отношении иммунитета новорожденных к новой коронавирусной инфекции COVID-19 единичны, а результаты наблюдений требуют дальнейшего углубленного изучения и анализа. Считается, что вертикальный путь передачи новой коронавирусной инфекции COVID-19 от матери к ребенку крайне маловероятен [1]. Описано всего несколько достаточно спорных случаев возможной вертикальной передачи вируса в Китае [2, 3] и в Перу [4].

Согласно действующему руководству ВОЗ, анализы на коронавирус COVID-19 необходимо проводить с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) как наиболее точного и надежного метода диагностики вирусной инфекции [5]. Он позволяет определить даже очень небольшое количество РНК вируса в биологическом материале человека. Тестирование заболевших на наличие антител IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2 в настоящее время применяют достаточно широко, и использование этой методики в отношении новорожденных и матерей представляется достаточно интересным методом для изучения иммунитета новорожденных, родившихся от матерей с генетически доказанной новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Целью работы было исследовать

иммунитет новорожденных, появившихся от матерей с генетически доказанной коронавирусной инфекцией COVID-19. Наличие иммуноглобулинов класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 у новорожденных позволяет судить о наличии врожденного иммунитета и носит прогностический характер.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для исследования была отобрана группа рожениц ($n = 20$), возраст которых составлял от 19 до 39 лет, поступивших на роды в родильный дом ГKB № 15 имени О. М. Филатова в период с 01.05.2020 по 20.05.2020. При поступлении в родильный дом всем роженицам была выполнена ПЦР-диагностика COVID-19. Кроме того, на первом–втором дне жизни всем новорожденным ($n = 21$, в одном случае родилась двойня) также проводили ПЦР-исследование. Критерии включения пациенток в исследование: диагностирование COVID-19 в предродовом периоде; наличие легких и среднетяжелых клинических проявлений COVID-19, тяжесть течения заболевания оценивали согласно Временным методическим рекомендациям [6]. Критерии исключения: в исследование не вошли родильницы с ОРВИ, а также родильницы с отрицательными результатами ПЦР-диагностики на РНК вируса SARS-CoV-2.

Лабораторную (молекулярно-биологическую) диагностику новой коронавирусной инфекции (COVID-19) проводили в соответствии с актуальной на момент исследования версией временных методических рекомендаций [6].

Забор биоматериала для ПЦР-диагностики коронавируса SARS-CoV-2 проводили согласно действующим нормативным документам [7]. Этиологическая диагностика новой коронавирусной инфекции COVID-19 заключается в установлении факта инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2 на основе выявления в биоматериале от пациента РНК SARS-CoV-2 с использованием методов

амплификации нуклеиновых кислот. В нашей лаборатории выделение РНК коронавируса SARS-CoV-2 проводили на тест-системах «Ампли-Тест SARS-CoV-2», разработанных в Центре стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства (ЦСП ФМБА; Россия).

Проводили тестирование на антитела класса IgM и IgG к штамму вируса SARS-CoV-2 в сыворотке у родильниц и новорожденных на первый–второй день жизни с целью количественного определения антител к вирусу, вызывающему COVID-19. Взятие, транспортировку и хранение биологического материала осуществляли в соответствии с рекомендациями разработчика тест-системы.

Исследования выполняли на анализаторе CL 6000i (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co.; Китай).

Качественное определение антител IgG и IgM к вирусу SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-IgG, SARS-CoV-2-IgM) проводили иммунохемилюминесцентным методом (чувствительность и специфичность метода составляют, согласно данным разработчика, 97,8 и 97,9% соответственно). Референсные значения для примененной нами методики определения антител класса IgM и IgG к вирусу, вызывающему COVID-19, составляли 0,00–0,999 ОЕ и 0,00–9,90 Ед./мл соответственно.

Родоразрешение проводили через естественные родовые пути ($n = 16$). В четырех наблюдениях было выполнено кесарево сечение в нижнематочном сегменте по общепринятой методике. Все мамы носили маски, все медицинские сотрудники использовали защитные костюмы и маски класса защиты FFP2-3 в соответствии с требованиями эпидемиологического режима.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Младенцы были изолированы от матерей сразу после родов. Все дети имели на первой минуте рождения 8–9 баллов по

Таблица 1. Уровень антител класса IgM и IgG к вирусу COVID-19 у матерей и новорожденных

Наблюдение	IgM		IgG	
	У матери	У ребенка	У матери	У ребенка
1	2,51	0,15	0,40	0,49
2	8,84	0,30	34,76	11,24
3	9,29	0,43	136,02	109,84
4	0,96	0,26	0,53	0,97
5	1,19	0,24	17,54	15,01
6	0,48	0,24	0,32	0,70
7	2,01	0,24	24,81	9,69
8	1,19	0,18	92,4	42,12
9	6,70	0,26	116,04	24,41
10	6,80	0,14	66,32	89,12
11	0,68	0,25	1,54	1,20
12	0,31	0,21	0,32	0,58
13	14,43	0,15	38,86	23,90
14	2,85	1 ребенок 0,14 2 ребенок 0,16	47,77	1 ребенок 8,44 2 ребенок 6,83
15	1,26	0,62	39,30	12,67
16	2,52	0,95	6,52	2,11
17	0,41	0,12	103,02	38,64
18	1,94	0,41	19,86	12,54
19	2,48	0,94	6,34	1,15
20	10,08	8,54	24,12	16,87

шкале Апгар, на пятой минуте — 9–10 баллов. Неонатальные мазки из носа и носоглотки, взятые на первый–второй день жизни, имели отрицательные результаты ПЦР-теста у всех новорожденных. Одновременно с выполнением ПЦР-диагностики COVID-19 выполняли исследование крови на IgM и IgG к вирусу SARS-CoV-2.

В сыворотке у всех новорожденных были обнаружены антитела. У одного младенца были повышены уровни IgM и IgG, у четырех новорожденных уровень IgM и IgG находился в пределах референсных значений, такие же результаты были получены и у матерей. У 14 новорожденных выявлено превышение уровня IgG, при этом у матерей были выше референсных значений и уровень IgM, и уровень IgG (табл. 1).

У всех детей, рожденных от обследованных матерей с подтвержденным COVID-19, РНК вируса SARS-CoV-19 не была обнаружена в мазке из горла методом ПЦР. Тем не менее у всех новорожденных в образцах сыворотки крови были выявлены вирусспецифичные антитела класса IgG.

Уровень IgG был повышен у 16 детей, но в тех же случаях, когда он был повышен и у матери ($n = 16$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод, что, по всей видимости, антитела класса IgG пассивно переносятся кровотоком матери через плаценту к плоду во время конца второго триместра и достигают наибольшего уровня к моменту рождения. По данным других источников,

антитела класса IgM, которые в нашем исследовании были обнаружены у одного новорожденного, не передаются от матери к плоду из-за его большого молекулярного веса [1–4]. Однако IgM мог продуцировать сам младенец, если вирус, вызывающий COVID-19, проник в плаценту. Наши данные совпадают с результатами китайских исследователей, полученными на меньшем числе наблюдений [8–10]. Мы не проводили исследование плаценты, поэтому данное суждение всего лишь предположение. Наше наблюдение ограничено небольшим размером выборки, отсутствием исследования вируса и антител в амниотической жидкости и грудном молоке. Тем не менее полученные данные могут быть важны для понимания серологических характеристик новорожденных, чьи матери инфицированы вирусом SARS-CoV-2.

ВЫВОДЫ

1. В крови новорожденных от матерей с генетически доказанной новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на первый–второй день жизни в крови обнаружен повышенный уровень IgG. 2. Повышенный уровень вирусспецифичного IgG может свидетельствовать о наличии врожденного иммунитета к этой инфекции. 3. Отсутствие повышенного уровня вирусспецифичного IgM у новорожденных от матерей с генетически доказанной COVID-19 обусловлено с большой степенью вероятности невозможностью трансплацентарного переноса от матери IgM в связи с большим молекулярным весом.

Литература

1. Kimberlin DW, Stagno S. Can SARS-CoV-2 Infection Be Acquired In Utero? More Definitive Evidence Is Needed. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1788–9. DOI: 10.1001/jama.2020.4868.
2. Shaoshuai Wang, Lili Guo, Ling Chen, Weiyong Liu, Yong Cao, Jingyi Zhang, et al. A Case Report of Neonatal 2019 Coronavirus Disease in China. *Clinical Infectious Diseases*, ciae225, Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae225>.
3. Dong L, Tian J, He S, et al. Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *JAMA*. Published March 26, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.4621.
4. Alzamora MC, Paredes T, Caceres D, Webb CM, Valdez LM, La Rosa M. Severe COVID-19 during Pregnancy and Possible Vertical Transmission [published online ahead of print, 2020 Apr 18]. *Am J Perinatol*. 2020; 10.1055/s-0040-1710050. DOI: 10.1055/s-0040-1710050.
5. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance 2020. Posted January 17, 2020. Accessed March 5, 2020. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
6. Временные методические рекомендации МЗ РФ.

- «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия № 6 (24.04.2020). Доступно по ссылке (активна на 09 июня 2020 г.): <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74067237/>.
7. Временная инструкция МЗ РФ от 10.04.2020 г. № 17-1/И1-2004 «Временная инструкция по вопросу забора биологического материала у всех пациентов с подозрением на пневмонию или с подтвержденной пневмонией, поступающих на госпитализацию в стационары». Доступно по ссылке (активна на 11 июня 2020 г.): <http://base.garant.ru/74167237/>.
 8. Zeng H, Xu C, Fan J, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1848–9. DOI: 10.1001/jama.2020.4861.
 9. Parazzini F, Bortolus R, Mauri PA, Favilli A, Gerli S, Ferrazzi E. Delivery in pregnant women infected with SARS-CoV-2: A fast review. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020 Jul; 150 (1): 41–46. DOI: 10.1002/ijgo.13166. Epub 2020 May 1.
 10. Liu P, Zheng J, Yang P, Wang X, Wei C, Zhang S, et al. The Immunologic Status of Newborns Born to SARS-CoV2-infected Mothers in Wuhan, China *J Allergy Clin Immunol*. 2020 May 10: S0091-6749(20)30640-0. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.038.

References

1. Kimberlin DW, Stagno S. Can SARS-CoV-2 Infection Be Acquired In Utero? More Definitive Evidence Is Needed. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1788–9. DOI: 10.1001/jama.2020.4868.
2. Shaoshuai Wang, Lili Guo, Ling Chen, Weiyong Liu, Yong Cao, Jingyi Zhang, et al. A Case Report of Neonatal 2019 Coronavirus Disease in China. *Clinical Infectious Diseases*, ciae225, Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciae225>.
3. Dong L, Tian J, He S, et al. Possible vertical transmission of

- SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *JAMA*. Published March 26, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.4621.
4. Alzamora MC, Paredes T, Caceres D, Webb CM, Valdez LM, La Rosa M. Severe COVID-19 during Pregnancy and Possible Vertical Transmission [published online ahead of print, 2020 Apr 18]. *Am J Perinatol*. 2020; 10.1055/s-0040-1710050. DOI: 10.1055/s-0040-1710050.
 5. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel

- coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance 2020. Posted January 17, 2020. Accessed March 5, 2020. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
6. Vremennye metodicheskie rekomendacii MZ RF. «Profilaktika, diagnostika i lechenie novej koronavirusnoj infekcii (COVID-19)» versija # 6 (24.04.2020). Available from (aktivna na 09 ijunja 2020 g.): <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74067237/>. Russian.
 7. Vremennaja instrukcija MZ RF ot 10.04.2020 g. # 17-1/11-2004 «Vremennaja instrukcija po voprosu zabora biologicheskogo materiala u vseh pacientov s podozreniem na pnevmoniju ili s podtverzhdennoj pnevmoniej, postupajushhih na gospitalizaciju v stacionarny». Available from (aktivna na 11 ijunja 2020 g.): <http://base.garant.ru/74167237/>. Russian.
 8. Zeng H, Xu C, Fan J, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. JAMA. 2020; 323 (18): 1848–9. DOI: 10.1001/jama.2020.4861.
 9. Parazzini F, Bortolus R, Mauri PA, Favilli A, Gerli S, Ferrazzi E. Delivery in pregnant women infected with SARS-CoV-2: A fast review. Int J Gynaecol Obstet. 2020 Jul; 150 (1): 41–46. DOI: 10.1002/ijgo.13166. Epub 2020 May 1.
 10. Liu P, Zheng J, Yang P, Wang X, Wei C, Zhang S, et al. The Immunologic Status of Newborns Born to SARS-CoV2-infected Mothers in Wuhan, China J Allergy Clin Immunol. 2020 May 10: S0091-6749(20)30640-0. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.038.

СИНДРОМ МИКРОЦЕФАЛИИ В СОЧЕТАНИИ С КАПИЛЛЯРНЫМИ МАЛЬФОРМАЦИЯМИ

О. А. Шагина ✉, Н. А. Семенова, Л. А. Бессонова, Е. А. Ларшина, Н. С. Бескоровайный, Е. Ю. Захарова, О. П. Рыжкова, А. В. Поляков

Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

Синдром микроцефалии в сочетании с капиллярными мальформациями (MICCAP) (OMIM #614261) — тяжелое моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, причиной которого являются мутации гена *STAMBP*. На сегодняшний день в мировой литературе описано менее 20 случаев данного синдрома. В работе представлены три новых случая редкого синдрома MICCAP: на основании клинко-генеалогического анализа, методов биохимического исследования, анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, прямого автоматического секвенирования по Сенгеру установлена причина болезни у трех больных из двух неродственных семей. У двух братьев выявлен вероятно-патогенный вариант гена *STAMBP* с.188A>G (p.Tyr63Cys) в гомозиготном состоянии. У девочки из второй семьи причиной клинического фенотипа явилось сочетание двух наследственных заболеваний: галактоземии, обусловленной патогенными вариантами с.563A>G и с.855G>T гена *GALT* в компаунд-гетерозиготном состоянии и MICCAP, обусловленного вариантами с.204-5C>G и с.668_669delCA гена *STAMBP*, один из которых возник *de novo*. Оценены частота синдрома микроцефалии в сочетании с капиллярными мальформациями в России — один случай на 120 000 человек (ДИ: 1/356 724–1/62 691) и частота носительства данного синдрома — один случай на 173 человека. Исследование гена *STAMBP* позволяет быстро найти молекулярно-генетическую причину синдрома MICCAP. При выборе тактики диагностики и терапии в каждом конкретном случае необходимо учитывать возможность сочетания у одного больного двух редких наследственных патологий.

Ключевые слова: микроцефалия, гемангиома, капиллярная мальформация, *STAMBP*, галактоземия, *GALT*

Вклад авторов: О. А. Шагина — дизайн исследования, молекулярно-генетический анализ, оценка частот, статистическая обработка; Н. А. Семенова, Л. А. Бессонова — клиническое обследование и медико-генетическое консультирование семей больных; Е. А. Ларшина — биохимическое исследование, анализ гена *GALT*; Н. С. Бескоровайный — обработка массива экзомных данных; Е. Ю. Захарова — биохимическое исследование, расчет частоты болезни; О. П. Рыжкова — анализ патогенности вариантов, экзомное секвенирование; А. В. Поляков — выбор праймеров для молекулярно-генетического анализа.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра имени Н. П. Бочкова (протокол номер 5/8 от 12 ноября 2018 г.). Все пациенты или их законные представители подписали добровольное информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований, публикацию клинических, молекулярно-генетических данных, включая фото- и видеоматериалы, с сохранением анонимности.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Анатольевна Шагина
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522; schagina@dnalab.ru, schagina_o@mail.ru

Статья получена: 18.05.2020 **Статья принята к печати:** 03.06.2020 **Опубликована онлайн:** 18.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.033

MICROCEPHALY-CAPILLARY MALFORMATION SYNDROME

Shchagina OA ✉, Semenova NA, Bessonova LA, Larshina EA, Beskorovainiy NS, Zakharova EYu, Ryzhkova OP, Poliakov AV

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

Microcephaly-capillary malformation syndrome (MICCAP: OMIM 614261) is a severe monogenic disorder inherited in an autosomal recessive manner caused by mutations in the *STAMBP* gene. There are less than 20 published cases of the syndrome to date. The paper reports three new cases of rare MICCAP syndrome. The cause of the disorder was confirmed in three affected individuals from two unrelated families by pedigree analysis, biochemical analysis, RFLP analysis and automated Sanger sequencing. The two brothers were homozygous for the potentially pathogenic *STAMBP* gene variant c.188A>G (p.Tyr63Cys). Clinical phenotype of the girl from the second family resulted from the combination of two genetic disorders: galactosemia caused by the compound heterozygosity for the pathogenic *GALT* gene variants (c.563A>G and c.855G>T), and MICCAP caused by the *STAMBP* gene variants (c.204-5C>G and c.668_669delCA), one of which originated *de novo*. The prevalence of microcephaly-capillary malformation syndrome in Russia is evaluated, it is one per 120,000 people (CI: 1/356 724–1/62 691). The carrier frequency is one per 173 people. The target *STAMBP* gene analysis makes the genetic confirmation of the MICCAP syndrome quicker. When determining the tactics of diagnosis and therapy in each particular case, the possibility of combination of two rare genetic disorders in one patient should be considered.

Keywords: microcephaly, hemangioma, capillary malformation, *STAMBP*, galactosemia, *GALT*

Author contribution: Shchagina OA — study design, molecular genetic analysis, frequency estimation, statistical analysis; Semenova NA, Bessonova LA — clinical examination and genetic counseling of the patients' families; Larshina EA — biochemical assays, *GALT* gene analysis; Beskorovainiy NS — exome sequencing data processing; Zakharova EYu — biochemical analysis, prevalence calculation; Ryzhkova OP — pathogenicity analysis of genetic variants, exome sequencing; Poliakov AV — selection of primers for molecular genetic analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol № 5/8 dated November 12, 2018). The informed consent to molecular genetic testing, and anonymity-preserving clinical and molecular genetics data publishing (including photos and videos) was submitted by all participants or their legal representatives.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Shchagina
Moskvorechye, 1, Moscow, 115522; schagina@dnalab.ru, schagina_o@mail.ru

Received: 18.05.2020 **Accepted:** 03.06.2020 **Published online:** 18.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.033

Синдром микроцефалии в сочетании с капиллярными мальформациями (MICCAP: OMIM #614261, микроцефалия–гемангиом) — тяжелое моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. У пациентов

наблюдаются прогрессирующая микроцефалия, глубокая умственная отсталость, ранняя фармакорезистентная эпилепсия и сосудистые мальформации на коже, связанные с аномальным развитием капилляров. Кроме

того, для ряда больных характерны дисморфичные черты лица, гипоплазия дистальных фаланг пальцев, а также врожденные пороки сердца [1, 2].

Причиной синдрома являются мутации гена *STAMBP*. Белок *STAMBP* участвует в регуляции эндосомной сортировки убиквитинированных белков и их транспорте из эндосом в лизосомы. Эндосомная сортировка — это высокодинамичный процесс, имеющий фундаментальное значение для поддержания гомеостаза белков посредством активной регуляции рецептор-опосредованной трансдукции сигналов и обеспечения аутофагии [3]. Нарушение эндосомной сортировки приводит к внутриклеточному накоплению убиквитинированных белков [4, 5]. Белковые агрегаты вызывают повреждения клеток головного мозга [6]. В то же время в клеточных линиях больных с мутациями гена *STAMBP* было выявлено повышенное количество GTP-связанного RAS-белка (активная форма RAS), что свидетельствует о вовлечении белка *STAMBP* в сигнальный путь RAS-MAPK [1]. Известно, что капиллярные мальформации служат характерным признаком различных распаданий, поскольку мутации в генах этой сети приводят к врожденным аномалиям развития капилляров [7].

На сегодняшний день описано менее 20 больных с синдромом MICCAP. У всех выявлены различные типы мутаций гена *STAMBP* в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии [1, 8, 9]. В России описаны два случая данного синдрома: девочка — компаунд-гетерозигота по вариантам с.204-5C>G и с.273delA [10] и мальчик, причиной болезни которого стал вариант с.188A>G (p.Tyr63Cys) гена *STAMBP* в гомозиготном состоянии [11].

Целью работы было представить результаты клинического и молекулярно-генетического обследований трех больных с синдромом MICCAP из двух семей, не состоящих в родстве.

Описание клинических случаев

Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных и их родственников из двух неродственных семей ST1 и ST5, обратившихся в Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова за консультацией.

Поиск мутаций в гене *STAMBP* (NM_201647.3) проводили методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру с праймеров, фланкирующих все экзоны гена. Для пробанда из семьи ST5 был определен уровень активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы и проведен поиск частых мутаций с.563A>G (p.Gln188Arg), с.855G>T (p.Lys285Asn) и полиморфного варианта Дуарте с.940A>G (p.N314D) в гене *GALT* (MIM 606999; RefSeq:NM_000155.3) методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

В качестве контроля использовали результаты секвенирования 1036 экзонов (2072 хромосомы) больных, не связанных родством, проживающих в России, с различной наследственной патологией, отличной от синдрома MICCAP. Исследование выполняли на IlluminaNextSeq 500 (Illumina; США) с использованием наборов IlluminaTruSeq® ExomeKit (Illumina; США) и IDT xGen® (IDT; США) для пробоподготовки.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы MS Excel 2016 (Microsoft Corporation; США).

Семья ST1. Пробанд — больной мальчик ST1.1, ребенок от первой беременности, протекавшей на фоне затяжного

ОРВИ в I триместре, постоянной угрозы прерывания с начала II триместра; с двадцатой недели беременности наблюдалась задержка развития плода. Ребенок родился на 38–39-й неделе беременности, масса тела при рождении составила 2540 г, длина — 47 см, окружность головы — 32 см, оценка по Апгар — 8/9 баллов. До трех месяцев развивался без особенностей. В возрасте трех месяцев родители зафиксировали первый судорожный приступ в виде миоклоний с последующим резким регрессом в психомоторном развитии.

При проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) в возрасте четырех месяцев была обнаружена диффузная корково-подкорковая атрофия больших полушарий. При проведении видео-ЭЭГ-мониторинга сна выявлена генерализованная высокоамплитудная полиморфная медленноволновая гиперсинхронизированная активность в сочетании с комплексами пик-волна. Были отмечены доминирование пик-волновой активности на протяжении всего времени исследования в теменно-затылочных отделах полушарий и периодически — паттерн в виде снижения амплитуды гипсаритмических волн.

На момент осмотра в возрасте 1 год 7 месяцев ребенок был полностью обездвижен, отсутствовали зрение и слух, кормление осуществлялось через зонд. Продолжительность и частота судорог динамически нарастали. Противосудорожная терапия была абсолютно не эффективна. Рост ребенка — 81 см (50 центилей), вес — 9,4 кг (менее 3 центилей), окружность головы — 43 см (менее 3 центилей). У больного выявлены тяжелая белково-энергетическая недостаточность, микроцефалия и легкая позиционная деформация черепа, множественные гемангиомы на коже ягодиц, поясничной области, правом бедре, спине, умеренный гипертрихоз лба, густые брови и ресницы (рис. 1).

Ребенок умер в возрасте 2,5 лет по причине развития септических осложнений инфекции дыхательных путей.

Сибс пробанда — больной мальчик ST1.4, родившийся от второй беременности. По результатам ультразвукового исследования (УЗИ) с 28–30-й недель беременности было выявлено несоответствие размеров окружности головы плода сроку гестации. Роды срочные, масса тела при рождении составила 3100 г, длина — 51 см, окружность головы — 32 см. В возрасте двух месяцев родителями зафиксирован первый приступ судорог. После этого судороги стали ежедневными и многочисленными. Проявлялись в виде замирания и заведения глаз кверху. Раннее развитие до двух месяцев соответствовало возрасту. Ребенок находился на искусственном вскармливании, испытывал трудности при глотании — часто давился. Родители предъявляли жалобы на частые вскрикивания и беспокойство с запрокидыванием головы, при которых отмечалось повышение артериального давления до 130/70 мм рт. ст., миоклонии конечностей даже при засыпании и иногда во сне, частые замирания с остановкой взгляда, иногда — «салаамовы поклоны», отсутствие зрительного контакта. Из противосудорожных средств больной получал вальпроовую кислоту и вигабатрин, на фоне которых наблюдалась умеренная положительная динамика. Ребенок осмотрен генетиком-неврологом в возрасте пяти месяцев. Фенотип: рост — 63 см (50–75 центилей), вес — 6820 г (50 центилей), окружность головы — 37 см (менее 3 центилей), микроцефалия, большой родничок 2,5 × 2,5 см, на коже многочисленные гемангиомы диаметром 0,5–2 см. На момент осмотра ребенок взгляд не фиксировал, предмет не прослеживал, голову не удерживал; мышечный

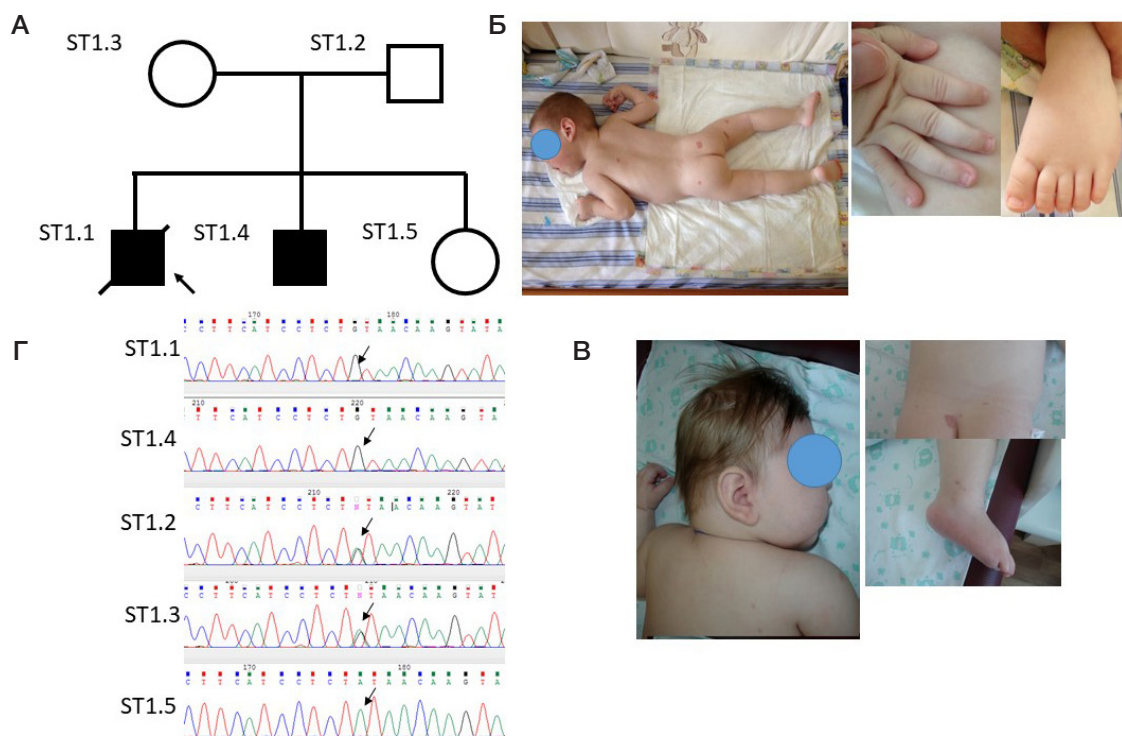


Рис. 1. Фенотип, родословная и результаты секвенирования членов семьи ST1. **А.** Родословная семьи ST1. **Б.** Внешний вид больного ST1.1 в возрасте 2 лет. **В.** Внешний вид больного ST1.4 в возрасте 5 месяцев. **Г.** Хроматограммы секвенирования по Сенгеру больного ST1.1, больного ST1.4, отца (ST1.2), матери (ST1.3) и здорового сибса ST1.5 (пробанд указан стрелкой)

тонус умеренно диффузно снижен, рефлексы живые; на приеме неоднократно начинались приступы в виде замирания и заведения глаз вверх. Кроме того, обращали на себя внимание выраженное беспокойство ребенка, вскрикивания, миоклонии конечностей. Отмечен постоянный эффект плавающих глаз с элементами горизонтального и ротаторного нистагма. Язык в полости рта напряжен, поднят вверх. Рефлексы орального автоматизма оживлены. Сухожильные рефлексы оживлены, с клоноидами стоп. Отмечен выраженный «старт-рефлекс» при прикосновении. Психомоциональная сфера с задержкой в развитии.

На основании клинической картины, характеризующейся специфическими фенотипическими проявлениями (сочетание микроцефалии с капиллярными аномалиями), и наличия двух больных сибсов, был поставлен диагноз редкого аутосомно-рецессивного заболевания — синдрома MICCAP. Поскольку во всех уже описанных случаях причиной заболевания являются мутации в гене *STAMBP*, был проведен поиск мутаций в этом гене методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру.

В результате проведенного исследования у больных выявлен ранее дважды описанный при синдроме MICCAP вариант NM_201647.3: c.188A>G (p.Tyr63Cys) гена *STAMBP* в гомозиготном состоянии [1, 11]. Оба родителя оказались гетерозиготными носителями данного варианта. Аллельная частота данного варианта, согласно базе gnomad [12], составляет 0,0000637. В контрольной группе экзотов российских больных с различной наследственной патологией данный вариант был выявлен на одной хромосоме из 2072, т. е. частота составила 0,00048 (мужчина 1973 года рождения с диагнозом «гемофилия А» и выявленным патогенным вариантом в гене F8). В России данный вариант был описан тоже в гомозиготном состоянии у больного с синдромом MICCAP [11]. Среди всех известных нам в России больных с данным синдромом вариант c.188A>G выявлен на четырех независимых хромосомах

из восьми. Таким образом, распространенность варианта у больных значительно выше, чем в контрольной группе. Отношение шансов (OR), полученное при исследовании «случай–контроль», составляет 2071 (95% ДИ: 187–22 849).

Ген *STAMBP* имеет низкий уровень доброкачественных миссенс-вариантов, и миссенс-мутации являются обычной причиной развития синдрома MICCAP. Таким образом, согласно критериям ACMG, данный вариант был признан вероятно-патогенным (PS4, PM2, PP2, PP3, PP5) [13].

Через два года после рождения второго ребенка в семье наступила третья беременность и родители обратились для проведения пренатальной диагностики плода на сроке беременности 11–12 недель. У плода не было выявлено изменений нуклеотидной последовательности гена *STAMBP*. Беременность закончилась рождением здоровой девочки.

Семья ST5. Семья ST5 обратилась по вопросу уточнения диагноза у дочери. Девочка трех недель жизни, четвертый ребенок в некровнородственном браке здоровых родителей. В данном браке есть еще трое детей (здоровые мальчик и девочка, а также сын, рожденный преждевременно на 31-й неделе беременности, страдающий ДЦП). Полусибс по матери (брат) здоров. У матери в анамнезе медицинский аборт и внематочная беременность. Данная беременность протекала с анемией, ринофарингитом, вакцинацией против гриппа в 35 недель. Роды в срок. При рождении масса тела ребенка составила 2910 г (10 центилей), длина — 51 см (50 центилей), окружность головы — 30 см (менее 3 центилей), оценка по шкале Апгар — 8/8 баллов (рис. 2).

У ребенка с рождения на коже туловища и конечностей заметны множественные плоские гемангиомы округлой формы, не возвышающиеся над поверхностью кожи. Состояние ребенка средней тяжести за счет неврологической симптоматики в виде синдрома угнетения ЦНС. Девочка была переведена в отделение реанимации для наблюдения. В респираторной поддержке не нуждалась. На пятые

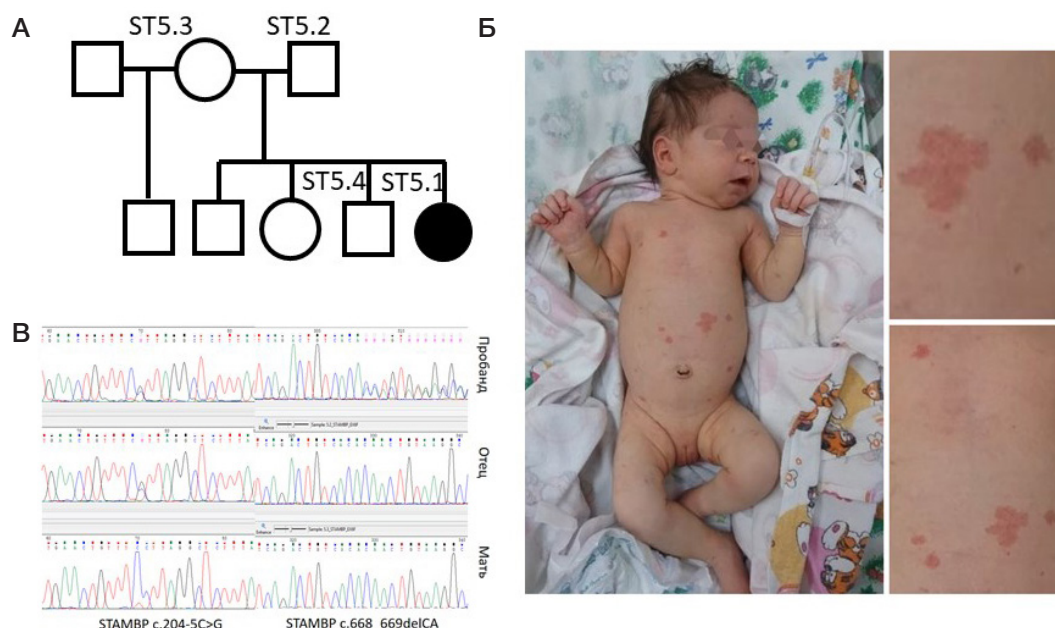


Рис. 2. Фенотип, родословная и результаты секвенирования членов семьи ST5. **А.** Родословная семьи ST5. **Б.** Внешний вид больной в возрасте 3 недель жизни. **В.** Хроматограммы секвенирования по Сенгеру пробанда, отца и матери

сутки было отмечено нарастание гипербилирубинемии, синдрома холестаза и синдрома цитоза (повышение концентрации трансаминаз до пяти норм; максимальный уровень аспартатаминотрансферазы составил 229 Е/л, уровень аланинаминотрансферазы достигал 143 Е/л). В связи с развитием коагулопатии на 10-е сутки жизни потребовалось переливание плазмы. В клиническом анализе крови ребенка уровень гемоглобина и число тромбоцитов в норме. По результатам нейросонографии, проведенной на шестые сутки жизни, были отмечены эхо-признаки субэпидимальной псевдокисты слева. При УЗИ сердца пороков не выявлено, отмечены аневризма межпредсердной перегородки, функционирующее овальное окно. Из центра неонатального скрининга было сообщено о повышении уровня галактозы (концентрация общей галактозы не известна). Проведен ферментный анализ активности галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы. Выявлено значимое снижение активности фермента до 0,63 Е/гНб, что составило 7% от нормы (норма 4,4–15 Е/гНб).

Фенотип: микроцефальная форма черепа, микрогения, длинный филтер; генерализованно на коже живота, спины, ягодиц, конечностей отмечены множественные округлые гемангиомы, которые не возвышаются над поверхностью кожи, имеют «винный» цвет, при надавливании слегка бледнеют.

Методом ПЦР-ПДРФ проведено исследование частых мутаций в гене *GALT* NM_000155.3. Выявлены частые патогенные варианты с.563A>G (p.Gln188Arg) и с.855G>T (p.Lys285Asn) в гетерозиготном состоянии [14]. Обследование родителей установило *транс*-положение выявленных патогенных вариантов (замена с.563A>G (p.Gln188Arg) унаследована от матери, с.855G>T (p.Lys285Asn) — от отца).

При исследовании гена *STAMPB* выявлены варианты с.204-5C>G и с.668_669delCA в гетерозиготном состоянии. Вариант NM_201647.3:c.204-5C>G (rs746354315) ранее описан как вероятно патогенный у российской больной с синдромом MICCAP в компаунд-гетерозиготном состоянии с патогенным вариантом с.273delA [10]. По данным программ предсказания, этот вариант влияет на сплайсинг. Частота варианта, согласно базе gnomad, составляет 0,00000399.

В контрольной группе экзотов российских больных с различной наследственной патологией данный вариант был выявлен на одной хромосоме из 2072, его частота составляет 0,00048 (у женщины 1980 года рождения, являющейся мамой пробанда с диагнозом «задержка развития экспрессивной речи»). Среди всех известных нам российских больных с синдромом MICCAP вариант с.204-5C>G выявлен на двух независимых хромосомах из восьми. Таким образом, распространенность варианта у больных значительно выше, чем в контрольной группе. Отношение шансов (OR), полученное при исследовании «случай–контроль», составляет 690 (95% ДИ: 55–8672). Согласно критериям ACMG, вариант с.204-5C>G является патогенным (PS4, PM2, PM3, PP4, PP5) [13]. Вариант NM_201647.3:c.668_669delCA приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного терминирующего кодона p.Thr223AsnfsTer6. Данная делеция не была описана ранее у больных с синдромом MICCAP. Этот вариант не встречался в базе gnomad и в контрольной группе экзотов российских больных. При исследовании родственников вариант с.204-5C>G был выявлен в гетерозиготном состоянии у отца и сибса больной, варианта с.668_669delCA не было выявлено у родителей и сибса пробанда. Материнство и отцовство были доказаны с использованием микросателлитных маркеров. Согласно критериям ACMG, данный вариант является патогенным (PVS1, PS2, PM2, PP4) [13].

Из-за тяжелого нетранспортабельного состояния ребенка и отсутствия планов на деторождение в будущем семья отказалась от дальнейших исследований для установления *цис-транс*-положения выявленных вариантов на уровне РНК.

Из 1036 экзотов российских больных были отобраны гетерозиготные варианты в экзонах и сайтах сплайсинга гена *STAMPB*, аллельная частота которых была ниже 1% в базе gnomad. Их патогенность была оценена согласно критериям ACMG, с использованием программы VarSome [15] (табл. 1).

По частотам встречаемости патогенных (PAT) и вероятно патогенных (LPAT) (см. табл. 1, показано *жирным шрифтом*) вариантов гена *STAMPB* были проведены оценки частоты

носительства и расчет частоты синдрома MICCAP в РФ. В экземах жителей РФ патогенные и вероятно патогенные варианты гена *STAMBP* в гетерозиготном состоянии были выявлены у 6 из 1036 человек. Согласно полученным данным, частота носительства мутаций в гене *STAMBP* составила один случай на 173 человека (1/126–1/299). Таким образом, частота болезни в РФ должна составлять один случай на 120 000 (ДИ: 1/356 724–1/62 691).

Клинический фенотип пробанда ST5.1 обусловлен сочетанием двух наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования: галактоземии и синдрома MICCAP. Тяжелое состояние в неонатальном периоде: синдром цитоза, синдром холестаза, коагулопатия — обусловлены нарушениями обмена из-за мутаций гена *GALT*, в то время как причиной микроцефалии, капиллярных мальформаций, низкого веса при рождении стали мутации гена *STAMBP*. Проявления галактоземии были скорректированы на первом году жизни, но наличие судорог и тяжелое поражение ЦНС вследствие синдрома MICCAP делают прогноз для данной пациентки неблагоприятным.

Основные клинические данные трех больных представлены в табл. 2. Клинические проявления синдрома у всех описываемых детей были достаточно типичными: во всех случаях присутствовала врожденная микроцефалия и множественные капиллярные мальформации на коже, которые по мере роста детей не исчезали, а увеличивались в размерах. В младенческом возрасте

дебютировали полиморфные эпилептические приступы, резистентные к противосудорожной терапии. Для всех обследованных детей были характерны грубая задержка психомоторного развития и неврологический дефицит. У одной больной была выражена гипоплазия фаланг пальцев рук и ногтей, у сибсов из семьи ST1 — миоклонус конечностей, плавающие движения глазных яблок. При данном синдроме наблюдаются тяжелое поражение центральной нервной системы, частая ранняя гибель из-за развившихся септических осложнений, как у старшего больного ребенка из семьи ST1.

Обсуждение клинических случаев

Все представленные на сегодняшний день в литературе клинические данные позволяют выделить «ядро» синдрома: микроцефалию, неонатальные резистентные судороги, выраженную задержку психомоторного развития и уникальный признак — хаотично расположенные множественные пятна красного цвета, которые не уменьшаются с возрастом. Все перечисленное было представлено у обследованных нами больных. По данным литературы, у детей с синдромом MICCAP могут отмечаться дисморфичные черты лица: низкий рост волос, покаты лоб, эпикант, птоз, низкопосаженные ушные раковины, микрогнатия, короткий нос. Для наблюдаемых нами больных тоже были характерны лицевые дисморфии:

Таблица 1. Варианты гена *STAMBP*, встретившиеся в экземах жителей РФ

Вариант		Число хромосом с вариантом	Аллельная частота (2072 хромосомы)	Патогенность
Положение (GRCh37/hg19)	Эффект			ACMG [13]
chr2-74058017-G-A	c.34G>A p.Glu12Lys	1	0,00048	VUS (PM1,PM2,PP2)
chr2-74058041-C-A	c.58C>A p.Gln20Lys	1	0,00048	VUS (PM1,PM2,PP2,BP4)
chr2-74058095-C-A	c.112C>A p.Arg38Ser	1	0,00048	LP (PM1,PM2,PM5,PP2,PP3)
chr2-74058143-G-T	c.160G>T p.Gly54Cys	1	0,00048	LP (PM1,PM2,PP2,PP3)
chr2-74058171-A-G	c.188A>G, p.Tyr63Cys	1	0,00048	LP (PS4,PM2,PP2, PP3,PP5)
chr2-74071935-C-G	c.204-5C>G	1	0,00048	PAT (PS4,PM2,PM3,PP4,PP5)
chr2-74072291-C-A	c.280-3C>A	1	0,00048	VUS (PM2,BP4)
chr2-74072359-C-A	c.345C>A p.Thr115Thr	1	0,00048	VUS (PM2,BP7)
chr2-74074592-C-T	c.454C>T p.Gln152*	2	0,00096	PAT (PVS1 PM2,PP3)
chr2-74074722-C-T	c.584C>T p.Pro195Leu	1	0,00048	VUS (PM2,PP2,BP4)
chr2-74074796-G-A	c.658G>A p.Asp220Asn	2	0,00096	VUS (PM2,PP2,BP4)
chr2-74074815-G-A	c.677G>A p.Arg226Lys	1	0,00048	VUS (PM2,PP2,BP4)
chr2-74076511-G-A	c.764G>A p.Arg255His	5	0,0024	VUS (PP2,PP3,BP4)
chr2-74076532-G-T	c.785G>T p.Arg262Leu	1	0,00048	VUS (PM2,PP2,PP3)
chr2-74076576-C-A	c.829C>A p.Arg277Arg	1	0,00048	VUS (PM2,BP7)
chr2-74077551-G-A	c.916G>A p.Ala306Thr	1	0,00048	VUS (PM2,PP2,BP4)
chr2-74086389-C-A	c.1014C>A p.Pro338Pro	1	0,00048	VUS (PM2,BP7)

Таблица 2. Сравнительная характеристика больных с синдромом MICCAP

Признак	ST1.1	ST1.4	ST5.1
Генотип <i>STAMBP</i>	c.[188A>G]; [188A>G] (p.Tyr63Cys)	c.[188A>G]; [188A>G] (p.Tyr63Cys)	c.[204-5c>g(; 668_669delCA]
Пол	М	М	Ж
Возраст появления первых приступов	3 месяца	2 месяца	6 месяцев
Врожденная микроцефалия	+	+	+
Окружность головы при рождении	< 4 центилей	< 4 центилей	< 3 центилей
Окружность головы на момент осмотра	< 3 центилей	< 3 центилей	< 3 центилей
Капиллярные мальформации	+	+	+
Малый вес к сроку гестации	+	-	+
Резистентные судороги с ранним началом	+	+	+
Миоклонусы	+	+	-
Гипоплазия фаланг	-	-	+
Грубая задержка развития	+	+	+
Дополнительно	Умер в возрасте 2,5 лет		Галактоземия <i>GALT</i> c.[563A>G]; [c.855G>T]

низкий рост волос у пробанда ST1.1, микрогения и длинный фильтр у больной ST5.1. Многие авторы описывают брахидактилию и гипоплазию ногтей, однако особенность строения пальцев кистей и стоп (укорочение) присутствовала только у девочки из семьи ST5.1. Миоклонус конечностей и плавающие движения глазных яблок, напротив, были выявлены у больных из семьи ST1 и отсутствовали у ST5.1 [7–11]. Таким образом, наличие и выраженность особенностей фенотипа у разных больных, за исключением микроцефалии и пятен на коже, могут быть переменными и, вероятно, зависят от их генотипа.

Сочетание двух наследственных синдромов у одного пациента ST5.1 — редкая ситуация. Особую сложность такое сочетание представляет у новорожденного ребенка, когда возникает необходимость в быстром принятии решений для спасения жизни и стабилизации состояния пациента. Частота галактоземии в России составляет, по разным оценкам, от 1 : 60 000 до 1 : 70 000 новорожденных, расчетная частота синдрома MICCAP еще ниже — 1 на 120 000 [16, 17]. Вероятность наличия у больной двух редких наследственных заболеваний крайне мала, тем не менее данный пример показывает, что такая ситуация возможна и ее необходимо учитывать при определении тактики лечения, прогнозировании возможности иметь потомство и медико-генетическом консультировании семей.

Выводы

Синдром MICCAP является редкой наследственной патологией. На сегодняшний день в мире описано менее 20 больных с данным синдромом. Наследственные микроцефалии — это большая генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний. Однако специфический клинический симптом — наличие множественных капиллярных мальформаций — позволяет заподозрить конкретный синдром, причиной которого служат мутации гена *STAMBP*. Исследование гена помогает достаточно быстро найти молекулярно-генетическую причину болезни.

Приведенный случай сочетания галактоземии и синдрома MICCAP у одного больного показывает, что несмотря на низкую вероятность наличия сразу двух редких наследственных патологий данный вариант необходимо рассматривать при определении тактики диагностики и терапии в каждой конкретной семье.

У одного из представленных в данной работе больных выявлен ранее не описанный в литературе и базах данных вариант нуклеотидной последовательности, что расширяет знания об аллельной гетерогенности синдрома MICCAP. Приведенная информация о генотипах и фенотипах больных может представлять интерес для ученых, изучающих клинко-генетические корреляции и функции белка *STAMBP*.

Литература

- McDonnell LM, Mirzaa GM, Alcantara D, Schwartzentruber J, Carter MT, Lee LJ, et al. Mutations in *STAMBP*, encoding a deubiquitinating enzyme, cause microcephaly-capillary malformation syndrome. *Nat Genet.* 2013; 45: 556–62. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng.2602>.
- Mirzaa GM, Paciorkowski AR, Smyser CD, Willing MC, Lind AC, Dobyns WB. The microcephaly-capillary malformation syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2011; Part A 155: 2080–7. DOI: 10.1002/ajmg.a.34118.
- Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T, et al. Possible involvement of a novel STAM-associated molecule “AMSH” in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem.* 1999; 274: 19129–35. DOI: 10.1074/jbc.274.27.19129.
- McCullough J, Row PE, Lorenzo Ó, Doherty M, Beynon R, Clague MJ, et al. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol.* 2006; 16 (2): 160–5. DOI: 10.1016/j.cub.2005.11.073.
- Tsang HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics.* 2006; 88 (3): 333–46. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.04.003.
- Suzuki S, Tamai K, Watanabe M, Kyuuma M, Ono M, Sugamura K, et al. AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 408 (4): 582–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.065.
- Boon LM, Mulliken JB, Viskula M. RASA1: Variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Current Opinion in Genetics and Development.* 2005; 15 (3): 265–9. DOI: 10.1016/j.gde.2005.03.004.

8. Naseer MI, Sogaty S, Rasool M, Chaudhary AG, Abutalib YA, Walker S, et al. Microcephaly-capillary malformation syndrome: Brothers with a homozygous STAMBP mutation, uncovered by exome sequencing. *Am J Med Genet Part A*. 2016; 170 (11): 3018–22. DOI: 10.1002/ajmg.a.37845.
9. Wu F, Dai Y, Wang J, Cheng M, Wang Y, Li X, et al. Early-onset epilepsy and microcephaly-capillary malformation syndrome caused by a novel STAMBP mutation in a Chinese boy. *Mol Med Rep*. 2019; 20 (6): 5145–51. DOI: 10.3892/mmr.2019.10757.
10. Демикова Н. С., Какаулина В. С., Печатникова Н. Л., Полякова Н. А., Захарова Е. Ю., Крылова Т. Д. и др. Синдром микроцефалии с капиллярными мальформациями. *Педиатрия*. 2016; 95 (5): 110–14.
11. Щугарева Л. М., Потешкина О. В. Микроцефально-капиллярный мальформационный синдром. *Российский нейрохирургический журнал имени А. Л. Поленова*. 2018; X (1): 74–9.
12. Genome Aggregation Database (gnomAD). Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
13. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17: 405–23. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
14. Coelho AI, Trabuco M, Ramos R, Silva MJ, Almeida IT de, Leandro P, et al. Functional and structural impact of the most prevalent missense mutations in classic galactosemia. *Mol Genet Genomic Med*. 2014; 2(6): 484–96. DOI: 10.1002/mgg3.94.
15. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019; 35 (11): 1978–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty897.
16. Воскобоева Е. Ю., Байдакова Г. В., Денисенков А. И., Денисенкова Е. В., Захарова Е. Ю. Галактоземия в России: молекулярно-генетические особенности, неонатальный скрининг, подтверждающая диагностика. *Медицинская генетика*. 2009; 8 (6): 25–33.
17. Новиков П.В., Ходунова А. А. Первые итоги расширенного неонатального скрининга на наследственные болезни обмена веществ в Российской Федерации. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2012; (5): 5–12.

References

1. McDonnell LM, Mirzaa GM, Alcantara D, Schwartzenruber J, Carter MT, Lee LJ, et al. Mutations in STAMBP, encoding a deubiquitinating enzyme, cause microcephaly-capillary malformation syndrome. *Nat Genet*. 2013; 45: 556–62. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng.2602>.
2. Mirzaa GM, Paciorkowski AR, Smyser CD, Willing MC, Lind AC, Dobyns WB. The microcephaly-capillary malformation syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2011; Part A 155: 2080–7. DOI: 10.1002/ajmg.a.34118.
3. Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T, et al. Possible involvement of a novel STAM-associated molecule “AMSH” in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem*. 1999; 274: 19129–35. DOI: 10.1074/jbc.274.27.19129.
4. McCullough J, Row PE, Lorenzo Ó, Doherty M, Beynon R, Clague MJ, et al. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol*. 2006; 16 (2): 160–5. DOI: 10.1016/j.cub.2005.11.073.
5. Tsang HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: Additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*. 2006; 88 (3): 333–46. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.04.003.
6. Suzuki S, Tamai K, Watanabe M, Kyuuma M, Ono M, Sugamura K, et al. AMSH is required to degrade ubiquitinated proteins in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 408 (4): 582–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.065.
7. Boon LM, Mulliken JB, Viskula M. RASA1: Variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2005; 15 (3): 265–9. DOI: 10.1016/j.gde.2005.03.004.
8. Naseer MI, Sogaty S, Rasool M, Chaudhary AG, Abutalib YA, Walker S, et al. Microcephaly-capillary malformation syndrome: Brothers with a homozygous STAMBP mutation, uncovered by exome sequencing. *Am J Med Genet Part A*. 2016; 170 (11): 3018–22. DOI: 10.1002/ajmg.a.37845.
9. Wu F, Dai Y, Wang J, Cheng M, Wang Y, Li X, et al. Early-onset epilepsy and microcephaly-capillary malformation syndrome caused by a novel STAMBP mutation in a Chinese boy. *Mol Med Rep*. 2019; 20 (6): 5145–51. DOI: 10.3892/mmr.2019.10757.
10. Demikova NS, Kakaulina VS, Pechatnikova NL, Polyakova NA, Zaharova EY, Krylova TD, et al. Hydrocephalus syndrome with capillary malformations. *Pediatrics (Santiago)*. 2016; 95 (5): 110–14.
11. Schugareva LM, Poteshkina OV. The Microcephaly-Capillary Malformation Syndrome. *Russ Neurosurg J named after Profr AL Polenov*. 2018; X (1): 74–9.
12. Genome Aggregation Database (gnomAD). Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
13. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17: 405–23. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
14. Coelho AI, Trabuco M, Ramos R, Silva MJ, Almeida IT de, Leandro P, et al. Functional and structural impact of the most prevalent missense mutations in classic galactosemia. *Mol Genet Genomic Med*. 2014; 2(6): 484–96. DOI: 10.1002/mgg3.94.
15. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019; 35 (11): 1978–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty897.
16. Voskoboeva EY, Baydakova GV, Denisenkov AI, Denisenkova EV, Zakharova EY. Galactosemia in Russia: molecular characteristics, neonatal screening, verifying diagnostics. *Med Genet*. 2009; 8 (6): 25–33.
17. Novikov PV, Khodunova AA. The first results of extended newborn screening for hereditary metabolic diseases in the Russian Federation. *Ros Vestn Perinatol Pediat*. 2012; (5): 5–12.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ *LACTOBACILLUS SPP.* В ЭЯКУЛЯТЕД. Г. Почерников¹✉, Н. Т. Постовойтенко¹, В. В. Гетьман¹, И. С. Галкина²¹ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия² Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения, Москва, Россия

В последние годы благодаря внедрению метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) значительно расширился спектр микроорганизмов, выявляемых в мочеполовом тракте мужчин, детализировано представление о структуре бактериальных компонентов микробиома. Одной из наименее изученных групп микроорганизмов остается *Lactobacillus spp.* При ведении пациентов с репродуктивными нарушениями авторами накоплен клинический опыт, демонстрирующий возможную взаимосвязь изменения уровня половых гормонов и основных показателей спермограммы с наличием *Lactobacillus spp.* в эякуляте. Целью работы было сравнить уровни лютеинизирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, тестостерона, эстрадиола, пролактина, прогестерона, а также глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ), в сыворотке крови и изменения показателей спермограммы у 210 мужчин при выявлении в эякуляте *Lactobacillus spp.* и при их отсутствии. В основную группу были включены 105 мужчин, в эякуляте которых по данным ПЦР-РВ выявлены *Lactobacillus spp.* в количестве (Lg) $\geq 10^3$. Контрольная группа включала 105 мужчин, у которых отсутствовали *Lactobacillus spp.* и структура бактериального компонента микробиома эякулята соответствовала норме. В основной группе по сравнению с контрольной у мужчин чаще встречались гормональные нарушения: отклонение от нормы уровней трех и более гормонов ($p = 0,04$), гиперэстрадиолия ($p = 0,05$) и повышение уровня ГСПГ ($p = 0,01$). Установлено, что наличие *Lactobacillus spp.* в эякуляте мужчин основной группы ассоциировано с олигоастенотератозоосpermией ($p < 0,01$), со снижением концентрации сперматозоидов ($p = 0,01$), с ухудшением их подвижности ($p < 0,01$) и нарушением морфологии ($p < 0,01$). Таким образом, присутствие в эякуляте *Lactobacillus spp.* может служить дополнительным маркером нарушения гормонального фона и фертильности у мужчин.

Ключевые слова: *Lactobacillus spp.*, лактобактерии, эякулят, мужское бесплодие, микрофлора эякулята, «Андрофлор», патоспермия, олигоастенотератозоосpermия, гиперэстрадиолия, гиперпрогестеронемия

Вклад авторов: Д. Г. Почерников — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация и анализ данных, подготовка черновика рукописи, подготовка финального варианта статьи; Н. Т. Постовойтенко — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи, подготовка финального варианта статьи; В. В. Гетьман — сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; И. С. Галкина — планирование исследования, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи, подготовка финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: работа одобрена этическим комитетом Ивановской государственной медицинской академии и является фрагментом начатого ранее исследования (протокол № 5 от 03 июня 2009 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Денис Геннадьевич Почерников
Шереметевский проспект, д. 8, г. Иваново, 153012; urologknn@mail.ru

Статья получена: 29.05.2020 Статья принята к печати: 17.06.2020 Опубликовано онлайн: 29.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.039

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF *LACTOBACILLUS SPP.* IDENTIFICATION IN EJACULATEPochernikov DG¹✉, Postovoytenko NT¹, Getman VV¹, Galkina IS²¹ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia² Federal Research Institute for Health Organization and Informatics, Moscow, Russia

Popularization of the real-time polymerase chain reaction method (RT-PCR), which is a trend of the recent years, allowed to significantly expand of the range of microorganisms that can be detected in the genitourinary tract of men. Moreover, the available picture of the microbiome's bacterial component structure became more detailed. *Lactobacillus spp.* remains one of the least studied groups of microorganisms. Treating patients with reproductive disorders, the authors have accumulated clinical experience demonstrating the possible relationship between presence of *Lactobacillus spp.* in the ejaculate and changes in the level of sex hormones and the key values registered with a spermogram. This study aimed to compare the levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, estradiol, prolactin, progesterone, and sex hormone binding globulin (SHBG) in blood serum and changes in spermogram values in 210 men with and without *Lactobacillus spp.* detected in their ejaculate. The treatment group included 105 men whose ejaculate had *Lactobacillus spp.* in the amount of (Lg) $\geq 10^3$, as detected by RT-PCR. The control group included 105 men whose ejaculate did not have *Lactobacillus spp.* detected; the microbiome's bacterial component structure of their ejaculate was normal. Compared to the control group, treatment group had hormonal disorders registered more often: abnormal levels of three or more hormones ($p = 0.04$), hyperestradiolemia ($p = 0.05$), increased level of SHBG ($p = 0.01$). It was established that the presence of *Lactobacillus spp.* in the ejaculate of treatment group participants is associated with oligoasthenoteratozoospermia ($p < 0.01$), decreased concentration of spermatozoa ($p = 0.01$), their decreased motility ($p < 0.01$) morphology abnormalities ($p < 0.01$). Thus, the presence of *Lactobacillus spp.* in the ejaculate can be interpreted as an additional marker of hormonal imbalance and fertility dysfunction in men.

Keywords: *Lactobacillus spp.*, lactobacilli, ejaculate, male infertility, ejaculate microflora, Androflor, pathospermia, oligoasthenoteratozoospermia, hyperestradiolemia, hyperprosterolemia

Author contribution: Pochernikov DG — research planning, literature analysis, data interpretation and analysis, manuscript drafting, preparation of the final version of the article; Postovoytenko NT — literature analysis, data collection, analysis and interpretation, manuscript drafting, preparation of the final version of the article; Getman VV — data collection, analysis and interpretation, manuscript drafting; Galkin IS — research planning, data interpretation, manuscript drafting, preparation of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ivanovo State Medical Academy ethics committee and is a part of the earlier research (protocol № 5 of June 03, 2009). All patients signed a voluntary informed consent to participate in the study.

✉ Correspondence should be addressed: Denis G. Pochernikov
Sheremetevsky prospect, 8, Ivanovo, 153012; urologknn@mail.ru

Received: 29.05.2020 Accepted: 17.06.2020 Published online: 29.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.039

В настоящее время исследователи не пришли к единому мнению, какой состав микрофлоры урогенитального тракта мужчин считать нормальным [1]. По данным клинических рекомендаций последних лет, пациентам с бесплодием или проходящим прегравидарную подготовку рекомендовано проводить только культуральный анализ эякулята [2–4]. Однако этот метод не в полной мере отражает особенности урогенитальной микробиоты мужчины, так как не позволяет идентифицировать некультивируемые микроорганизмы, например облигатно-анаэробные и некоторые факультативно-анаэробные, в том числе лактобактерии [5, 7–10]. По мнению ведущих европейских и российских урологов, с целью диагностики простатита необходимо использовать двухстаканную пробу и дополнительно исследовать эякулят не только бактериологическим методом, но и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [3, 5, 7–10]. В последние годы благодаря внедрению современных методов диагностики был значительно расширен спектр выявляемых микроорганизмов в урогенитальном тракте мужчин и женщин [1, 8, 11–13]. На наш взгляд, одним из перспективных методов является ПЦР-РВ с применением теста «Андрофлор» у мужчин, позволяющий не только качественно, но и количественно оценить все основные группы бактерий микробиоты эякулята, включая лактобактерии [5, 7, 9, 10, 14–19].

В литературе имеются единичные публикации о встречаемости лактобактерий в различных биотопах мочеполового тракта мужчин. По данным ряда авторов [16, 19, 20], *Lactobacillus spp.* — одни из часто встречающихся микроорганизмов как у здоровых мужчин, так и у пациентов с уретритом или простатитом, идентифицируемые бактериологическим методом [21], секвенированием 16S rRNA [6, 20] и ПЦР-РВ [5, 8, 14, 16, 19]. Так, *Lactobacillus spp.* были обнаружены в 9–73,3% случаев в микробиоте эякулята у мужчин с бесплодием или проходивших обследование с целью прегравидарной подготовки [5, 6, 8, 16]. Представляет большой интерес исследование, в котором была выявлена статистически значимая корреляция между наличием лактобактерий в уретре и гормональных дисрапторов в семенной жидкости у мужчин с бесплодием [19].

Имеются работы, указывающие на связь между присутствием в эякуляте лактобактерий и нормальными показателями спермограммы. Так, показано увеличение относительного содержания *Lactobacillus spp.* в образцах спермы с нормальной морфологией сперматозоидов [22]. Обнаружена положительная корреляционная связь между присутствием лактобактерий в сперме и нормальными показателями спермограммы у мужчин [23].

Наименее изучены на сегодняшний день *Lactobacillus spp.*, выявленные у мужчин, которые соблюдают правила взятия биоматериала, а именно половое воздержание или барьерную контрацепцию, с целью снижения риска попадания лактобактерий из влагалища. По мнению ряда авторов, *Lactobacillus spp.* в большинстве случаев — транзитная микрофлора мочеполового тракта у мужчин [7, 10, 14, 17]. Лактобактерии могут играть роль вероятного микробного агента, способствующего возникновению и поддержанию хронического воспаления в предстательной железе [24]. В последние годы все чаще обсуждают роль гормональных изменений, в частности, влияние уровня тестостерона на бактериальную обсемененность секрета предстательной железы [25, 26]. Но при анализе доступной нам литературы мы не обнаружили данных о взаимосвязи основных репродуктивно значимых гормонов — эстрадиола, пролактина, прогестерона, а также ГСПГ, традиционно входящих в алгоритм обследования мужчин с репродуктивными нарушениями [2–4], с инфекционными агентами, выявленными в секрете простаты или эякуляте.

По результатам проведенного пилотного исследования, нами получен патент на изобретение [27]. Суть открытия заключается в том, что присутствие в эякуляте *Lactobacillus spp.* в титре (lg) $\geq 10^3$ может служить дополнительным маркером гормональных нарушений и основанием для дальнейшего расширенного обследования мужчины. В связи с высокой встречаемостью лактобактерий и отсутствием данных о их влиянии у мужчин на фертильные свойства спермы, тема данного исследования чрезвычайно актуальна. Целью работы было провести сравнительный анализ изменения уровней ЛГ, ФСГ, тестостерона, эстрадиола, пролактина, прогестерона, ГСПГ в сыворотке крови и основных показателей спермограммы у мужчин при выявлении в эякуляте *Lactobacillus spp.* и при их отсутствии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено сравнительное проспективное исследование 210 мужчин с ноября 2016 по июль 2019 г., обратившихся в урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии по поводу бесплодия, проходящих прегравидарную подготовку, и/или с сопутствующей эректильной дисфункцией. Критерии включения пациентов в исследование: мужчины репродуктивного возраста; наличие бесплодия или проведение прегравидарной подготовки; все обследуемые пациенты в течение последних четырех недель не должны были получать гормональные и антибактериальные препараты, а также какие-либо другие лекарственные средства. Критерии исключения из исследования: наличие гипогонадотропного и

Таблица 1. Уровень исследуемых гормонов в двух сравниваемых группах

Гормон в сыворотке крови	Референсные значения	Группа мужчин с <i>Lactobacillus spp.</i> (n = 105), среднее значение \pm станд. откл.	Группа мужчин без лактобактерий (n = 105), среднее значение \pm станд. откл.	p
ЛГ, мМЕ/мл	1–12	5,1 \pm 2,1	4,4 \pm 2,0	0,09
ФСГ, мМЕ/мл	0,9–12	5,2 \pm 2,5	4,5 \pm 2,7	0,1
Пролактин, нг/мл	4–15	14,1 \pm 7,8	12,8 \pm 5,9	0,3
Прогестерон, нг/мл	0,05–0,15	0,23 \pm 0,14	0,25 \pm 0,17	0,3
Эстрадиол, пг/мл	11–43	26,5 \pm 13,5	23,4 \pm 9,9	0,04
Тестостерон, нг/мл	3,5–9	5,3 \pm 2,6	5,1 \pm 2,5	0,2
ГСПГ, нмоль/л	18–54	41,1 \pm 23,2	35,8 \pm 20,7	0,08
ИСА, %	15–102	51,6 \pm 23,3	51,3 \pm 27,6	0,5
ТЭИ	Не менее 83	232,8 \pm 134,4	252 \pm 157,1	0,2

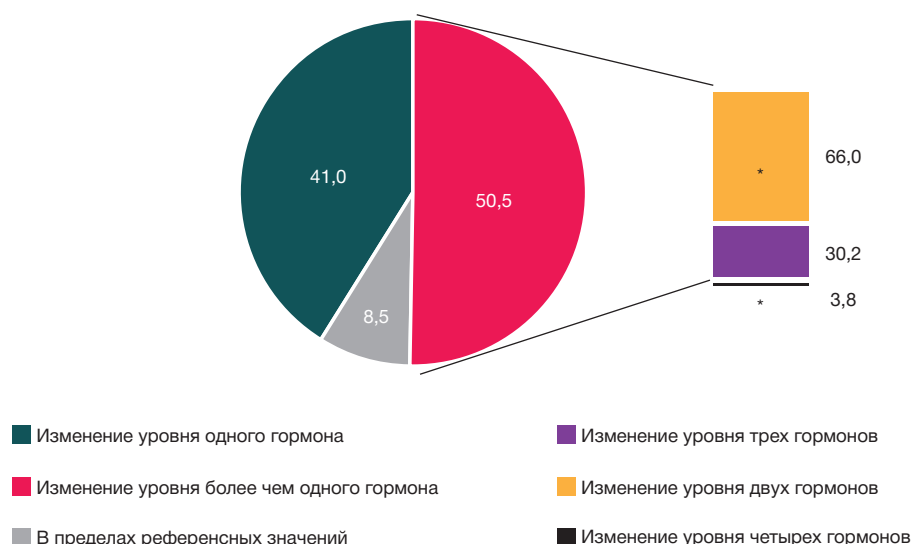


Рис. 1. Гормональные изменения в группе мужчин с *Lactobacillus spp.*, $n = 105$

гипергонадотропного гипогонадизма, сахарного диабета, гипо- и гипертиреоза; наличие инфекций, передающихся половым путем, и клинических проявлений простатита, таких как боль и дизурия; наличие аномалий кариотипа, мутации в гене CFTR, микроделеций в AZF-локусе Y-хромосомы.

Всем мужчинам проводили исследование эякулята методом ПЦР-РВ с использованием теста «Андрофлор», а также определяли в сыворотке венозной крови уровни лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), общего тестостерона, эстрадиола, пролактина, прогестерона и глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ), индекса свободных андрогенов (ИСА), тестостеронэстрадиолового индекса (ТЭИ), которые общеприняты к назначению при обследовании мужчин, страдающих бесплодием или проходящих прегравидарную подготовку [2, 3]. Забор крови на исследование концентрации гормонов проводили с 8 до 10 ч утра натощак, также необходимым условием было половое воздержание в течение суток.

Все мужчины были разделены на две группы, рандомизированные по возрасту, индексу массы тела, приему алкоголя и табакокурению, предъявляемым жалобам, установленному диагнозу и уровню

сывороточного тестостерона, с целью исключения влияния последнего на обсемененность эякулята [25, 26]. В основную группу вошли 105 пациентов, у которых по результатам ПЦР-РВ эякулята обнаружены *Lactobacillus spp.* в титре (Lg) $\geq 10^3$. Контрольную группу составили 105 мужчин, у которых отсутствовали *Lactobacillus spp.* и структура бактериальной составляющей микробиоты эякулята соответствовала норме по заключению теста «Андрофлор». Средний возраст пациентов первой группы составил $35,5 \pm 8,1$ лет, второй — $35,8 \pm 8,3$ ($p > 0,05$). Перед забором биоматериала пациенты предварительно помочились, проводили тщательный туалет наружных половых органов без применения антисептиков и собирали эякулят методом мастурбации в стерильный контейнер из полимерного материала. Контейнеры доставляли в лабораторию в течение не более одного часа с момента взятия.

Для выполнения ПЦР-РВ использовали детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология»; Россия) [28] и наборы реагентов «Андрофлор» (регистрационное удостоверение на медицинское изделие РЗН 2016/4490 от 25.07.2016). Для исследования уровня гормонов с 8 до 10 ч утра в асептических условиях производили взятие венозной крови в пробирки объемом 5 мл.

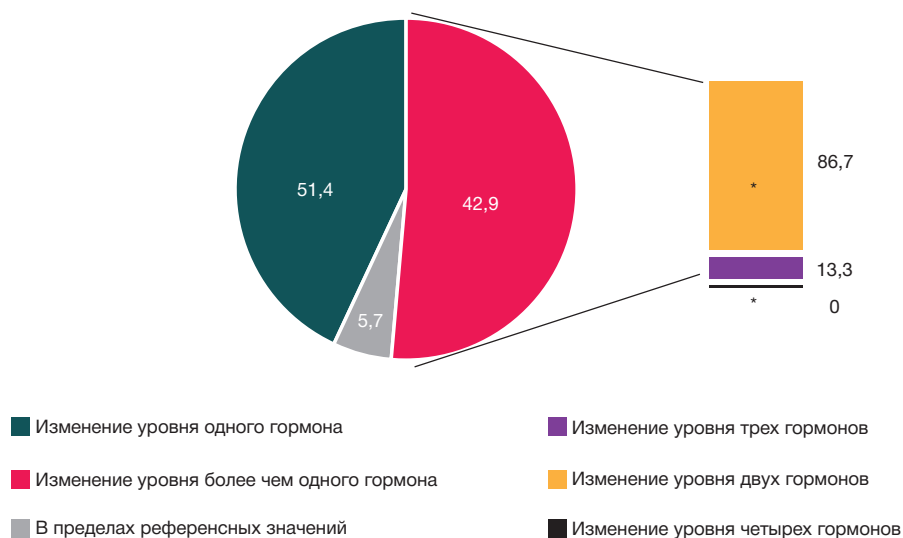


Рис. 2. Гормональные изменения в группе мужчин без лактобактерий, $n = 105$

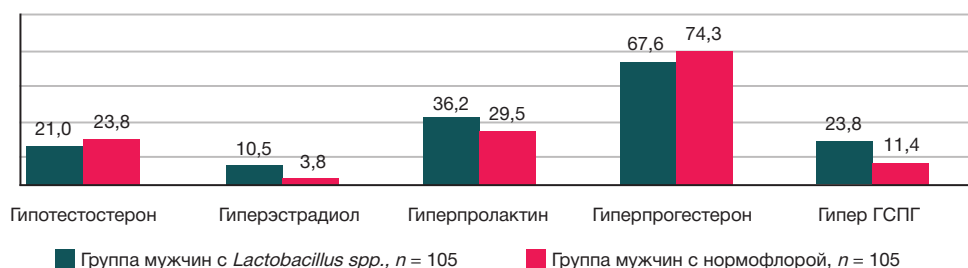


Рис. 3. Изменения исследуемых гормонов в сравниваемых группах

После свертывания жидкую часть переносили в чистые стерильные пробирки, центрифугировали на лабораторной центрифуге 10 мин при 1500 об./мин, затем надосадочную жидкость переносили в одноразовые пластиковые пробирки типа Эппендорф. Уровень гормонов определяли с помощью аналитической системы Roche Cobas e8000 602, (Roche Diagnostics; Швейцария). Референсные значения исследуемых гормонов представлены в табл. 1. Исследование эякулята выполняли с использованием анализатора SQA-V (Medical Electronic System Ltd.; Израиль). Количество лейкоцитов в сперме определяли путем приготовления и окрашивания мазков с использованием красителей Leukodif 200 (Erba Lachema; Чехия), при исследовании оценивали количественные и качественные показатели по нормам WHO (2010 г.) [29]. Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 и Statistica 12.0 (Stat Soft Inc.; США). Достоверность полученных данных анализировали с помощью критериев Уилкоксона и Фишера, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе пациентов с *Lactobacillus* spp. уровни всех исследуемых гормонов соответствовали референсным значениям у 9 (8,5%) мужчин, в контрольной группе — у 6 (5,7%) ($p > 0,05$). Комбинированные гормональные нарушения у мужчин в основной группе встречались чаще (50,5% против 42,9%; $p > 0,05$), чем в группе без лактобактерий (рис. 1 и 2 соответственно), при этом

статистически значимо чаще у мужчин с лактобактериями отмечались более выраженные гормональные нарушения в виде отклонений от нормы уровней трех и более гормонов ($p = 0,04$).

В табл. 1 представлены средние значения уровней гормонов в двух исследуемых группах. Группа мужчин с *Lactobacillus* spp. статистически значимо по сравнению с контрольной отличалась по среднему уровню эстрадиола, у них выявлена также тенденция к повышению уровней пролактина и ГСПГ. Статистически значимо чаще в основной группе встречались гиперэстрадиолемия (10,5% против 3,8%; $p = 0,05$) и повышение уровня ГСПГ (23,8% против 11,4%; $p = 0,01$). По остальным исследуемым гормонам статистически значимых различий выявлено не было, но наблюдалась тенденция к более частой встречаемости гиперпролактинемии в группе с лактобактериями (рис. 3).

Обсемененность эякулята, определяемая как общая бактериальная масса (ОБМ), была выше в группе мужчин с *Lactobacillus* spp., по сравнению с контрольной группой ($10^{4,5 \pm 0,6}$ против $10^{4,2 \pm 0,9}$ соответственно, $p < 0,01$).

По результатам ПЦР-РВ (рис. 4), в основной группе достоверно чаще, чем в группе без лактобактерий, обнаруживали большинство идентифицируемых микроорганизмов ($p < 0,05$).

По результатам спермиологического исследования (рис. 5), в основной группе более выражены нарушения в виде олигоастенотератозооспермии (30,0% против 9,3%; $p < 0,01$) и астенотератозооспермии (28,8% против 20,0%; $p = 0,1$). В контрольной группе достоверно чаще выявляли нормозооспермию (42,7% против 25,0%; $p = 0,01$).

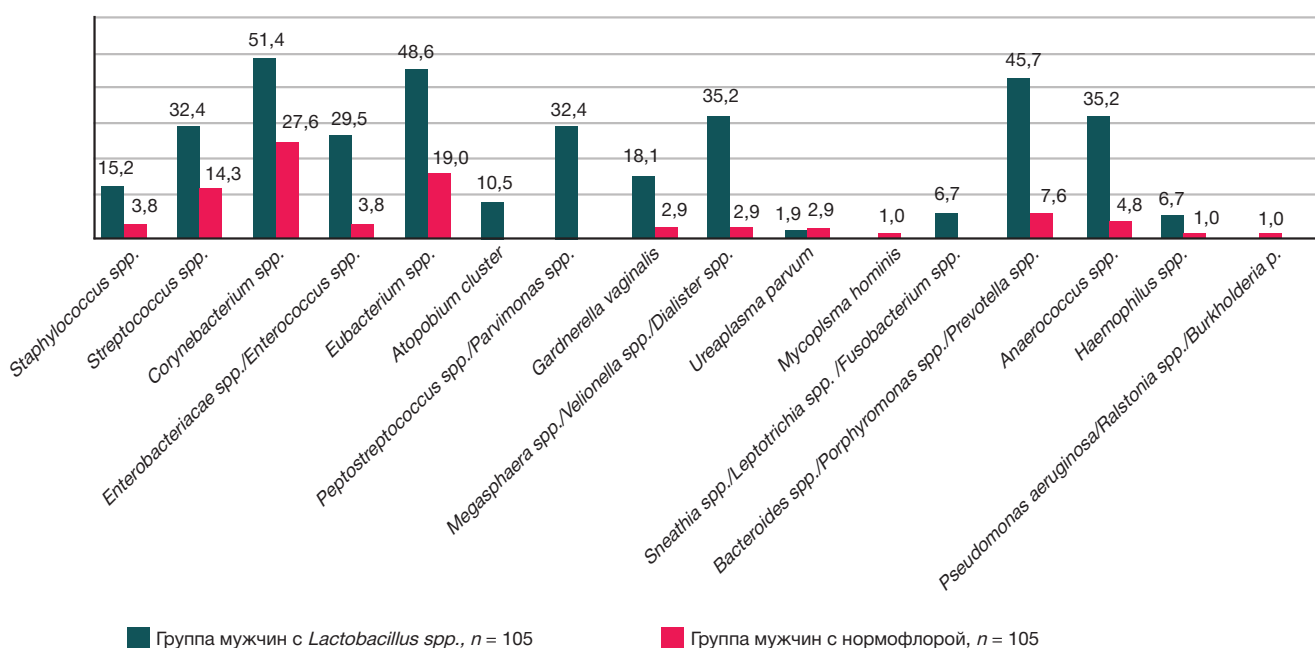


Рис. 4. Частота встречаемости микроорганизмов в эякуляте по данным ПЦР-РВ в двух сравниваемых группах

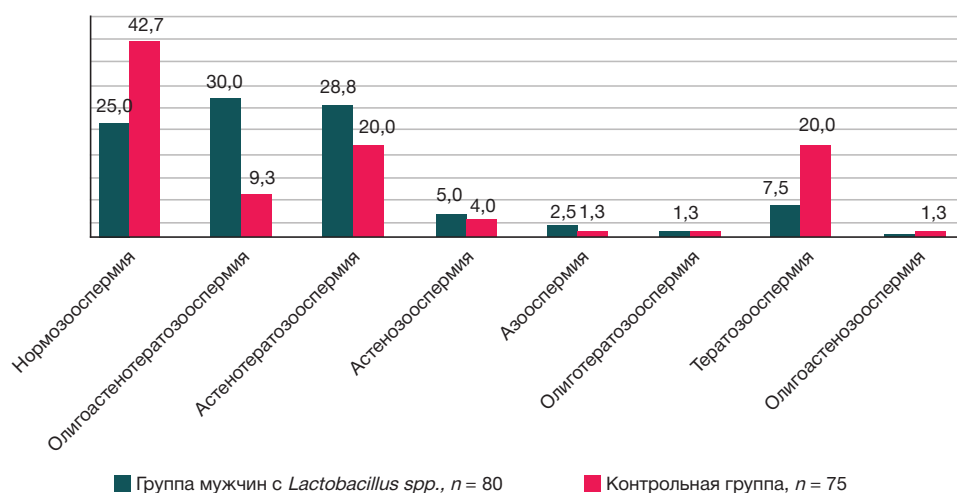


Рис. 5. Изменения в параметрах спермограммы в двух сравниваемых группах

и изолированную тератозооспермию (20,0% против 7,5%; $p = 0,01$), а также в два раза чаще встречалась бессимптомная лейкоспермия (26,7% против 13,8%; $p = 0,03$). При анализе основных показателей спермограммы (табл. 2) у мужчин с лактобактериями концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов были статистически значимо хуже по сравнению с мужчинами контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Есть мнение, что лактобактерии у мужчин могут присутствовать только как транзитная флора. Однако в клинической практике встречаются пациенты с *Lactobacillus* spp. в эякуляте, у которых период полового воздержания составлял более одного месяца или они всегда использовали барьерную контрацепцию, что минимизирует транзитный характер присутствия этих бактерий. В данной работе, в отличие от первоначальных результатов пилотного исследования [27], подтвердилась гипотеза о связи гиперэстроидемии и появлении *Lactobacillus* spp. в эякуляте. Лейкоспермия встречалась в основной группе реже, чем в контрольной группе мужчин без лактобактерий, что, вероятно, связано с часто встречающимися случаями обструкции или фиброза ацинусов предстательной железы [30]. Нами выявлена большая бактериальная обсемененность эякулята у мужчин в основной группе, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), что может быть объяснено гиперэстроидемией, повышением уровня ГСПГ и пролактина, так как последние снижают биологическую активность тестостерона. Один из механизмов повышения

ГСПГ связан с повышением эстрадиола в крови и часто отражает «скрытую гиперэстроидемию», т. е. в пределах референсных значений показателей. Повышенный уровень лактобактерий можно рассматривать как защитно-компенсаторный механизм поддержания нормального микробиома эякулята, предотвращающего инвазию половых путей условно-патогенными микроорганизмами [6, 21, 23].

По нашему мнению, при условии строгого соблюдения правил подготовки к исследованию эякулята методом ПЦР-РВ, таких как половое воздержание или барьерная контрацепция не менее трех суток, выявление *Lactobacillus* spp. в титре $Lg \geq 10^3$ может быть дополнительным поводом к определению уровня эстрадиола, пролактина, прогестерона и ГСПГ.

Анализ полученных данных не позволяет провести корректную оценку негативной или позитивной роли лактобактерий в эякуляте и может стать задачей дальнейших исследований, при проведении которых с использованием технологии ПЦР-РВ можно будет установить количество *Lactobacillus* spp. и провести типирование данной группы микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

Таким образом, *Lactobacillus* spp. чаще встречаются в эякуляте у мужчин с гиперэстроидемией и более тяжелыми сочетанными нарушениями в спермограмме. Обнаружение *Lactobacillus* spp. в сперме может служить дополнительным маркером нарушения гормонального фона у мужчины, даже при нормальных показателях спермограммы.

Таблица 2. Исследуемые показатели спермограммы в двух сравниваемых группах

Показатель спермограммы	Группа мужчин с <i>Lactobacillus</i> spp. (n = 80), среднее значение \pm станд. откл.	Группа мужчин без лактобактерий (n = 75), среднее значение \pm станд. откл.	p
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	52,6 \pm 44,8	70,1 \pm 48,2	0,03
Общее кол-во сперматозоидов в эякуляте, млн	167,1 \pm 167,3	221,6 \pm 169,4	0,01
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды (PR), %	25,4 \pm 23,7	40,4 \pm 23,7	< 0,01
Непрогрессивно-подвижные сперматозоиды, (NP), %	11,3 \pm 9,4	12,3 \pm 9,7	0,2
Неподвижные сперматозоиды, (IM), %	61,2 \pm 27,8	46,8 \pm 23,5	< 0,01
Нормальные формы, %	2,4 \pm 2,1	3,6 \pm 2,7	< 0,01

Литература

1. Чаплин А. В., Ребриков Д. В., Болдырева М. Н. Микробиом человека. Вестник РГМУ. 2017; (2): 5–13. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-01.
2. Jungwirth JA, Diemer T, Kopa Z, et al. EAU guidelines on male infertility © European Association of Urology. Available from: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf> (Accessed May 2, 2019).
3. Щеплева П. А., редактор. Андрология для урологов. М.: Медфорум-Альфа, 2019; 424 с.
4. Аляев Ю. Г., Глыбочко П. В., Пушкарь Д. Ю., редакторы. Урология: Российские клинические рекомендации. М.: Медфорум, 2018; 544 с.
5. Почерников Д. Г., Витвицкая Ю. Г., Болдырева М. Н., Галкина И. С. Информативность биоматериала для исследования микробиоты урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-ПВ (пилотное исследование). Экспериментальная и клиническая урология. 2019; 2: 128–32. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132.
6. Monteiro C, Marques PI, Cavadas B, et al. Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria. Am J Reprod Immunol. 2018; 79 (6): e12838. DOI: 10.1111/aji.12838.
7. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Паначева Е. А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. Вестник РГМУ. 2019; 1: 44–9. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.009.
8. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. Reprod Biol Endocrinol. 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
9. Рахматулина М. Р., Галкина И. С. Диагностика инфекционной урогенитальной патологии методом количественной ПЦР. Вестник РГМУ. 2019; 6: 114–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.088.
10. Боровец С. Ю. Диагностическая значимость исследования микрофлоры эякулята у больных хроническим бактериальным простатитом методом PCR-RT «Андрофлор». В сборнике: Материалы 5-й научно-практической конференции урологов Северо-Западного федерального округа РФ; Санкт-Петербург, 2019. Урологические ведомости. 2019; 9: 22–23.
11. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. Fertil Steril. 2013 Nov; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
12. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. High Throughput. 2020 Apr 13; 9 (2): pii E10. DOI: 10.3390/ht9020010.
13. Altmäe S, Fransasiak JM, Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. Nat Rev Urol. 2019 Dec; 16 (12): 703–21. DOI:10.1038/s41585-019-0250-y.
14. Рахматулина М. Р., Болдырева М. Н., Липова Е. В., Чекарчев А. С., Галкина И. С.. Оценка микробиоты соскоба уретры у мужчин с инфекциями, передаваемыми половым путем. Урология. 2019; 6: 31–37.
15. Липова Е. В., Чекарчев А. С., Болдырева М. Н. Новый метод диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний нижних отделов мочеполового тракта у мужчин (тест «Андрофлор», «Андрофлор®Скрин»). М., 2017; 48 с.
16. Почерников Д. Г., Галкина И. С., Постовойтенко Н. Т., Герасимов А. М. Сравнительный анализ биотопа эякулята и цервикального канала методом ПЦР-ПВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» в супружеских парах. Вестник РГМУ. 2017; 2: 37–41. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-05.
17. Баранова Е. Е., Батенева Е. И., Галкина И. С., Донников А. Е., Зорина В. В., Тумбинская Л. В. и др. ПЦР в реальном времени: новые возможности технологии в решении репродуктивных проблем: учебное пособие. М.: ДНК-Технология, 2013; 63 с.
18. Тапильская Н. И., Шахова М. А. Прегравидарная подготовка супружеской пары с участием обоих партнеров при частых рецидивах бактериального вагиноза. Лечащий врач. 2018; 2: 82–87.
19. Чигринцев С. В., Брюхин Г. В. Связь микробиоты уретры с качеством эякулята и содержанием эндокринных дисрапторов в семенной жидкости у мужчин. Андрология и генитальная хирургия. 2018; 19 (4): 60–66. DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-4-60-66.
20. Frølund M, Wikström A, Lidbrink P, Abu Al-Soud W, Larsen N, Harder CB, et al. The bacterial microbiota in first-void urine from men with and without idiopathic urethritis. PLoS ONE 2018; 13 (7): e0201380. DOI: 10.1371/journal.pone.0201380.
21. Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. Int J Androl. 2009; 32 (5): 462–7. DOI:10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
22. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. Front Microbiol. 2019 Feb 12; 10: 234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
23. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. PLoS One. 2014 Oct 23; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
24. Nickel JC. Chronic prostatitis: an infectious disease? Infect Urol. 2000; 13 (2): 31–8.
25. Kogan MI, Ibishev KS, Cherny AA, Naboka YL, Krakhotkin DV, Krainiy PA, et al. 244 Analysis of microbiome prostatic secretion in depending of levels total testosterone in blood serum. The Journal of Sexual Medicine. 2018; 15 (7, Suppl 3): 219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.04.209>.
26. Ho C-H, Fan C-K, Yu H-J, Wu C-C, Chen K-C, Liu S-P, et al. Testosterone suppresses uropathogenic Escherichia coli invasion and colonization within prostate cells and inhibits inflammatory responses through JAK/STAT-1 signaling pathway. PLoS One. 2017 Jun 30; 12 (6): e0180244. DOI:10.1371/journal.pone.0180244.
27. Почерников Д. Г., Постовойтенко Н. Т., Галкина И. С., авторы. Способ диагностики нарушений гормонального фона у мужчин. Патент РФ № 2715565. 02.03.2020. Бюл. № 7.
28. Инструкция по применению набора реагентов для исследования микрофлоры урогенитального тракта мужчин методом ПЦР в режиме реального времени Андрофлор® (ООО НПО «ДНК-Технология»). Регистрационное удостоверение № РЗН 20164490. Доступно по ссылке: <http://www.dna-technology.ru/information/aboutmethod/>.
29. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva, 2010; 271 p.
30. Цуканов А. Ю., Сатыбалдин Д. О., Семикина С. П. Повышение результативности микробиологического исследования эякулята при диагностике причин мужского бесплодия. Урология. 2019; 6: 26–30. Доступно по ссылке: <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2019.6.26-30>.

References

1. Chaplin AV, Rebrikov DV, Boldyreva MN. The human microbiome. Bulletin of RSMU. 2017; (2): 5–13. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-01.
2. Jungwirth JA, Diemer T, Kopa Z, et al. EAU guidelines on male infertility © European Association of Urology. Available from: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf> (Accessed May 2, 2019).
3. Shhepleva PA, редактор. Андрология для урологов. М.: Medforum-Al'fa, 2019; 424 s. Russia.
4. Aljaev YuG, Glybochko PV, Pushkar DYU, редакторы. Урология: Российские клинические рекомендации. М.: Medforum, 2018; 544 s. Russia.
5. Pochernnikov DG, Vitvickaja YuG, Boldyreva MN, Galkina IS.

- Informativnost' biomateriala dlja issledovanija mikrobioty urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR-RV (pilotnoe issledovanie). Jekspierimental'naja i klinicheskaja urologija. 2019; 2: 128–32. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132. Russia.
6. Monteiro C, Marques PI, Cavadas B, et al. Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoatozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 79 (6): e12838. DOI: 10.1111/aji.12838.
 7. Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time PCR and culture-based technique. *Bulletin of RSMU*. 2019; 1: 41–6. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.009.
 8. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
 9. Rakhmatulina MR, Galkina IS. Quantitative PCR in diagnosing infectious urogenital pathology. *Bulletin of RSMU*. 2019; 6: 107–10. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.088.
 10. Borovec SYu. Diagnosticheskaja znachimost' issledovanija mikroflory jejakuljaty u bol'nyh hronicheskim bakterial'nym prostatitom metodom PCR-RT «Androflor». V sbornike: Materialy 5-j nauchno-prakticheskoy konferencii urologov Severo-Zapadnogo federal'nogo okruga RF; Sankt-Peterburg, 2019. *Urologicheskie vedomosti*. 2019; 9: 22–23. Russia.
 11. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013 Nov; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
 12. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput*. 2020 Apr 13; 9 (2): pii E10. DOI: 10.3390/ht9020010.
 13. Altmäe S, Fransiaki JM, Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nat Rev Urol*. 2019 Dec; 16 (12): 703–21. DOI:10.1038/s41585-019-0250-y.
 14. Rakhmatulina MR, Boldyreva MN, Lipova EV, Chekmarev AS, Galkina IS. Ocenka mikrobioty soksoba uretry u muzhchin s infekcijami, peredavaemymi polovym putem. *Urologija*. 2019; 6: 31–37. Russia.
 15. Lipova EV, Chekmarev AS, Boldyreva MN. Novyj metod diagnostiki infekcionno-vospalitel'nyh zabolevanij nizhnih otdelov mohepolovogo trakta u muzhchin (test Androflor®, Androflor®Skrin). M., 2017; 48 s. Russia.
 16. Pochernikov DG, Galkina IS, Postovoytenko NT, Gerasimov AM. A comparative analysis of seminal and vaginal microbiota of married couples by real-time PCR with Androflor and Femoflor reagent kits. *Bulletin of RSMU*. 2017; 2: 34–39. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-05.
 17. Baranova EE, Bateneva EI, Galkina IS, Donnikov AE, Zorina VV, Tumbinskaja LV, i dr. PCR v real'nom vremeni: novye vozmozhnosti tehnologii v reshenii reproduktivnyh problem: uchebnoe posobie. M.: DNK-Tehnologija, 2013; 63 s. Russia.
 18. Tapilskaja NI, Shahova MA. Pregravidarnaja podgotovka supruzheskoj pary s uchastiem oboih partnerov pri chastykh recidivah bakterial'nogo vaginoza. *Lechashhij vrach*. 2018; 2: 82–87. Russia.
 19. Chigrinec SV, Brjuhin GV. Svjaz' mikrobioty uretry s kachestvom jejakuljaty i sodержaniem jendokrinnyh disraptorov v semennoj zhidkosti u muzhchin. *Andrologija i genital'naja hirurgija*. 2018; 19 (4): 60–66. DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-4-60-66. Russia.
 20. Frølund M, Wikstrøm A, Lidbrink P, Abu Al-Soud W, Larsen N, Harder CB, et al. The bacterial microbiota in first-void urine from men with and without idiopathic urethritis. *PLoS ONE* 2018; 13 (7): e0201380. DOI: 10.1371/journal.pone.0201380.
 21. Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl*. 2009; 32 (5): 462–7. DOI:10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
 22. Baud D, Pattaroni C, Vullemoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol*. 2019 Feb 12; 10: 234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
 23. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014 Oct 23; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
 24. Nickel JC. Chronic prostatitis: an infectious disease? *Infect Urol*. 2000; 13 (2): 31–8.
 25. Kogan MI, Ibishev KS, Cherny AA, Naboka YL, Krakhotkin DV, Krainiy PA, et al. 244 Analysis of microbiome prostatic secretion in depending of levels total testosterone in blood serum. *The Journal of Sexual Medicine*. 2018; 15 (7, Suppl 3): 219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.04.209>.
 26. Ho C-H, Fan C-K, Yu H-J, Wu C-C, Chen K-C, Liu S-P, et al. Testosterone suppresses uropathogenic *Escherichia coli* invasion and colonization within prostate cells and inhibits inflammatory responses through JAK/STAT-1 signaling pathway. *PLoS One*. 2017 Jun 30; 12 (6): e0180244. DOI:10.1371/journal.pone.0180244.
 27. Pochernikov DG, Postovoytenko NT, Galkina IS, avtory. Sposob diagnostiki narushenij gormonal'nogo fona u muzhchin. Patent RF # 2715565. 02.03.2020. *Bjul.* # 7. Russia.
 28. Instrukcija po primeneniju nabora reagentov dlja issledovanija mikroflory urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR v rezhime real'nogo vremeni Androflor® (OOO NPO «DNK-Tehnologija»). Registracionnoe udostoverenie # RZN 20164490. Available from: <http://www.dna-technology.ru/information/aboutamethod/>. Russia.
 29. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva, 2010. 271 p.
 30. Cukanov AYu, Satybaldin DO, Semikina SP. Povyshenie rezul'tativnosti mikrobiologicheskogo issledovanija jejakuljaty pri diagnostike prichin muzhskogo besplodija. *Urologija*. 2019; 6: 26–30. Available from: <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2019.6.26-30>. Russia.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ДОФА-ЗАВИСИМОЙ ДИСТОНИИ У МОЛОДОЙ ЖЕНЩИНЫ

Н. А. Бельх² ✉, М. А. Ахьямова², В. В. Гусев^{1,2,3}, О. А. Львова^{2,3}¹ Центральная городская клиническая больница № 23, Екатеринбург, Россия² Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

ДОФА-зависимая дистония (ДЗД) — это редкое прогрессирующее генетически гетерогенное заболевание с манифестированием в детском возрасте, в три раза чаще встречающееся у женщин. В статье описан клинический случай синдрома Сегавы у молодой женщины с нижним парапарезом, дистонией стоп (больше справа), нарушением функции ходьбы, поступившей в неотложном порядке в неврологическое отделение с жалобами на выраженное ограничение ходьбы и самообслуживания. В результате дообследования, включающего в себя тест с Леводопой и прямое автоматическое секвенирование по Сенгеру, у пациентки была диагностирована ДЗД. Проведено лечение Леводопой, в ходе которого у пациентки регрессировали клинические симптомы дистонии. В статье представлены особенности течения заболевания и дифференциальной диагностики, а также генетическая детерминированность и тактика лечения.

Ключевые слова: ДОФА-зависимая дистония, синдром Сегавы, наследственная дистония

Вклад авторов: Н. А. Бельх — сбор материала по заболеванию, дифференциальная диагностика, участие в постановке окончательного диагноза, наблюдение пациента в течение трех лет; М. А. Ахьямова — осмотр пациента, сбор анамнеза заболевания, участие в диагностике, наблюдение пациента в течение трех лет, редактирование рукописи; В. В. Гусев — наблюдение пациента в течение трех лет, назначение диагностических методов исследования, подбор и контроль лечения, предоставление истории болезни пациента для написания статьи, организация этического комитета; О. А. Львова — рекомендации по генетическому исследованию, интерпретация результатов, генетическое консультирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 1451/19 от 20 сентября 2019 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациента в научном исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Никита Алексеевич Бельх
ул. Репина, 3, г. Екатеринбург, 620014; nikitabelikh@gmail.com

Статья получена: 14.05.2020 **Статья принята к печати:** 28.05.2020 **Опубликована онлайн:** 04.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.031

A CASE REPORT OF DOPA-RESPONSIVE DYSTONIA IN A YOUNG WOMAN

Belykh NA² ✉, Akhkyamova MA², Gusev VV^{1,2,3}, Lvova OA^{2,3}¹ Central Clinical Hospital № 23, Yekaterinburg, Russia² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia³ Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Dopa-responsive dystonia (DRD) is a rare progressive genetically heterogeneous disorder with pediatric onset. DRD is 3 times as prevalent in women than in men. This article reports a clinical case of DRD in a young female presenting with paraparesis, foot dystonia (more pronounced in the right foot) and pronounced walking impairment, who was admitted for emergency treatment to a Neurology Unit. Based on the additional tests, which included a levodopa trial and Sanger sequencing, the patient was diagnosed with DRD. Levodopa caused a considerable improvement of the symptoms. The article describes the clinical features of the disease, talks about its differential diagnosis, genetic predisposition and treatment strategy.

Keywords: DOPA-responsive dystonia, Segawa syndrome, hereditary dystonia

Author contribution: Belykh NA analyzed the literature, made the differential diagnosis, participated in establishing the definitive diagnoses followed the patient up for 3 years. Akhkyamova MA examined the patient, collected her medical history, participated in establishing the diagnosis, followed the patient up for 3 years, wrote the manuscript. Gusev VV followed the patient up; ordered diagnostic tests, prescribed treatment and monitored its course; provided the patient's medical history; helped with the application to the Ethics Committee. Lvova OA advised the patient on the genetic test and interpreted its results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol № 1451/19 dated September 20, 2019). The patient gave informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikita A. Belykh
Repina, 3, Yekaterinburg, 620014; nikitabelikh@gmail.com

Received: 14.05.2020 **Accepted:** 28.05.2020 **Published online:** 04.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.031

ДОФА-зависимая дистония (ДЗД) — одна из форм торзионной дистонии, которую впервые описал японский невролог Сегавы в 1971 г. как наследственную прогрессирующую дистонию с выраженными дневными колебаниями симптоматики [1].

В большинстве случаев дистония начинается с одной ноги в первые 9–10 лет жизни и распространяется на все четыре конечности к концу второго десятилетия [2]. Чаще всего первым симптомом ДОФА-зависимой дистонии является нарушение походки, нередко расцениваемое врачами как детский церебральный паралич [3]. На ранних стадиях симптомы заболевания отсутствуют в утренние

часы, но характерны вечерние обострения, которые больше зависят от количества часов бодрствования, чем от физической активности. По мере прогрессирования дистонии симптомы возникают как в утренние, так и в вечерние часы [4].

Различают два типа заболевания: классическую постуральную дистонию (нарушение тонуса мышц во время поддержания позы) и фазическую дистонию (сочетание дистонии при движениях и постуральной дистонии). Описаны также отдельные клинические случаи изолированного тремора рук, постоянной деформации стоп по типу косолапости и дистоний в отдельных мышцах [5].

Основным диагностическим тестом при подозрении на ДЗД является назначение препарата Леводопы, после которого происходит видимое улучшение состояния пациента.

Рекомендуемая начальная доза Леводопы составляет 1 мг/кг/день. Ее следует постепенно увеличивать до полного улучшения или до появления побочных эффектов. У большинства пациентов улучшение состояния наступает при дозе 4–5 мг/кг/день. Леводопу следует давать в течение трех месяцев, прежде чем считать испытание неудачным [6].

Для того чтобы отличить ДЗД от других состояний, при которых применение Леводопы оказывает положительный эффект, проводят измерение концентрации птеринов в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). При положительном тесте с Леводопой и повышении концентрации птеринов в ЦСЖ высока вероятность наличия ДЗД [7]. Диагноз подтверждают с помощью молекулярно-генетического тестирования на наличие мутаций в гене *GCH1* [8].

Описание клинического случая

Пациентка с ДЗД проходила обследование и лечение в неврологическом отделении Центральной городской клинической больницы № 23 г. Екатеринбурга с 2015 по 2017 г. Диагноз поставлен по выявленному варианту нуклеотидной последовательности с.248g>a (p.Gly83Asp) в гетерозиготном состоянии методом ПЦР.

Женщина 1982 г. рождения. Из анамнеза: первые симптомы заметили родственники в возрасте 12 лет. «Слабость» в ногах, нарушение походки, усталость мышц ног, нарастающая при ходьбе, «проворачивание правой коленки» и судорожное «подгибание» пальцев стоп при ходьбе, эмоциональное напряжение. Со слов пациентки, иногда возникала слабость в кистях. Ребенка стали регулярно наблюдать и лечить у невролога, Предположительные диагнозы: болезнь Штрюмпеля, парапарез, параплегия. Назначенное лечение (Баклофен, Нейромультивит, Сирдалуд, парафин, массаж, ЛФК) не оказывало эффекта, состояние ухудшалось. На фоне медикаментозной терапии пациентка стала отмечать выраженную слабость, «потеряла контроль над ногами», самостоятельно отменила Баклофен и Сирдалуд, перестала посещать уроки физической культуры, так как не могла выполнять нормативы (особенно любые прыжки от пола).

Анамнез жизни: росла и развивалась по возрасту, семья полная. В 3 года перенесла ветряную оспу. Образование

высшее, экономист, в настоящее время не работает. Наследственность неотягощена, вредных привычек нет. В 2010 г. пациентке проведено родоразрешение путем кесарева сечения. Эпидемиологический и аллергический анамнезы без особенностей. С 1995 г. ребенок-инвалид по ДЗД. С 2000 г. инвалид 2-й группы.

В 2015 г. получила направление на ботулинотерапию. Инъекции ботокса не получала по неизвестным причинам. Произошло нарастание симптоматики — появилось выраженное ограничение ходьбы, самообслуживания; в связи с этим госпитализирована в неотложном порядке в неврологический стационар для дальнейшего обследования.

Данные объективного обследования при поступлении: состояние средней тяжести, кожа бледная, сухая. Пульс ритмичный, 72 уд./мин, АД 130/75, ЧД 16 в минуту. Неврологическое обследование: скандированная речь, сознание ясное, ориентирована правильно. Черепные нервы — без особенностей. Снижение мышечной силы в нижних конечностях до 3,5 баллов дистально, повышение мышечного тонуса по экстрапирамидному тону справа (рис. 1), в нижних конечностях — горметония. Рефлексы верхних конечностей равные, умеренные, нижних конечностей снижены. Патологических рефлексов нет. Координаторные пробы выполняет неуверенно с двух сторон, в позе Ромберга неустойчива. Менингеальных симптомов нет. Ограничены движения во всех отделах позвоночника. На основании жалоб, анамнеза и клинической картины выставлен предварительный диагноз: энцефалополирадикулонейропатия с нижним парапарезом, дистонией стоп (больше справа), нарушением функции ходьбы. Лабораторные исследования: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови — в пределах нормы. Электрокардиограмма: синусовый ритм 73 уд./мин. Электронейромиография нижних и верхних конечностей: легкая радикулопатия L4–L5, S1, C7–C8, Th1. Умеренная аксональная нейропатия локтевых нервов. Легкая аксональная нейропатия правого большеберцового и малоберцовых нервов. Магнитно-резонансная томография головного мозга: кортикальная атрофия 1-й степени. Данных, подтверждающих очаговую и диффузную патологию, не получено (рис. 2). Магнитно-резонансная томография шейного отдела позвоночника от 2007 г.: остеохондроз C3–C6 1-й стадии, мелкий дискоостеофитический комплекс C5–C6. Очаговая патология в спинном мозге не выявлена (рис. 3).



Рис. 1. Дистония правой стопы на фоне отсутствия лечения препаратами Леводопы

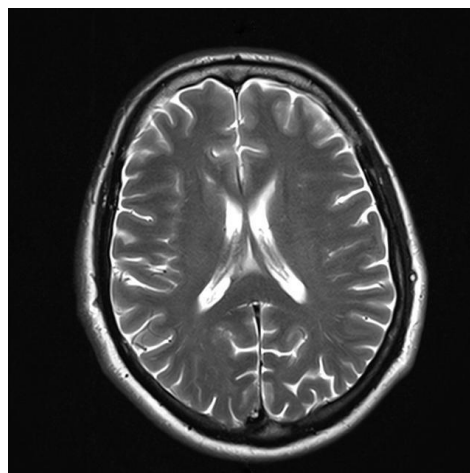


Рис. 2. МРТ головного мозга: кортикальная атрофия 1-й степени, очаговая и диффузная патологии не выявлены

ДНК-анализ, поиск мутаций в гене *GCH1* при исследовании от 13 марта 2017 г.: проведено исследование кодирующей последовательности и прилежащих интронных областей гена *GCH1*, ответственного за торсионную дистонию (DYT5), методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру. Выявлен вариант нуклеотидной последовательности с.248g>a (p.Gly83Asp) в гетерозиготном состоянии. Диагноз «Торсионная дистония» молекулярно-генетическими методами подтвержден.

По совокупности данных, полученных в динамике, диагноз пересмотрен. Окончательный диагноз: G24.8 ДОФА-зависимая дистония с преимущественным поражением обеих стоп, нарушением функции ходьбы. Полирадикулонейропатия на фоне остеохондроза шейного и пояснично-крестцового отделов позвоночника, болевой синдром, моторные нарушения.

Пациентке даны рекомендации: наблюдение невролога по месту жительства, ЛФК ежедневно, дофаминомиметик, вазодилататор, гепатопротектор, поливитамины, ингибитор холинэстеразы. С момента установления окончательного диагноза пациентка постоянно принимала дофаминомиметик до наступления беременности. С момента наступления беременности дозировку снизила в два раза от начальной, отмечала прежнюю эффективность.

Обсуждение клинического случая

Больные с ДЗД могут иметь четыре формы мутаций гена [9], отвечающего за синтез фермента гуанозинтрифосфатциклогидролазы I (*GCH1*). Этот фермент участвует в синтезе тетрагидробиоптерина (BH4) — кофактора тирозингидроксилазы (ТГ), который превращает L-тирозин в L-ДОФА. В результате снижается содержание дофамина в полосатом теле. У пациентов с аутосомно-доминантным типом наследования патологический ген находится на хромосоме 14 (14q11-q24.3), его продуктом является белок *GCH1*. При аутосомно-рецессивном типе наследования патологический ген расположен на хромосоме 11p15.5 гена ТГ [10].

Распространенность нейрометаболического заболевания составляет 0,5–1 случай на миллион [11], данные могут быть заниженными из-за слабых симптомов у некоторых пациентов. ДЗД в возрасте 4–8 лет сочетается с признаками паркинсонизма и мышечной дистонии, приводящими к изменению походки. Повышение мышечного тонуса в ногах, признаки поражения пирамидных трактов позволяют заподозрить детский церебральный паралич или наследственную спастическую параплегию, что служит причиной ошибок в диагностике [12]. Со временем дистония нижних конечностей переходит в генерализованную дистонию. Характерны суточные колебания выраженности двигательных расстройств с уменьшением после сна и усилением к вечеру. Оценка терапевтического эффекта от приема Леводопы является методом диагностики ДЗД, когда дистония не связана с гипоксической ишемической энцефалопатией [13].

В данном случае у пациентки отмечались снижение мышечной силы в нижних конечностях до 3,5 баллов дистально, повышение мышечного тонуса по экстрапирамидному тону справа, расстройство походки с дистоническими движениями нижних конечностей, снижение рефлексов нижних конечностей и неустойчивость в позе Ромберга.

С учетом клинических результатов и улучшения состояния после назначения комбинации Леводопы / Карбидопы был поставлен диагноз ДЗД. Пациентка не имеет клинических симптомов дистонии на сегодняшний день.

Выводы

ДОФА-зависимая дистония — редкое генетическое заболевание с манифестацией клинических проявлений в детском возрасте. Постановка окончательного диагноза занимает продолжительное время в связи с трудностью диагностики заболевания. Дети с начавшейся дистонией, нарушениями походки зачастую не обращают на себя пристального внимания родителей. Правильно собранный анамнез и целенаправленное неврологическое обследование в поисках суточных изменений симптомов и ответ на терапию являются факторами к постановке верного диагноза. Результаты приведенного выше клинического случая позволяют специалистам чаще обращать внимание на данную патологию при обследовании пациента.

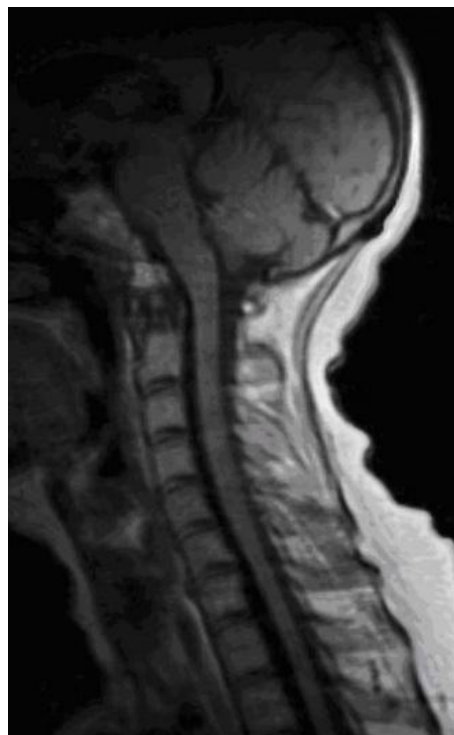


Рис. 3. МРТ шейного отдела позвоночника: остеохондроз C3–C6 1-й стадии, мелкий дискоостеофитический комплекс C5–C6. Очаговая патология в спинном мозге не выявлена

Литература

1. Segawa M, Ohmi K, Itoh S, Aoyama M, Hayakawa H. Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-Dopa, hereditary basal ganglia disease with marked diurnal fluctuation. *Shinryo*. 1971; 24: 667–72.
2. Roubertie A, Mariani LL, Fernandez-Alvarez E, Doummar D, Roze E. Treatment for dystonia in childhood. *Eur J Neurol*. 2012; 19 (10): 1292–9. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2011.03649.x.
3. Lin J, Lumsden DE, Gimeno H, et al. The impact and prognosis for dystonia in childhood including dystonic cerebral palsy: a clinical and demographic tertiary cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2014; 85: 1239–44.
4. Gouider-Khouja N, Kraoua I, Benrhouma H, Fraj N, Rouissi A. Movement disorders in neuro-metabolic diseases. *Eur J Paediatr Neurol*. 2010; 14 (4): 304–7. DOI: 10.1016/j.ejpn.2009.11.005.
5. Wassenberg T, Schouten MI, Helmich RC, Willemsen MAA, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BPC. Autosomal dominant GCH1 mutations causing spastic paraplegia at disease onset [published online ahead of print, 2020 Apr 1]. *Parkinsonism Relat Disord*. 2020; 74: 12–15. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.03.019.
6. Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia — clinical and genetic heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2015 Jul; 11 (7): 414–24. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.86.
7. Nygaard TG, Marsden CD, Duvoisin RC. Dopa-responsive dystonia. *Advances in Neurology*. 1988; 50: 377–84.
8. Van Hove JL, Steyaert J, Matthijs G, Legius E, Theys P, Wevers R, et al. Expanded motor and psychiatric phenotype in autosomal dominant Segawa syndrome due to GTP cyclohydrolase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2006; 77: 18–23. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp.2004.051664>.
9. Camargo CHF, Camargos ST, Cardoso FEC, Teive HAG. The genetics of the dystonias — a review based on the new classification of the dystonias. *Arquivos de neuropsiquiatria*. 2015; 73 (4): 350–8.
10. Lohmann K, Klein C. Update on the genetics of dystonia. *Current neurology and neuroscience reports*. 2017; 17 (3): 26.
11. Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von der Hagen M, Feiner C, et al. Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2008; 79: 183–6. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp.2007.128413>.
12. Lee W-W, Jeon BS. Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014; 14 (7): 461. Available from: <https://DOI.org/10.1007/s11910-014-0461-9>.
13. Van Egmond ME, Kuiper A, Eggink H, Sinke RJ, Brouwer OF, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Dystonia in children and adolescents: a systematic review and a new diagnostic algorithm. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2015; 86 (7): 774–81. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp-2014-309106>.

References

1. Segawa M, Ohmi K, Itoh S, Aoyama M, Hayakawa H. Childhood basal ganglia disease with remarkable response to L-Dopa, hereditary basal ganglia disease with marked diurnal fluctuation. *Shinryo*. 1971; 24: 667–72.
2. Roubertie A, Mariani LL, Fernandez-Alvarez E, Doummar D, Roze E. Treatment for dystonia in childhood. *Eur J Neurol*. 2012; 19 (10): 1292–9. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2011.03649.x.
3. Lin J, Lumsden DE, Gimeno H, et al. The impact and prognosis for dystonia in childhood including dystonic cerebral palsy: a clinical and demographic tertiary cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2014; 85: 1239–44.
4. Gouider-Khouja N, Kraoua I, Benrhouma H, Fraj N, Rouissi A. Movement disorders in neuro-metabolic diseases. *Eur J Paediatr Neurol*. 2010; 14 (4): 304–7. DOI: 10.1016/j.ejpn.2009.11.005.
5. Wassenberg T, Schouten MI, Helmich RC, Willemsen MAA, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BPC. Autosomal dominant GCH1 mutations causing spastic paraplegia at disease onset [published online ahead of print, 2020 Apr 1]. *Parkinsonism Relat Disord*. 2020; 74: 12–15. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.03.019.
6. Wijemanne S, Jankovic J. Dopa-responsive dystonia — clinical and genetic heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2015 Jul; 11 (7): 414–24. DOI: 10.1038/nrneurol.2015.86.
7. Nygaard TG, Marsden CD, Duvoisin RC. Dopa-responsive dystonia. *Advances in Neurology*. 1988; 50: 377–84.
8. Van Hove JL, Steyaert J, Matthijs G, Legius E, Theys P, Wevers R, et al. Expanded motor and psychiatric phenotype in autosomal dominant Segawa syndrome due to GTP cyclohydrolase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2006; 77: 18–23. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp.2004.051664>.
9. Camargo CHF, Camargos ST, Cardoso FEC, Teive HAG. The genetics of the dystonias — a review based on the new classification of the dystonias. *Arquivos de neuropsiquiatria*. 2015; 73 (4): 350–8.
10. Lohmann K, Klein C. Update on the genetics of dystonia. *Current neurology and neuroscience reports*. 2017; 17 (3): 26.
11. Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von der Hagen M, Feiner C, et al. Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2008; 79: 183–6. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp.2007.128413>.
12. Lee W-W, Jeon BS. Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014; 14 (7): 461. Available from: <https://DOI.org/10.1007/s11910-014-0461-9>.
13. Van Egmond ME, Kuiper A, Eggink H, Sinke RJ, Brouwer OF, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Dystonia in children and adolescents: a systematic review and a new diagnostic algorithm. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2015; 86 (7): 774–81. Available from: <https://DOI.org/10.1136/jnnp-2014-309106>.

ВЛИЯНИЕ ЭМПАГЛИФЛОЗИНА И L-ОРНИТИНА L-АСПАРТАТА НА ПОВЕДЕНЧЕСКО-КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ

В. А. Приходько¹✉, Ю. И. Сысоев^{1,2}, М. А. Поверяева¹, А. В. Бунят¹, В. Е. Карев³, Д. Ю. Ивкин¹, Д. С. Суханов¹, Е. Б. Шустов¹, С. В. Оковитый¹

¹ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

² Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — хроническое заболевание, характеризующееся не только изменениями углеводного и липидного обменов, но и рядом психоневрологических нарушений, включая тревожно-депрессивные расстройства, ухудшение памяти и астенический синдром. Большинство фармакологических исследований направлено на оценку способности препаратов восстанавливать биохимические функции и гистоморфологическую картину печени при НАЖБП; их влияние на течение сопутствующих нарушений изучают редко. Целью работы было оценить влияние эмпаглифлозина и L-орнитина L-аспартата (ОА) на поведение, память и физическую работоспособность мышей линии C57BL/6 при моделировании НАЖБП (6-месячная «западная диета» с еженедельным введением тетрахлорметана). Данная модель вызывает у животных изменение поведения (снижение скорости передвижения на 38 и 35%, $p < 0,01$; увеличение частоты стоек на 432 и 279%, $p < 0,05$ и др.), ухудшение долговременной памяти (время поиска в «Лабиринте Барнс» возрастало на 108%, число ошибок — на 439%, $p < 0,05$), а также снижение физической работоспособности (время вынужденного плавания сократилось на 50%, $p < 0,05$ и др.). Оба препарата при введении во время диеты снижали тревожность (эмпаглифлозин: число грумингов возросло на 160%, $p < 0,05$ и на 2173%, $p < 0,01$; время в белой зоне черно-белой камеры — на 275%, $p < 0,05$ и др.; ОА: время в открытых рукавах лабиринта увеличилось на 267%, $p < 0,05$) и способствовали сохранению памяти у мышей с НАЖБП. Особенностью ОА было повышение физической работоспособности животных (время вынужденного плавания увеличилось на 106%, $p < 0,05$ и др.). Таким образом, эмпаглифлозин и ОА могут положительно влиять на поведенческие и когнитивные функции, а также снижать выраженность астенического синдрома при НАЖБП.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, стеатогепатит, когнитивные нарушения, физическая работоспособность, эмпаглифлозин, L-орнитин L-аспартат

Финансирование: работа проведена в рамках проекта Санкт-Петербургского государственного университета №: 51134206.

Вклад авторов: В. А. Приходько — анализ литературы, проведение экспериментов; анализ, статистическая обработка и интерпретация данных; подготовка рукописи и иллюстраций. Ю. И. Сысоев — планирование исследования, анализ литературы, проведение экспериментов; анализ, статистическая обработка и интерпретация данных; подготовка рукописи и иллюстраций. М. А. Поверяева — проведение экспериментов; А. В. Бунят — планирование исследования, проведение экспериментов; В. Е. Карев — анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи и иллюстраций; Д. Ю. Ивкин — планирование исследования, анализ литературы; Д. С. Суханов — планирование исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; Е. Б. Шустов и С. В. Оковитый — планирование исследования; анализ литературы; анализ и интерпретация данных; подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: все эксперименты проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и рекомендациям биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава России. Животных содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением нормативных требований к питанию и освещению.

✉ Для корреспонденции: Вероника Александровна Приходько
ул. Краснопутиловская, д. 76, к. 2, лит. А, г. Санкт-Петербург, 196247; veronika.prihodko@pharminnotech.com

Статья получена: 22.05.2020 **Статья принята к печати:** 08.06.2020 **Опубликована онлайн:** 20.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.034

EFFECTS OF EMPAGLIFLOZIN AND L-ORNITHINE L-ASPARTATE ON BEHAVIOR, COGNITIVE FUNCTIONS, AND PHYSICAL PERFORMANCE IN MICE WITH EXPERIMENTALLY INDUCED STEATOHEPATITIS

Prihodko VA¹✉, Sysyoyev Yul^{1,2}, Poverayeva MA¹, Bunyat AV¹, Karev VE³, Ivkin DY¹, Sukhanov DS¹, Shustov EB¹, Okovityi SV¹

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of FMBA, Saint Petersburg, Russia

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic condition characterized by disturbed carbohydrate and lipid metabolism and often complicated by psychoneurological symptoms, including anxiety, depression, memory deficit, and asthenia. Most studies of pharmacotherapy candidates for NAFLD focus on the ability of the tested drugs to restore the biochemical functions and morphology of the liver while their potential effects on the co-existing conditions remain overlooked. The aim of this paper was to investigate the effects of empagliflozin and L-ornithine L-aspartate (OA) on behavior, memory, and physical performance in C57BL/6 mice with experimentally induced NAFLD (6 months of a Western diet + weekly carbon tetrachloride injections). The disease affected animal behavior (locomotion speed decreased by 38% and 35%, $p < 0.01$; rearing increased by 432% and 279%, $p < 0.05$ etc.), induced long-term memory deficit (latency to find the target box increased by 108% in the Barnes maze, the number of errors increased by 439%, $p < 0.05$), and compromised physical performance (swimming time in the forced swim test dropped by 50%, $p < 0.05$ etc.). When administered during the high-calorie diet period, both drugs reduced anxiety (empagliflozin: the number of grooming bouts rose by 160%, $p < 0.05$ and 2173%, $p < 0.01$; time spent in the light compartment in the light/dark box test increased by 275%, $p < 0.05$, etc.; OA: time spent in the open arms of the maze increased by 267%, $p < 0.05$), and promoted memory retention in mice with NAFLD. OA improved physical performance (swimming time in the forced swimming test improved by 106%, $p < 0.05$, etc.). Thus, empagliflozin and OA can have a beneficial effect on cognitive functions, as well as behavior, and ameliorate asthenia in NAFLD.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, steatohepatitis, cognitive disorders, physical performance, empagliflozin, L-ornithine L-aspartate

Funding: this work was part of the Saint-Petersburg State University project № 51134206.

Author contribution: Prihodko VA analyzed the literature; conducted the experiments; participated in statistical analysis and interpretation of the obtained data; wrote the manuscript and prepared the figures. Sysyoyev Yul planned the study; analyzed the literature; conducted the experiments; participated in statistical analysis and data interpretation; wrote the manuscript and prepared the figures. Poverayeva MA conducted the experiments; Bunyat AV planned the study; conducted the experiments; Karev VE analyzed and interpreted the obtained data; wrote the manuscript and prepared the figures; Ivkin DY planned the study; analyzed the literature; Sukhanov DS planned the study; analyzed and interpreted the obtained data; wrote the manuscript; Shustov EB, Okovityi SV planned the study; analyzed the literature; analyzed and interpreted the obtained data; wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the experiments were conducted in compliance with the Basel Declaration, the Order № 199 on the *Principles of Good Laboratory Practice* of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation dated April 01, 2016, and the recommendations of the Bioethics Committee of Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. The animals were housed in a vivarium under standard controlled laboratory conditions.

✉ **Correspondence should be addressed:** Veronika A. Prihodko
Krasnoputilovskaya, 76, k. 2, lit. A, Saint Petersburg, 196247; veronika.prihodko@pharminnotech.com

Received: 22.05.2020 **Accepted:** 08.06.2020 **Published online:** 20.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.034

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — это хроническое заболевание, при котором происходит избыточное накопление липидов в гепатоцитах в отсутствие повреждающего действия алкоголя и других токсических веществ. Возникновение и развитие НАЖБП тесно связано с нарушениями углеводного и липидного обмена, ожирением и инсулинорезистентностью. По современным оценкам, до 25% мирового населения страдают НАЖБП, что делает это заболевание основной причиной хронической патологии печени [1, 2].

Помимо метаболических нарушений, большое внимание специалистов привлекают тревожно-депрессивные расстройства, астения и когнитивные нарушения, ассоциированные с НАЖБП [3–5]. Так, в одном из исследований у 53% больных НАЖБП была обнаружена субклиническая депрессия и у 14% — клиническая [6]. Стоит отметить, что у таких пациентов раздражительность и перепады настроения часто сопровождаются повышенной утомляемостью и хронической усталостью [3]. Ряд исследователей полагают, что когнитивные нарушения осложняют течение НАЖБП практически у всех больных, из которых половина испытывают их в легкой форме, а другая половина — в среднетяжелой или тяжелой [4].

Основные цели лечения НАЖБП — устранение факторов развития, уменьшение проявлений и предупреждение прогрессирования болезни [2, 7]. К лекарственным препаратам, применение которых может быть показано у больных НАЖБП наряду с диетой и физической нагрузкой, относят гиполипидемические и гипогликемические средства, а также гепатопротекторы [2, 7]. Их эффективность в качестве средств коррекции метаболических нарушений изучена достаточно подробно, но оценке возможности их применения при психоневрологических нарушениях на фоне НАЖБП посвящено весьма ограниченное число работ [8,

9]. В связи с этим целью настоящего исследования стала оценка влияния эмпаглифлозина и L-орнитина L-аспартата на поведение, когнитивные функции и физическую работоспособность мышей линии C57BL/6 при моделировании у них НАЖБП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете на 52 трехмесячных инбредных мышах-самцах линии C57BL/6 со средней массой тела 23 г, полученных из ФГУП «ПЛЖ Рапполово» (Ленинградская область). Животные получали корм «Полнорационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», РФ) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая» (исключая период высококалорийной диеты). Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*. Выбор животных этой линии обусловлен развитием у них метаболических и поведенческо-когнитивных изменений на фоне высокожировой диеты [10, 11]. По окончании 14-дневного периода адаптации мыши были рандомизированы на четыре экспериментальные группы: 1-я группа — интактные животные («Интакт»; $n = 10$), 2-я — контроль без лечения («Контроль»; модель НАЖБП, $n = 14$), 3-я — НАЖБП + эмпаглифлозин («ЭМПА»; Джардинс®, 2 мг/кг; $n = 14$), 4-я — НАЖБП + L-орнитина L-аспартат («ОА»; Гепа-Мерц®, 1,5 г/кг; $n = 14$). Исследуемые препараты вводили внутривентрикулярно с использованием зондов в течение всего эксперимента раз в день, контрольная и интактные группы получали эквивалентные количества 0,9%-го раствора хлорида натрия.

НАЖБП (стеатогепатит) моделировали, используя сочетание «западной» диеты (western diet) и внутрибрюшинного введения тетрахлорметана (CCl_4)

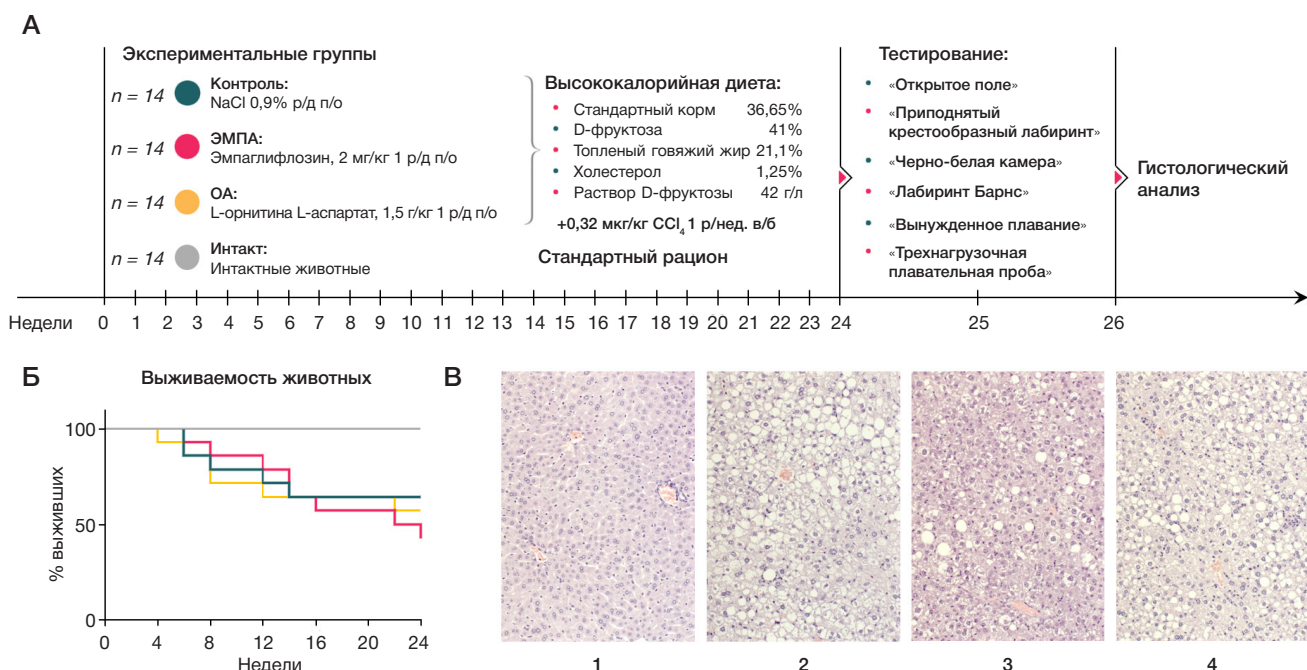


Рис. 1. А. Описание модели НАЖБП, тестируемых групп и схема эксперимента. р/д — раз в день, р/нед. — раз в неделю, п/о — перорально, в/б — внутрибрюшинно. **Б.** Динамика выживаемости животных. **В.** Гистоморфологическая картина печени животных экспериментальных групп. 1 (Интакт) — нормальная структура ткани печени; 2 (Контроль) — морфологические признаки НАЖБП: выраженная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов, очаговая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами паренхимы печени; 3 (ЭМПА) — морфологические признаки НАЖБП: слабо выраженная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, слабо выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов, патологическая клеточная инфильтрация паренхимы печени отсутствует; 4 (ОА) — умеренно выраженная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, умеренно выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов, умеренно выраженная полиморфноклеточная инфильтрация паренхимы печени. А, Б, В, Г — окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

(рис. 1А). Группы «Контроль», «ЭМПА» и «ОА» в течение 6 месяцев находились на высококалорийной диете (ВКД) следующего состава: 36,65% стандартного корма + 21,1% топленого говяжьего жира + 41% D-фруктозы + 1,25% холестерина. В качестве питья животные указанных групп получали раствор D-фруктозы с концентрацией 42 г/л. Ежедневно в течение всего периода ВКД животным указанных групп вводили внутривенно CCl_4 в дозе 0,32 мг/кг массы тела [12]. Интактные мыши на протяжении всего периода получали стандартный корм и питьевую воду без добавок.

По истечении периода ВКД поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП), «Черно-белая камера» (ЧБК) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (НПК «Открытая наука»; Россия) с использованием системы видеорегистрации VideoMot2 (TSE Systems; Германия).

Для оценки краткосрочной и долгосрочной памяти мышей тестировали в «Лабиринте Барнс» (ЛБ) (НПК «Открытая наука»; Россия) [13]. Обучение животных проводили ежедневно 4 раза в течение 4-х дней; на 5-й и 12-й дни осуществляли контрольное тестирование. В процессе обучения и тестирования учитывали время нахождения target box (с), а также число совершенных ошибок.

Через два дня после проведения поведенческих тестов физическую работоспособность животных оценивали с помощью плавательных тестов «Вынужденное плавание» (ВП) с грузом 7,5% от массы тела и «Трехнагрузочная плавательная проба» (ТПП) [14, 15]. Регистрацию времени плавания в ТПП вели в 3-х временных точках: исходно, через 5 и через 45 мин после начала тестирования.

Для определения структурных изменений в печени выполняли гистологическое исследование. Образцы ткани печени после фиксации 10%-м нейтральным формалином подвергали дегидратации и обезжириванию

с использованием изопропанола, имбиции парафином по общепринятой методике. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм, помещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровные стекла. Изучение гистологических препаратов осуществляли в проходящем свете с качественной оценкой жировой и белковой (баллонной) дистрофии гепатоцитов, а также патологической клеточной инфильтрации паренхимы печени [2, 16].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software; США). Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с post-hoc-тестом по Даннетту; при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с post-hoc-тестом по Данну. Числовые данные, приведенные на рисунках, представлены в виде $M \pm SE$. Анализ главных компонент выполнен с помощью приложения для MS Excel XLStat 2016 (Addinsoft; Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость животных и гистоморфологические изменения печени при экспериментальной НАЖБП

В течение 6 месяцев эксперимента произошла гибель приблизительно 40% мышей контрольной и опытных

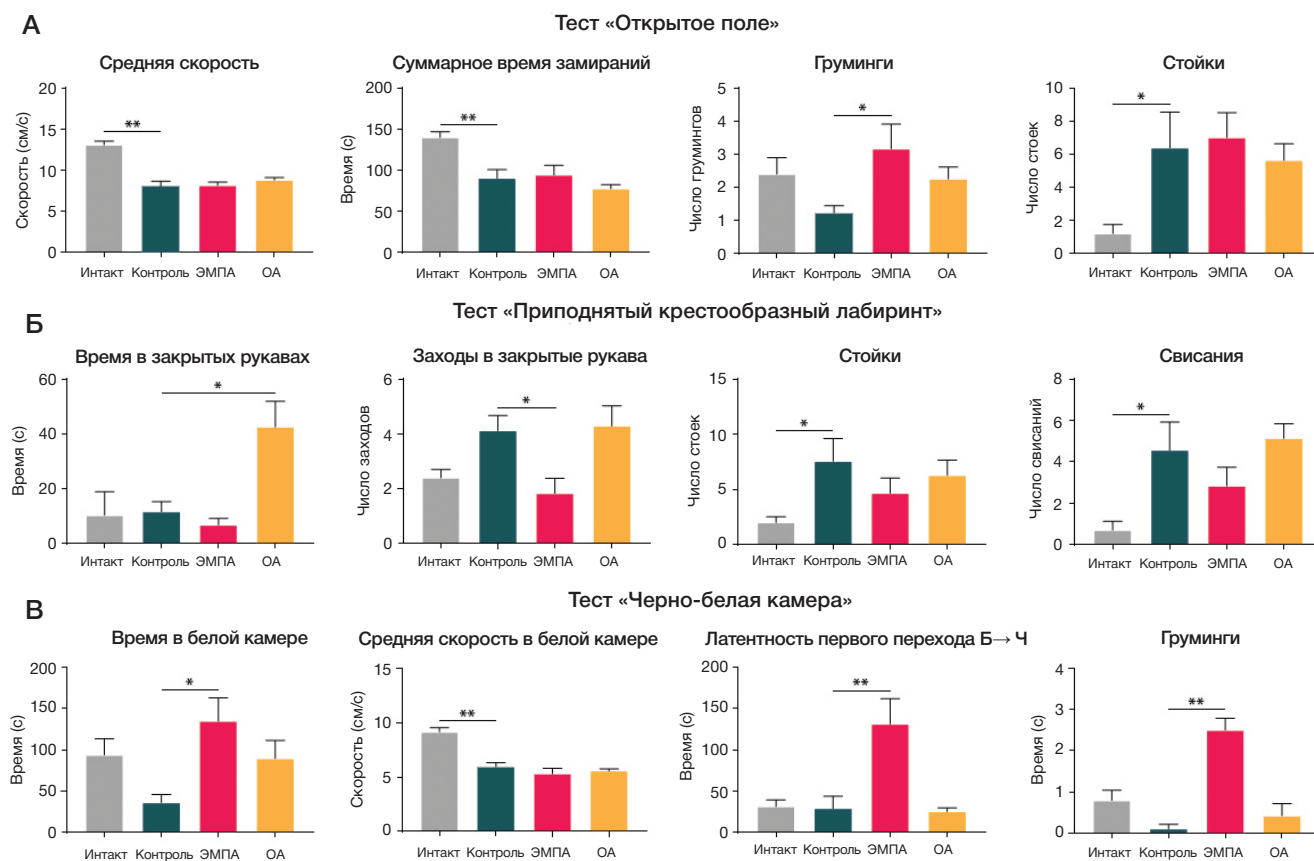


Рис. 2. Результаты оценки поведения мышей в тестах «Открытое поле» (А), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (Б) и «Черно-белая камера» (В). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

групп. Ни эмпаглифлозин, ни ОА не оказывали влияния на выживаемость животных (рис. 1Б). Гистоморфологическая картина изменений печени мышей с НАЖБП характеризовалась наличием жировой и баллонной дистрофии гепатоцитов, а также инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами паренхимы печени. Степень выраженности указанных морфологических изменений была максимальной у животных из контрольной группы: жировой дистрофии были подвергнуты не менее 30% гепатоцитов, баллонной дистрофии — не менее 30% гепатоцитов, а также выявлена очаговая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Тестируемые препараты снижали выраженность данных изменений у экспериментальных животных (рис. 1В).

Влияние экспериментальной НАЖБП на исследуемые показатели животных контрольной группы

При тестировании животных было показано, что развитие стеатогепатита приводит к изменениям поведения, когнитивной функции и физической работоспособности. В тесте ОП мыши с экспериментальной НАЖБП передвигались с меньшей скоростью (-38% ; $p < 0,01$), имели меньшее суммарное время замираний (-35% ; $p < 0,01$), а также совершали большее число стоек ($+432\%$; $p < 0,05$) по сравнению со здоровыми животными (рис. 2А). У контрольной группы было также увеличено число стоек ($+279\%$; $p < 0,05$) и свисаний ($+553\%$; $p < 0,05$) в ПКЛ (рис. 2Б). В тесте ЧБК, как и в ОП, мыши с НАЖБП передвигались медленнее (-35% ; $p < 0,01$), чем здоровые животные (рис. 2В).

Несмотря на то что в ЛБ у животных всех экспериментальных групп динамика обучения была схожей (уменьшение количества ошибок и времени, затрачиваемого на поиск target box), только у контрольной группы отмечали увеличение как затрачиваемого времени

($+108\%$), так и числа ошибок на 12-й день по сравнению с 5-м ($+439\%$) ($p < 0,05$ в обоих случаях) (рис. 3).

Время вынужденного плавания (-50% ; $p < 0,05$), а также время плавания в исходной точке в тесте ТПП (-69% ; $p < 0,05$) были меньше у мышей с НАЖБП без лечения по сравнению с интактной группой. Кроме того, во время ТПП физическая работоспособность мышей контрольной группы восстанавливалась медленнее и их результаты в точке 5 мин уступали результатам здоровых животных (-63% ; $p < 0,05$) (рис. 4).

Влияние эмпаглифлозина на исследуемые показатели у животных

В тесте ОП эмпаглифлозин увеличивал количество грумингов ($+160\%$; $p < 0,05$) (рис. 2А), а в тесте ПКЛ — уменьшал число заходов в закрытые рукава в сравнении с контрольной группой (-56% ; $p < 0,05$) (см. рис. 2Б). В тесте ЧБК мыши, получавшие препарат, дольше находились в белой камере ($+275\%$; $p < 0,05$), позднее совершали первый переход в черную камеру ($+355\%$; $p < 0,01$), а также значительно чаще делали груминги по сравнению с контрольными животными ($+2173\%$; $p < 0,01$) (см. рис. 2В).

Введение эмпаглифлозина мышам с НАЖБП не оказывало статистически значимого влияния на показатели краткосрочной и долгосрочной памяти в ЛБ и физическую работоспособность в тестах ВП и ТПП.

Влияние L-орнитина L-аспартата на исследуемые показатели у животных

В тестах ОП, ЧБК и ЛБ ОА не оказывал значимого влияния на показатели экспериментальных животных. В тесте ПКЛ он увеличивал время, проводимое животными в открытых рукавах, по сравнению с контрольной группой ($+267\%$; $p < 0,05$) (рис. 2Б).

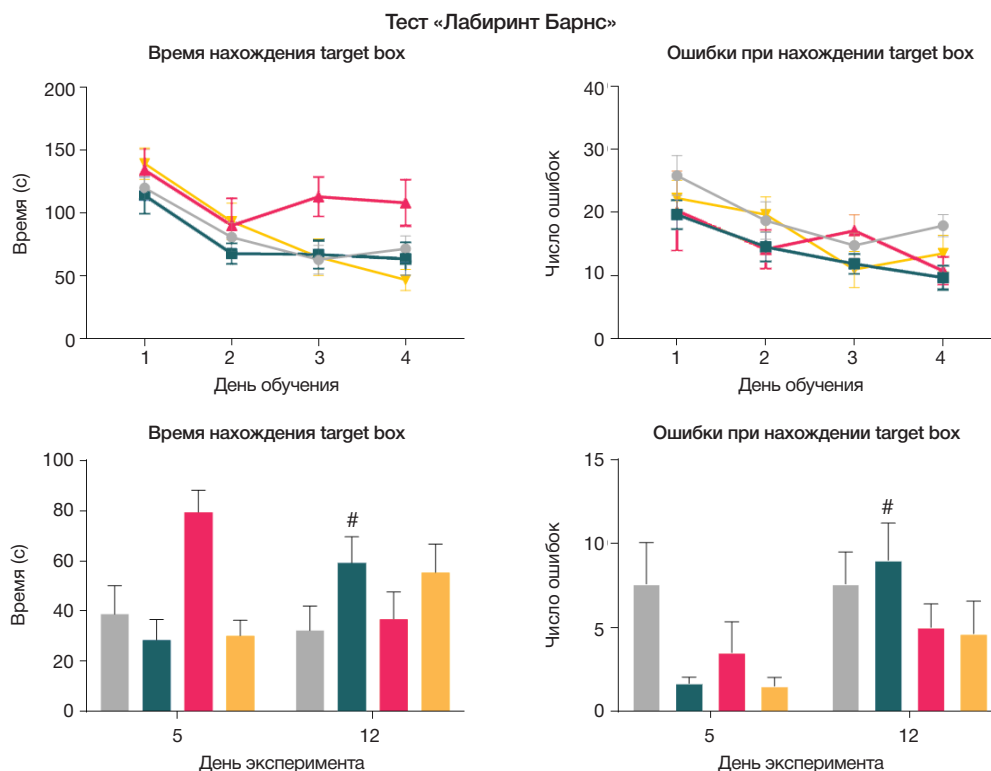


Рис. 3. Результаты оценки состояния памяти мышей в тесте «Лабиринт Барнс». — Интакт, — Контроль, — ЭМПА, — ОА; # — $p < 0,05$ по сравнению с результатом на 5-й день

У животных, получавших ОА, время вынужденного плавания было существенно выше, чем в контрольной группе (+106%; $p < 0,05$), и сопоставимо с результатами здоровых особей. Аналогичным образом в тесте ТПП через 45 мин от исходной точки группа ОА дольше оставалась на поверхности воды в сравнении с группой НАЖБП (+137%; $p < 0,01$) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании изучено влияние курсового введения эмплаглифлозина и ОА на поведение, память и физическую работоспособность мышей линии C57BL/6 с НАЖБП на стадии стеатогепатита.

В тестах ОП и ПКЛ мыши с экспериментальной НАЖБП совершали больше стоек, нежели контрольные животные, а в ПКЛ, кроме того, больше свисаний с открытых рукавов. Увеличение частоты стоек можно рассматривать как признак тревожного состояния животных [17, 18]. Свисание с открытых рукавов не только является элементом исследовательской активности, но и входит в число действий, совершаемых грызунами для оценки риска [19]. В связи с этим увеличение частоты свисаний само по себе — неоднозначный признак. С учетом одновременного увеличения частоты стоек, а также некоторой склонности животных к посещению закрытых рукавов это изменение может быть расценено как признак повышения тревожности [20, 21].

В тесте ЧБК мыши с НАЖБП, в отличие от интактной группы, реже совершали груминги, при этом была тенденция к снижению времени нахождения в белой камере. Предпочтение грызунами темного закрытого пространства, основанное на проявлении норкового рефлекса, свидетельствует о повышении уровня тревожности [22]. Увеличение тревожности у грызунов на фоне диет-индуцированной НАЖБП в своих исследованиях отмечали и другие авторы [23, 24]. Помимо этого, повышенная тревожность наряду с ухудшением настроения и апатией относится к характерным психоневрологическим симптомам у пациентов, страдающих НАЖБП [3, 6].

Стоит отметить, что у животных с НАЖБП происходило снижение средней скорости передвижения по сравнению с интактными животными в тестах ОП и ЧБК (в ПКЛ данный показатель не фиксировали), на которое эмплаглифлозин и ОА не оказывали влияния. Кроме того, в ОП у мышей с НАЖБП во всех группах наблюдали уменьшение суммарного времени замирания. Можно предположить,

что снижение средней скорости передвижения также является проявлением тревожного поведения. Что касается уменьшения времени замираний, то в классическом понимании данное изменение поведения свидетельствует об анксиолитическом эффекте. Вместе с тем снижение времени замирания может говорить и о том, что мыши активно искали укрытие ввиду повышенной тревожности. Мы решили обратить внимание на данные показатели отдельно ввиду сложности их однозначной интерпретации. Не исключено также, что НАЖБП у мышей вызывает более комплексные изменения поведения, которые нельзя трактовать только с точки зрения увеличения/уменьшения уровня тревожности.

Мыши, получавшие эмплаглифлозин, проводили больше времени в белой камере в тесте ЧБК по сравнению с контрольными животными. Очевидно, при помещении в белую камеру животные испытывали меньший дискомфорт и потребность в поиске убежища, благодаря чему у них значительно возросла латентность первого посещения черной камеры. Кроме того, во время своего пребывания в белой камере мыши, получавшие эмплаглифлозин, совершали больше грумингов, чем контрольные животные. Аналогичное увеличение частоты грумингов было отмечено и в тесте ОП. В настоящее время этот эффект рассматривают двояко. С одной стороны, под воздействием стрессорных факторов животные склонны совершать более частые, но более короткие акты груминга, что наряду с учащением вегетативных (эксреторных) реакций служит признаком повышения тревожности. В данном случае груминг замещает другие поведенческие реакции и виды активности, подавляемые при остром стрессе [25]. С другой стороны, грызуны осуществляют больше грумингов, когда чувствуют себя в безопасности, находятся в спокойном состоянии и не испытывают тревоги [26]. С учетом предпочтения открытого и освещенного пространства увеличение частоты грумингов в данном случае следует расценивать скорее как проявление анксиолитического эффекта препарата.

Описанные нами эффекты эмплаглифлозина могут быть напрямую связаны с его благоприятным влиянием на морфологию глиальных клеток [27], а также с увеличением уровня BDNF (нейротрофический фактор мозга; brain-derived neurotrophic factor) у мышей с ожирением и инсулинорезистентностью [28]. Это дает основание предполагать, что у эмплаглифлозина есть дополнительные центральные механизмы, опосредующие его анксиолитический эффект.

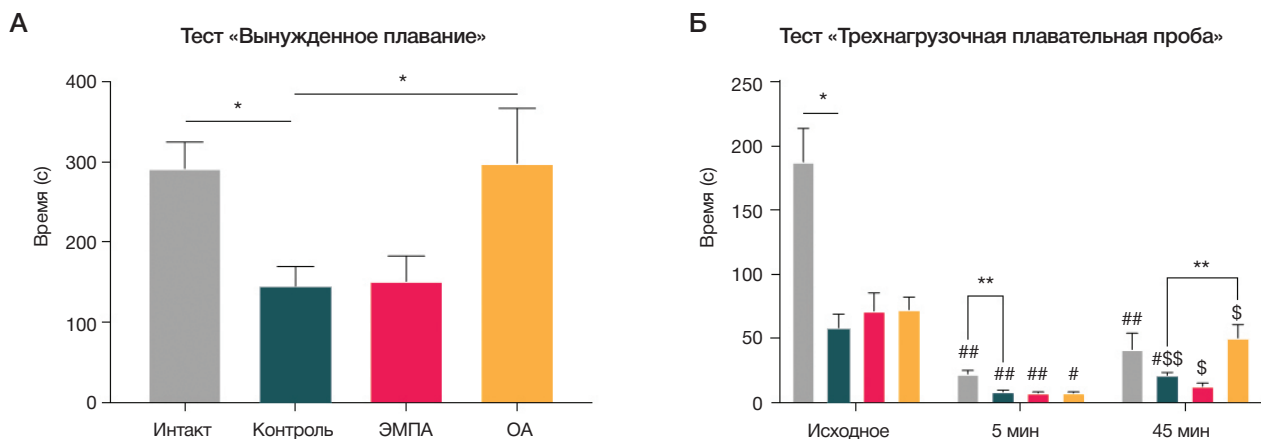


Рис. 4. Результаты оценки физической работоспособности мышей в тестах «Вынужденное плавание» (А) и «Трехнагрузочная плавательная проба» (Б). ■ — Интакт, ■ — Контроль, ■ — ЭМПА, ■ — ОА; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$ по сравнению с исходным результатом; \$ — $p < 0,05$, \$\$ — $p < 0,01$ по сравнению с результатом через 5 мин

ОА у мышей с НАЖБП в тесте ПКЛ увеличивал время нахождения в открытых рукавах, что служит признаком его анксиолитической активности. Отсутствие изменений таких показателей, как частота заходов в закрытые рукава, а также число свисаний с открытых рукавов, может говорить о сохранении спонтанной двигательной и исследовательской активности у животных этой группы [29].

В ЛБ в процессе обучения у животных всех экспериментальных групп снижалось время, затрачиваемое на поиск target box, а также количество совершаемых при этом ошибок. Контрольная группа была единственной, где на 12-й день эксперимента результаты как по времени поиска, так и по количеству ошибок были достоверно хуже, чем на 5-й день. Предположительно, это говорит об ухудшении долговременной памяти у мышей на фоне НАЖБП. Ранее нарушения пространственной памяти были обнаружены у крыс с НАЖБП [30]. Экспериментально установлено, что снижение когнитивного статуса при НАЖБП коррелирует с уменьшением объема серого и белого вещества мозга, а также сопровождается снижением массы мозга в целом [31]. Неалкогольный стеатогепатит и фиброз печени, особенно его поздние стадии, приводят к развитию множественного очагового поражения белого вещества вне зависимости от наличия сопутствующих заболеваний [32]. В группах мышей, получавших лечение одним из препаратов, а также у интактных животных состояние долговременной памяти не было нарушено.

На 3-й, 4-й и 5-й дни эксперимента мыши, получавшие эмпаглифлозин, показывали несколько худшие результаты по времени поиска в сравнении с животными других групп. Характерно, что эти мыши не стремились к исследованию лабиринта и поиску убежища, а, напротив, предпочитали находиться на открытом пространстве, как правило,

выбрав для этого одно из ложных отверстий. Это вполне согласуется с высказанным ранее предположением о наличии у эмпаглифлозина анксиолитического эффекта, который в данном случае способствовал повышению устойчивости мышей к стрессорным воздействиям (в данном случае — открытому пространству и свету).

Ранее было показано, что перевод животных с обычного рациона питания на высокожировую диету при моделировании НАЖБП вызывает достаточно быстрое (к концу первого месяца) ухудшение функционального состояния, проявляющееся двукратным снижением физической работоспособности [33]. В последующем, с 4-го месяца такого питания началось постепенное восстановление работоспособности. Однако в настоящей работе метаболическая нагрузка на организм животных была более жесткой. Именно с этим может быть связано то, что к 6 месяцам моделирования НАЖБП адаптация энергопродуцирующих механизмов к новым условиям существования организма не наступила, и физическая работоспособность животных в плавательном тесте оставалась резко сниженной (45% от уровня интактной группы по сравнению с полным восстановлением уровня работоспособности к 6-му месяцу моделирования при менее жесткой диете).

Необходимо отметить, что в процессе формирования НАЖБП даже в более мягком режиме было выявлено существенное снижение уровня гликогена в скелетных мышцах (на 33%) и печени (на 44%) [33]. Сочетание ВКД с инъекционным введением CCl_4 , обладающего гепатотоксическим и прооксидантным действиями, позволяет получить у животных выраженные нарушения липидного обмена, сопровождающиеся характерными гистоморфологическими изменениями ткани печени, и вызвать дополнительное ухудшение поведенческо-

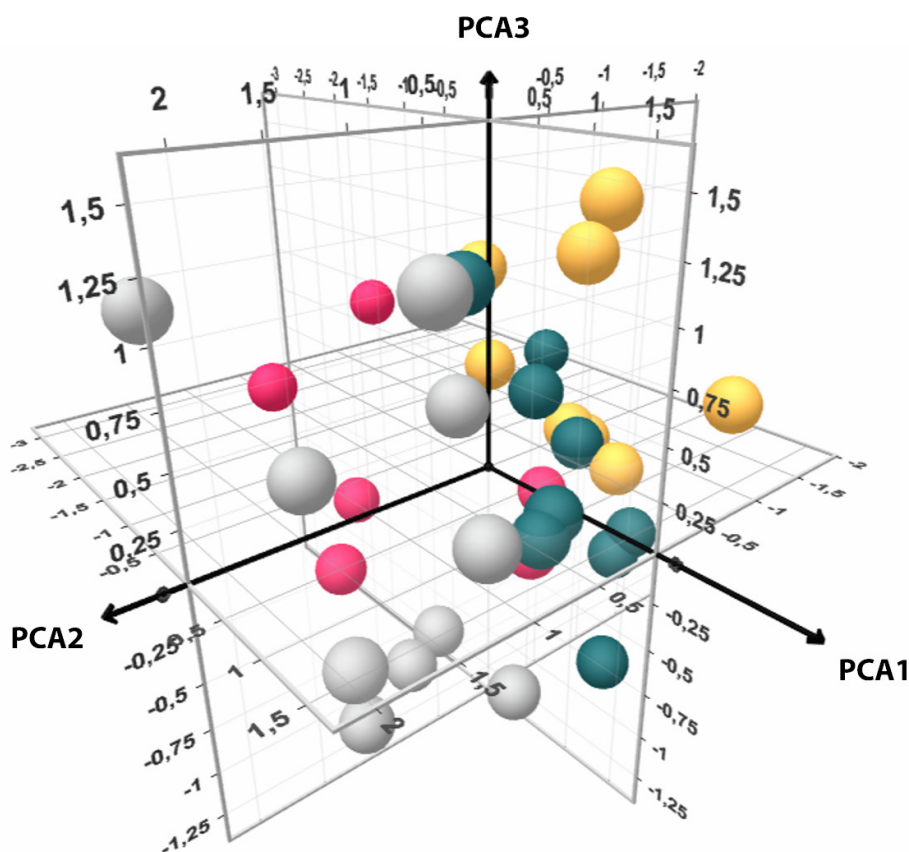


Рис. 5. Графическое представление результатов анализа главных компонент. ■ — Интакт, ■ — Контроль, ■ — ЭМПА, ■ — ОА

когнитивных функций и физической работоспособности [12]. Дефицит углеводных резервов в скелетных мышцах может быть метаболической основой снижения физической работоспособности лабораторных животных. В настоящем исследовании курсовое применение эмпаглифлозина не оказало влияние на физическую работоспособность животных в тесте вынужденного плавания, что было ожидаемо, так как механизм действия препарата не способствует улучшению транспорта глюкозы в мышцы и усилению синтеза гликогена.

Одним из энергетических резервов для обеспечения мышечной деятельности является распад мышечных белков и включение аминокислот в процессы образования субстратов цикла Кребса. При этом происходит усиленная генерация аммиака, утилизируемого в орнитинном цикле синтеза мочевины. Известно, что у человека прием ОА активирует цикл мочевины, интенсифицирует липидный обмен, незначительно повысит уровень кетоновых тел и свободных жирных кислот, а также снижает уровень аммиака в крови и субъективное чувство усталости [34]. В нашем исследовании курсовое применение ОА значительно устраняло влияние НАЖБП на физическую работоспособность животных в тесте вынужденного плавания, что показывает особую роль утилизации аминокислот в энергообеспечении мышечной деятельности при перестройке базового метаболизма организма в условиях ВКД.

Для уточнения механизма действия ОА в отношении физической работоспособности при моделировании НАЖБП была выполнена ТПП. Соотношение значений первой и истощающей нагрузок (сумма первой и второй нагрузок) в группе интактных животных показывает, что причина отказа животных от дальнейшего их выполнения в физическом утомлении при незначительной роли центрального компонента [35]. При моделировании НАЖБП произошло снижение длительности выполнения первой нагрузки в 3 раза, что свидетельствует об уменьшении выносливости; причем высокая утомляемость имеет центральный и периферический компоненты. Курсовое применение эмпаглифлозина и ОА преимущественно снижало центральный, но не периферический компонент, о чем свидетельствовало снижение уровня истощающей нагрузки до 40% от уровня интактных особей.

Основной показатель ТПП (индекс пробы, ИП) характеризует эффективность механизмов первой фазы восстановления после истощающих нагрузок. Этот показатель равен отношению времени плавания животных с грузом через 45 мин восстановительного периода к длительности истощающей нагрузки. Срочное восстановление распространяется на первые 0,5–1,5 ч отдыха и сводится к устранению накопившихся за период работы продуктов анаэробного распада и погашению кислородного долга. Необходимо отметить, что в срочной фазе постнагрузочного восстановления окислительное фосфорилирование не играет ключевой роли в ресинтезе аденозинтрифосфата (АТФ). Более значим (особенно при истощающих нагрузках, выраженном утомлении и переутомлении, перетренированности) алактатный путь,

используемый для ресинтеза АТФ продукт его деградации — аденозиндифосфат. Этот механизм запускается высоким уровнем концентрации АДФ в мышцах, который может возникнуть при истощении иных путей ресинтеза АТФ. Для обеспечения высокой скорости протекания миокиназной реакции необходима быстрая дальнейшая деградация аденозинмонофосфата АМФ и вывод из скелетных мышц его метаболита — инозинмонофосфата. Именно этот процесс сопряжен с генерацией аммиака активно работающими скелетными мышцами [36].

Оценка ИП показала, что эмпаглифлозин не влияет на процессы первой фазы восстановления (ИП в интактной группе равен 0,20, в группе ЭМПА — 0,19; ИП в контрольной группе равен 0,38 за счет резкого снижения выносливости и связанного с этим малого объема истощающей нагрузки). В то же время при применении ОА ИП был равен 0,61, что свидетельствует о достоверном влиянии препарата на процессы постнагрузочного восстановления. Вероятно, именно с этим может быть связано восстановление физической работоспособности у животных, получавших во время моделирования НАЖБП ОА. Влияние L-орнитина и его различных солей на процессы восстановления (и сопряженное с ними достижение тренировочного эффекта) у здоровых людей и лабораторных животных хорошо известно в практике спортивной медицины [37–39]. Однако его влияние на физическую работоспособность и эффективность первой фазы процесса восстановления после истощающих нагрузок на фоне формирования НАЖБП показаны впервые.

При анализе всех полученных данных методом главных компонент (principal component analysis, PCA) видно, что животные интактной и контрольной групп имеют выраженные различия, при этом исследуемые препараты оказывают эффект не только за счет влияния на течение НАЖБП, но и имеют собственные, не связанные с данной патологией эффекты (рис. 5). При курсовом введении они могут не только улучшать гистоморфологическую картину печени, но и корректировать симптомы, часто сопровождающие НАЖБП — тревожно-депрессивные расстройства, когнитивные нарушения и астению. Данные эффекты могут иметь большое значение для клинической практики ввиду высокой распространенности НАЖБП среди социально активной части населения.

ВЫВОДЫ

1. У мышей линии C57BL/6 экспериментальная НАЖБП приводит к выраженным изменениям поведения, проявляющимся главным образом увеличением уровня тревожности. Кроме того, у таких животных ухудшается долговременная память и снижается физическая работоспособность.
2. Курсовое применение эмпаглифлозина и ОА позволяет уменьшить отдельные проявления тревожного поведения и в некоторой степени нормализовать когнитивную функцию.
3. Характерной особенностью ОА является способность корректировать у животных с НАЖБП астению, проявляющуюся снижением физической работоспособности.

Литература

1. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease — A global public health perspective. *J Hepatol*. 2018; 70 (3): 531–44. PubMed PMID: 30414863.
2. Ивашкин В. Т., Маевская М. В., Павлов Ч. С., Тихонов И. Н., Широкова Е. Н., Буеверов А. О. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016; 26 (2): 24–42.
3. Moretti R, Caruso P, Gazzin S. Non-alcoholic fatty liver disease and neurological defects. *Ann Hepatol*. 2019; 18 (4): 563–570. PubMed PMID: 31080056.
4. Newton JL. Systemic Symptoms in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis*. 2010; 28 (1): 214–9. PubMed PMID: 20460914.
5. Weinstein G, Davis-Plourde K, Himali JJ, Zelber-Sagi S, Beiser AS, Seshadri S. Non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis score and cognitive function in middle-aged adults: The Framingham Study. *Liver Int*. 2019; 39 (9): 1713–21. PubMed PMID: 31155826.
6. Youssef NA, Abdelmalek MF, Binks M, Guy CD, Omenetti A, Smith AD, et al. Associations of depression, anxiety and antidepressants with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2013; 33 (7): 1062–70. PubMed PMID: 23560860.
7. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018; 67 (1): 328–57.
8. Дударенко С. В., Коваленко А. Л., Прокопенко С. М., Белогурова Е. В. Применение ремаксола в терапии метаболического синдрома у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом и сахарным диабетом 2 типа. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 130 (6): 89–94.
9. Маевская М. В., Ивашкин В. Т., Луньков В. Д., Крыжановский С. П., Пирогова И. Ю., Павлов Ч. С. и др. Антиоксиданты в лечении хронических диффузных заболеваний печени (результаты наблюдательной программы «MAXAR»). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018; 28 (5): 77–97.
10. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013; 56 (5): 1129–39. PubMed PMID: 23423668.
11. Almeida-Suhett CP, Graham A, Chen Y, Deuster P. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiol Behav*. 2017; 169: 130–40. PubMed PMID: 27876639.
12. Tsuchida T, Lee AY, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, et al. A simple diet- and chemical-induced murine nash model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol*. 2018; 69 (2): 385–95. PubMed PMID: 29572095.
13. Pitts MW. Barnes maze procedure for spatial learning and memory in mice. *Bio Protoc* [Internet]. 2018 Mar [cited 2020 May 01]; 8 (5): e2744. Available from: <https://bio-protocol.org/e2744>.
14. Каркищенко Н. Н., Каркищенко В. Н., Шустов Е. Б., Берзин И. А., Капанадзе Г. Д., Фокин Ю. В. и др. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. *Методические рекомендации*. М.: Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, 2017; 134 с.
15. Радько С. В., Гусев К. А., Краснова М. В., Оковитый С. В., авторы; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФА Минздрава России), патентообладатель. Устройство для крепления грузов к мелким лабораторным животным. Патент РФ № 172475. 07.11.2017.
16. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratzl V et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64 (6): 1388–402. PubMed PMID: 27062661.
17. Diaz-Moran S, Estanislau C, Canete T, Blazquez G, Raez A, Tobena A et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: focus on freezing and grooming. *World J Neurosci*. 2014; 4: 1–11.
18. Eudave DM, BeLow NM, Flandreau EI. Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice. *Neurobiol Stress*. 2018; 9: 1–8. PubMed PMID: 30003122.
19. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013; 6 (3): 126–35. PubMed PMID: 24678249.
20. Aduema W, Osim EE, Nwankwo AA. Using the elevated plus maze task in assessing anxiety and fear in swiss white mice. *J Complement Med Alt Healthcare* [Internet]. 2018 Apr [cited 2020 May 01]; 6 (1): 555678. Available from: <https://juniperpublishers.com/jcmah/JCMAH.MS.ID.555678.php>.
21. Бахтиярова Ш. К., Капышева У. Н., Аблайханова Н. Т., Баимбетова А. К., Жаксымов Б. И., Корганбаева А. А. и др. Поведение животных в различных тестах. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017; (8): 92–96.
22. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989; 32 (3): 777–85. PubMed PMID: 2740429.
23. Strekalova T, Evans M, Costa-Nunes J, Bachurin S, Yeritsyan N, Couch Y, et al. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain Behav Immun*. 2015; 48: 42–7. PubMed PMID: 25712260.
24. Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Penicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol*. 2016; 173 (13): 2095–110. PubMed PMID: 26472268.
25. Kalueff AV, Keisala T, Minasyan A, Kuuslahti M, Tuohimaa P. Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. *Behav Processes*. 2006; 72 (1): 104–12. PubMed PMID: 16442749.
26. Kalueff AV, Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2004; 13 (3): 151–8. PubMed PMID: 15296852.
27. Hayden MR, Grant DG, Aror AR, DeMarco VG. Empagliflozin ameliorates type 2 diabetes-induced ultrastructural remodeling of the neurovascular unit and neuroglia in the female db/db mouse. *Brain Sci* [Internet]. 2019 Mar [cited 2020 May 01]; 9 (3): 57. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/9/3/57>. PubMed PMID: 30866531.
28. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014; 13: 148. PubMed PMID: 25344694.
29. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2 (2): 322–8. PubMed PMID: 17406592.
30. Ross AP, Bruggeman EC, Kasumu AW, Mielke JG, Parent MB. Non-alcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats. *Physiol Behav*. 2012; 106 (2): 133–41. PubMed PMID: 22280920.
31. Filipovic B, Markovic O, Duric V, Filipovic B. Cognitive changes and brain volume reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2020 May 01]; 2018: 9638797. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cjgh/2018/9638797/>. PubMed PMID: 29682494.
32. Petta S, Tuttolomondo A, Gagliardo C, Zafonte R, Brancatelli, Cabibi D, et al. The presence of white matter lesions is associated with the fibrosis severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 Apr [cited 2020 May 01]; 95

- (16): e3446. Available from: https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2016/04190/The_Presence_of_White_Matter_Lesions_Is_Associated.35.aspx. PubMed PMID: 27100443.
33. Оковитый С. В., Шустов Е. Б., Белых М. А., Кириллова Н. В., Спасенкова О. М., Иванов А. Г. и др. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных. *Биомедицина*. 2018; (4): 29–43.
 34. Sugino T, Shiri T, Kajimoto Y, Kajimoto O. L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res*. 2008; 28 (11): 738–43. PubMed PMID: 19083482.
 35. Каркищенко В. Н., Каркищенко Н. Н., Шустов Е. Б., Берзин И. А., Фокин Ю. В., Алимкина О. В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой. *Биомедицина*. 2016; (4): 34–46.
 36. Banister EW, Cameron BJC. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med*. 1990; 11 (Suppl 2): S129–42. PubMed PMID: 2193891.
 37. Demura S, Yamada T, Yamaji S, Komatsu M, Morishita K. The effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on human growth hormone secretion after strength training. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010; 1 (1): 7–11.
 38. Оковитый С. В., Радько С. В., Краснова М. В. Экспериментальная оценка влияния L-орнитина L-аспартата на физическую работоспособность. *Лечебная физкультура и спортивная медицина*. 2017; 4 (142): 25–33.
 39. Родичкин П. В., Пономарев Г. Н., Пупков П. В., Орлов А. С. Оптимизация силовой подготовленности спортсменов с применением гепатопротекторов. *Теория и практика физической культуры*. 2019; (10): 89–91.
- ## References
1. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease — A global public health perspective. *J Hepatol*. 2018; 70 (3): 531–44. PubMed PMID: 30414863.
 2. Ivashkin VT, Mayevskaya MV, Pavlov ChS, Tikhonov IN, Shirokova YeN, Buyeverov AO, et al. Diagnostics and treatment of non-alcoholic fatty liver disease: clinical guidelines of the Russian Scientific Liver Society and the Russian gastroenterological association. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2016; 26 (2): 24–42.
 3. Moretti R, Caruso P, Gazzin S. Non-alcoholic fatty liver disease and neurological defects. *Ann Hepatol*. 2019; 18 (4): 563–570. PubMed PMID: 31080056.
 4. Newton JL. Systemic Symptoms in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis*. 2010; 28 (1): 214–9. PubMed PMID: 20460914.
 5. Weinstein G, Davis-Plourde K, Himali JJ, Zelber-Sagi S, Beiser AS, Seshadri S. Non-alcoholic fatty liver disease, liver fibrosis score and cognitive function in middle-aged adults: The Framingham Study. *Liver Int*. 2019; 39 (9): 1713–21. PubMed PMID: 31155826.
 6. Youssef NA, Abdelmalek MF, Binks M, Guy CD, Omenetti A, Smith AD, et al. Associations of depression, anxiety and antidepressants with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2013; 33 (7): 1062–70. PubMed PMID: 23560860.
 7. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018; 67 (1): 328–57.
 8. Dudarenko SV, Kovalenko AL, Prokopenko SM, Belogurova EV. The use of remaxol in the treatment of metabolic syndrome in patients with nonalcoholic steatohepatitis and diabetes mellitus 2 type. *Experimental & Clinical Gastroenterology*. 2016; 130 (6): 89–94.
 9. Mayevskaya MV, Ivashkin VT, Lunkov VD, Kryzhanovskiy SP, Pirogova IYu, Pavlov CS et al. Antioxidants in the treatment of chronic diffuse liver diseases (the results of the “MAXAR” observational program). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2018; 28 (5): 77–97.
 10. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013; 56 (5): 1129–39. PubMed PMID: 23423668.
 11. Almeida-Suhett CP, Graham A, Chen Y, Deuster P. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiol Behav*. 2017; 169: 130–40. PubMed PMID: 27876639.
 12. Tsuchida T, Lee AY, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, et al. A simple diet- and chemical-induced murine nash model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol*. 2018; 69 (2): 385–95. PubMed PMID: 29572095.
 13. Pitts MW. Barnes maze procedure for spatial learning and memory in mice. *Bio Protoc* [Internet]. 2018 Mar [cited 2020 May 01]; 8 (5): e2744. Available from: <https://bio-protocol.org/e2744>.
 14. Karkishchenko NN, Karkishchenko VN, Shustov EB, Berzin IA, Kapanadze GD, Fokin YuV et al. Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie lekarstvennykh sredstv, vliyayushchikh na fizicheskuyu rabotosposobnost'. Metodicheskie rekomendatsii. M.: Nauchnyy tsentr biomeditsinskikh tekhnologii Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva, 2017; 134 p. Russian.
 15. Radko SV, Gusev KA, Krasnova MV, Okovityy SV, inventors; Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University (SPCPU), assignee. *Ustroystvo dlya krepleniya gruzov k melkim laboratornym zhivotnym*. Russian Federation patent № 172475. 07.11.2017. Russian.
 16. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratzliff V et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64 (6): 1388–402. PubMed PMID: 27062661.
 17. Diaz-Moran S, Estanislau C, Canete T, Blazquez G, Raez A, Tobena A et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: focus on freezing and grooming. *World J Neurosci*. 2014; 4: 1–11.
 18. Eudave DM, BeLow NM, Flandreau EI. Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice. *Neurobiol Stress*. 2018; 9: 1–8. PubMed PMID: 30003122.
 19. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013; 6 (3): 126–35. PubMed PMID: 24678249.
 20. Aduema W, Osim EE, Nwankwo AA. Using the elevated plus maze task in assessing anxiety and fear in swiss white mice. *J Complement Med Alt Healthcare* [Internet]. 2018 Apr [cited 2020 May 01]; 6 (1): 555678. Available from: <https://juniperpublishers.com/jcmah/JCMAH.MS.ID.555678.php>.
 21. Bakhtiyarova ShK, Kapysheva UN, Ablaykhanova NT, Baimbetova AK, Zhaksymov BI, Korganbaeva AA, et al. Povedenie zhivotnykh v razlichnykh testakh. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2017; (8): 92–96. Russian.
 22. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989; 32 (3): 777–85. PubMed PMID: 2740429.
 23. Strekalova T, Evans M, Costa-Nunes J, Bachurin S, Yeritsyan N, Couch Y, et al. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain Behav Immun*. 2015; 48: 42–7. PubMed PMID: 25712260.
 24. Zemdegis J, Quesseveur G, Jarriault D, Penicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol*. 2016; 173 (13): 2095–110. PubMed PMID: 26472268.
 25. Kalueff AV, Keisala T, Minasyan A, Kuuslahti M, Tuohimaa P. Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. *Behav Processes*. 2006; 72 (1): 104–12. PubMed PMID: 16442749.
 26. Kalueff AV, Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc*.

- 2004; 13 (3): 151–8. PubMed PMID: 15296852.
27. Hayden MR, Grant DG, Aroor AR, DeMarco VG. Empagliflozin ameliorates type 2 diabetes-induced ultrastructural remodeling of the neurovascular unit and neuroglia in the female db/db mouse. *Brain Sci* [Internet]. 2019 Mar [cited 2020 May 01]; 9 (3): 57. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/9/3/57>. PubMed PMID: 30866531.
 28. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014; 13: 148. PubMed PMID: 25344694.
 29. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2 (2): 322–8. PubMed PMID: 17406592.
 30. Ross AP, Bruggeman EC, Kasumu AW, Mielke JG, Parent MB. Non-alcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats. *Physiol Behav*. 2012; 106 (2): 133–41. PubMed PMID: 22280920.
 31. Filipovic B, Markovic O, Duric V, Filipovic B. Cognitive changes and brain volume reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2020 May 01]; 2018: 9638797. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cjgh/2018/9638797/>. PubMed PMID: 29682494.
 32. Petta S, Tuttolomondo A, Gagliardo C, Zafonte R, Brancatelli, Cabibi D, et al. The presence of white matter lesions is associated with the fibrosis severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 Apr [cited 2020 May 01]; 95 (16): e3446. Available from: https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2016/04190/The_Presence_of_White_Matter_Lesions_Is_Associated.35.aspx. PubMed PMID: 27100443.
 33. Okovity SV, Shustov EB, Belyh MA, Kirillova NV, Spasenkova OM, Ivanov AG, et al. Modeling of non-alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals. *Biomedicine*. 2018; (4): 29–43.
 34. Sugino T, Shiri T, Kajimoto Y, Kajimoto O. L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res*. 2008; 28 (11): 738–43. PubMed PMID: 19083482.
 35. Karkischenko VN, Karkischenko NN, Shustov EB, Berzin IA, Fokin YuV, Alimkina OV. Features interpretation of laboratory animal health indicators in swimming tests with load. *Biomedicine*. 2016; (4): 34–46.
 36. Banister EW, Cameron BJC. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int J Sports Med*. 1990; 11 (Suppl 2): S129–42. PubMed PMID: 2193891.
 37. Demura S, Yamada T, Yamaji S, Komatsu M, Morishita K. The effect of L-ornithine hydrochloride ingestion on human growth hormone secretion after strength training. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010; 1 (1): 7–11.
 38. Okovity SV, Radko SV, Krasnova MV. Experimental assessment of influence of L-ornithine-L-aspartate on physical performance. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina*. 2017; 4 (142): 25–33.
 39. Rodichkin PV, Ponomarev GN, Pupkov PV, Orlov AS. Hepatoprotectors to build strength in athletes. *Theory and Practice of Physical Culture*. 2019; (10): 89–91.

ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ ПРИ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ И БОЛЕЗНИ КРОНА

М. В. Осиков¹✉, Е. В. Давыдова¹, М. С. Бойко¹, А. Е. Бакеева¹, Н. В. Кайгородцева¹, И. Р. Галеева¹, А. А. Федосов², М. А. Ильиных¹, Л. В. Воргова¹¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Изучение особенностей накопления продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) и липидов в кишечнике при болезни Крона (БК) и язвенном колите (ЯК) может иметь значение в патогенезе, диагностике и терапии этих заболеваний. Целью работы было изучить особенности свободно-радикального окисления (СРО) в толстом кишечнике, связь с клиническими симптомами при БК и ЯК. Для моделирования БК крысам Wistar вводили тринитробензолсульфат, для ЯК — оксазолон. Клинический статус оценивали по Disease activity index (DAI). В толстом кишечнике определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гептановой и изопропанольной фазах, продукты ОМБ в спонтанном и металл-зависимом режимах. При БК и ЯК на 3-и и 7-е сутки увеличивается DAI ($Me(Q_{25}-Q_{75})$: 7 (3–7) при БК на 3-и и 7-е сутки одинаково; 11 (11–11) и 11 (9–11) при ЯК на 3-и и 7-е сутки соответственно), в толстом кишечнике повышается количество первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, суммарное количество продуктов ОМБ, при БК на 7-е сутки увеличивается доля вторичных продуктов ОМБ основного характера. Особенности СРО: при ЯК — накопление продуктов ПОЛ, при БК — продуктов ОМБ; при ЯК прежде всего накапливаются конечные продукты ПОЛ в гептановой фазе и вторичные продукты в изопропанольной; при БК — вторичные продукты ОМБ основного характера. При БК и ЯК установлена ассоциация DAI с содержанием продуктов ПОЛ преимущественно в изопропанольной фазе, продуктов ОМБ в спонтанном режиме; наибольшее количество сильных связей зафиксировано при ЯК. По результатам исследования, роль изменений СРО в патогенезе БК и ЯК гораздо больше, что является предпосылкой для обозначения продуктов ПОЛ и ОМБ как диагностических маркеров, показателей эффективности терапии.

Ключевые слова: окислительный стресс, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, кишечник, язвенный колит, болезнь Крона

Вклад авторов: М. В. Осиков — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание и редактирование рукописи; Е. В. Давыдова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста; М. С. Бойко, А. Е. Бакеева, Н. В. Кайгородцева, И. Р. Галеева — сбор экспериментального материала, статистическая обработка и анализ полученных данных; А. А. Федосов — анализ результатов, написание и редактирование рукописи; М. А. Ильиных, Л. В. Воргова — анализ результатов, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ЮУГМУ г. Челябинск (протокол № 11 от 27 декабря 2017 г., протокол № 1 от 22 января 2020 г.). Эксперимент выполнен в стандартных условиях вивария ЮУГМУ при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, выводы из эксперимента и утилизации в соответствии с Европейской конвенцией (ETS № 123 от 18.03.1986 г.).

✉ Для корреспонденции: Михаил Владимирович Осиков
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092; prof.osikov@yandex.ru

Статья получена: 18.04.2020 Статья принята к печати: 04.05.2020 Опубликована онлайн: 08.05.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027

ASPECTS OF FREE RADICAL OXIDATION IN THE LARGE BOWEL IN ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE

Osikov MV¹✉, Davydova EV¹, Boyko MS¹, Bakeeva AE¹, Kaygorodtseva NV¹, Galeeva IR¹, Fedosov AA², Ilyinyh MA¹, Vorgova LV¹¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Research into the accumulation patterns of protein oxidative modification (POM) products and lipids in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) could have important implications for understanding the pathogenesis and improving the diagnosis and therapy for these diseases. The aim of this study was to investigate the aspects of free radical oxidation (FRO) in the large bowel and their possible correlations with clinical symptoms of UC and CD. In the Wistar rat model used in the experiment, CD was induced with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, and UC was induced with oxazolone. Clinical status was assessed using the Disease activity index (DAI). Lipid peroxidation (LPO) products were measured in the heptane and isopropanol phases of the intestinal mucosa extract. POM products were measured following spontaneous and stimulated oxidation. The DAI ($Me(Q_{25}-Q_{75})$) was increased in both CD and UC on days 3 and 7 of the experiment: for CD, it was equally increased on days 3 and 7 (7 (3–7)) and was 11 (11–11) and 11 (9–11) for UC on days 3 and 7, respectively. The amount of primary, secondary and end LPO products in the heptane and isopropanol phases, as well as the total amount of POM products, was increased in the homogenized mucosa of the large bowel. In the CD group, the relative content of secondary basic POM products was increased on day 7 of the experiment. The following patterns of FRO were revealed: accumulation of LPO products in the UC group and accumulation of POM products in the CD group; UC is characterized by the accumulation of mostly LPO products in the heptane phase and secondary LPO products in the isopropanol phase; CD is characterized by the accumulation of secondary basic POM products. DAI scores were correlated with the amount of LPO products in the isopropanol phase and the amount of POM products in the spontaneous oxidation mode. The highest number of strong correlations was observed in the UC group. Our findings suggest a very serious contribution of FRO changes to the pathogenesis of UC and CD, meaning that LPO and POM products could be regarded as diagnostic markers and indicators of treatment efficacy.

Keywords: oxidative stress, lipid peroxidation, protein oxidative modification, large bowel, ulcerative colitis, Crohn's disease

Author contribution: Osikov MV conceived and designed the study, analyzed the experimental data and contributed to writing the manuscript; Davydova EV conceived and designed the study, analyzed the experimental data and contributed to writing the manuscript; Boyko MS, Bakeeva AE, Kaygorodtseva NV, Galeeva IR collected the samples, performed statistical analysis and data interpretation; Fedosov AA analyzed the experimental data and contributed to writing the manuscript; Ilyinyh MA, Vorgova LV analyzed the experimental data and contributed to writing the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript for publication.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of South Ural State Medical University, Chelyabinsk (Protocol No. 11 dated December 27, 2017; Protocol № 1 dated January 22, 2020). The experiment was carried out under standard vivarium conditions in strict compliance with the guidelines on the care and use of animals for scientific purposes provided in the European Convention (ETS № 123 dated March 18, 1986, Strasbourg), European Commission Recommendation 2007/526/EC dated June 18, 2007, and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and European Council dated September 22, 2010.

✉ Correspondence should be addressed: Mikhail V. Osikov
Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092; prof.osikov@yandex.ru

Received: 18.04.2020 Accepted: 04.05.2020 Published online: 08.05.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.027

В мире и, в частности, РФ число заболеваний органов пищеварения удваивается каждое десятилетие, что представляет собой глобальную медико-социальную проблему [1]. Несмотря на широкую вариабельность эпидемиологических данных рост заболеваемости язвенным колитом (ЯК) и болезнью Крона (БК), в том числе среди молодых социально активных и трудоспособных лиц, констатируют многие авторы [2, 3]. Повсеместно регистрируется увеличение количества больных с ЯК и БК, заболеваемость составляет 3–62 и 50–70 случаев на 100 тыс. населения в год соответственно [4]. Только в США около 1,6 млн человек страдают от ЯК и БК [5, 6]. Серьезную проблему при ЯК и БК составляет широкий спектр кишечных и внекишечных осложнений, увеличивающих финансовые затраты на госпитализацию, хирургическое и амбулаторное лечение.

Патогенез ЯК и БК до конца не ясен прежде всего в связи с широким спектром этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы при участии Th1-, Th2-зависимого иммунного ответа, изменения баланса Th17/T_{reg} [7]. При ЯК и БК наряду с цитокинами, ферментами, иммуноглобулинами и другими факторами в запуске и поддержании воспалительного процесса в стенке кишечника имеют значение активные формы кислорода (АФК) и азота, генерируемые активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами, эпителиоцитами в условиях дефицита факторов антиокислительной защиты [8–10]. АФК и активные формы азота, продукты их взаимодействия с белками и липидами могут выступать в роли маркеров повреждения тканей кишечника, отражающих тяжесть течения заболевания и эффективность проводимой терапии, а также служить мишенями при поиске новых персонализированных терапевтических и профилактических подходов к регуляции локального редокс-статуса в толстом кишечнике при БК и ЯК [11–13]. В этом отношении представляет интерес изучение особенностей свободно-радикального окисления (СРО) и взаимосвязи показателей редокс-статуса в очаге повреждения кишечника и тяжести клинических проявлений при ЯК и БК.

Целью исследования было изучить особенности СРО в толстом кишечнике, его связь с клиническими проявлениями при ЯК и БК в эксперименте *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 35 крысах-самцах линии Wistar массой 200–230 г. Животные были случайным образом разделены на три группы: группа 1 ($n = 7$) — интактный контроль; группа 2 ($n = 14$) — животные с БК; группа 3 ($n = 14$) — животные с ЯК. Для моделирования БК 30 мг тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) (Sigma-aldrich; США) растворяли в 150 мл 50%-го этанола, 0,2–0,3 мл в зависимости от массы тела полученного раствора вводили *per rectum* через полиуретановый катетер (ОАО «Синтез»; Россия) диаметром 2 мм на глубину 8 см [14]. ЯК моделировали двухэтапным введением оксазолона (Sigma-aldrich; США): на первом этапе проводили накожную сенсibilлизацию нанесением на межлопаточную область 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона, на втором этапе ректально на глубину 7–8 см вводили 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона [15]. Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. БК и ЯК верифицировали по клинической картине и морфологии очага повреждения в кишечнике. Исследования проводили на 3-и и 7-е сутки. Клинический статус оценивали ежедневно в баллах по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для крыс [16, 17]. Показатели параметров представлены в (табл. 1). Под параметром «жидкий стул» понимали несформированные каловые массы с консистенцией пасты или жидкие. Под термином «диарея» понимали отсутствие оформленного стула с частотой дефекаций более трех раз в сутки. Ректальное кровотечение определяли как присутствие свежей крови на шерсти вокруг ануса и в каловых массах. Наличие скрытой крови в каловых массах определяли с помощью бензидиновой реакции.

Для приготовления 10%-го гомогената слизистой оболочки толстого кишечника проксимальную часть ободочной кишки извлекали из брюшной полости, помещали в охлажденный 0,1 М раствор фосфатного буфера (рН 7,4), после чего около 100 мг ткани гомогенизировали в стеклянном механическом гомогенизаторе в соотношении 1 : 10 в течение 3 мин при температуре не выше 4 °С с последующим получением 1 мл гомогената. Содержание продуктов перексидного окисления

Таблица 1. Параметры для определения индекса активности болезни (DAI)

Параметр	Балл	Описание
Потеря массы тела	0	Нет потери
	1	1–5%
	2	6–10%
	3	11–20%
	4	Более 20%
Консистенция стула	0	Нормальный стул
	2	Неоформленный стул
	4	Диарея
Ректальное кровотечение	0	Нет крови в фекалиях
	1	Позитивная бензидиновая проба в фекалиях
	2	Позитивная бензидиновая проба в фекалиях и визуальное определение крови в фекалиях
	4	Ректальное кровотечение, кровь вокруг ануса

липидов (ПОЛ) в гомогенате определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО-Спектр»; Санкт-Петербург) по методике Волчегорского И. А. и соавт. [18, 19]. В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов — ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов — КД и СТ), 400 нм (основания Шиффа — ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 (ДК), E278/E220 (КД и СТ) и E400/E220 (ШО). Продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в гомогенате определяли по реакции карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином в спонтанном и металл-зависимом по реакции Фентона режимах с последующей регистрацией на спектрофотометре альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНДФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНДФГ) в ультрафиолетовой части спектра и области видимого света [20, 21]. Результат выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка (у.е./мг) или в относительных величинах (%). Резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали путем отношения продуктов спонтанного окисления к индуцированному. Результаты обрабатывали с помощью программы IBM SPSS Statistics 19 («SPSS: An IBM Company»; США). Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q₁–Q₃]. Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскелла–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При экспериментальной БК, начиная с 3-х суток наблюдения, у животных были зафиксированы увеличение частоты дефекации, изменение консистенции кала, кровь в каловых массах; на 7-е сутки наблюдения к указанным признакам добавились снижение массы тела и увеличение выраженности симптомов, что нашло отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI на 3-и и 7-е сутки эксперимента (табл. 2). Кроме того, было отмечено снижение двигательной активности животных. В динамике БК значение DAI на 7-е сутки статистически значимо превышало значения на 3-и сутки ($p < 0,05$). В липидном экстракте слизистой оболочки толстого кишечника при БК изменяется содержание продуктов ПОЛ (табл. 3). Так, на 3-и сутки увеличивается в гептановой фазе количество первичных и вторичных продуктов, в изопропанольной фазе — первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. На 7-е сутки в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. В динамике БК в изопропанольной фазе содержание первичных и конечных продуктов ПОЛ нарастает от 3-х к 7-м суткам ($p < 0,01$). Далее при экспериментальной БК

нами была проведена оценка содержания продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах в гомогенате толстого кишечника (табл. 3).

Обнаружено, что на 3-и и 7-е сутки эксперимента увеличивается суммарное количество карбонильных производных белков — необратимых продуктов окислительного стресса, формирующихся за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия продуктов пероксидного окисления липидов и редуцирующих сахаров. В динамике БК суммарное содержание продуктов ОМБ возрастает на 7-е сутки по сравнению с 3-ми сутками наблюдения ($p < 0,01$). Анализ относительного содержания компонентов ОМБ выявил, что на 7-е сутки БК снижается доля первичных продуктов — альдегидов и увеличивается доля вторичных продуктов — кетонов. Поскольку в области УФ-спектра накапливаются карбонильные производные нейтрального характера, а в видимой — основного характера, относительный анализ суммарного содержания карбонильных в области УФ-света и в области видимого света позволяет оценить природу образовавшихся продуктов в динамике БК. Так, на 3-и сутки БК относительное содержание продуктов ОМБ основного и нейтрального характера не отличается от группы интактных животных. На 7-е сутки эксперимента зафиксировано смещение спектра в сторону образования продуктов ОМБ основного характера, о чем свидетельствуют снижение суммарного относительного содержания продуктов в области УФ-спектра и повышение суммарного относительного содержания продуктов в области видимого света. Проведена оценка резервно-адаптационного потенциала в гомогенате толстого кишечника при экспериментальной БК путем подсчета отношения общего содержания продуктов ОМБ в спонтанном режиме и металл-индуцированном. Для этого исследовано содержание продуктов ОМБ в гомогенате толстого кишечника после индукции окисления белков компонентами реакционной смеси, включающей Fe²⁺ и H₂O₂, что сопровождается образованием высокоректогенного радикала OH — в реакции Фентона. Обнаружено, что суммарное содержание продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме в гомогенате толстого кишечника повышается на 3-и и 7-е сутки экспериментальной БК, на 3-и сутки относительное содержание первичных и вторичных продуктов ОМБ основного и нейтрального характера не отличается от группы интактных животных, на 7-е сутки снижается доля альдегидов нейтрального характера и увеличивается доля кетонов основного. Как видно, изменения показателей ОМБ в металл-индуцированном режиме по своей направленности соответствуют изменениям показателей ОМБ в спонтанном режиме. Общий резервно-адаптационный потенциал значительно повысился на 3 сутки экспериментальной БК, к 7-м суткам наблюдения — статистически значимо не отличался от группы интактных животных. Данное изменение резервно-адаптационного потенциала обусловлено на 3-и сутки повышением резервно-адаптационного потенциала АДНДФГ и КДНДФГ в области УФ-спектра и видимого спектра, но преимущественно — КДНДФГ, регистрируемых в области видимого спектра.

Таблица 2. Индекс активности болезни у крыс при ЯК и БК (Me (Q₂₅–Q₇₅))

Показатель	Группа 1 Интактные (n = 7)	3-и сутки эксперимента		7-е сутки эксперимента	
		Группа 2 БК (n = 7)	Группа 3 ЯК (n = 7)	Группа 2 БК (n = 7)	Группа 3 ЯК (n = 7)
DAI, у.е.	0	7 (3,00–7,00)*	7 (3,00–7,00)*	11 (11,00–11,00)*	11 (9,00–11,00)*

При экспериментальном ЯК у животных на 3-и сутки наблюдения снижается масса тела, увеличивается число дефекаций, консистенция кала становится жидкой, появляется кровь, определяемая как визуально, так и с проведением бензидиновой пробы, на 7-е сутки выраженность клинических признаков возрастает, что отражается в статистически значимом увеличении индекса DAI (см. табл. 2). В динамике ЯК значение DAI на 7-е сутки статистически значимо превышает значения на 3-и сутки ($p < 0,05$). При оценке продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при ЯК на 3-и сутки зарегистрировано статистически значимое увеличение в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта уровня первичных, вторичных и конечных продуктов (табл. 3). На 7-е сутки ЯК обнаружены аналогичные изменения: статистически значимое увеличение в гептановой и в

изопропанольной фазах первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. В динамике экспериментального ЯК содержание в изопропанольной фазе первичных, вторичных продуктов ПОЛ снижается от 3-х к 7-м суткам ($p < 0,01$).

При экспериментальном ЯК в слизистой оболочке толстой кишки отмечено статистически значимое увеличение суммарного содержания ОМБ в спонтанном режиме на 3-и и 7-е сутки (см. табл. 3). При этом относительное количество АДНФГ снижается, а КДНФГ увеличивается на 3-и и 7-е сутки наблюдения, относительное количество карбонильных производных основного характера увеличивается, а нейтрального — снижается на 7-е сутки эксперимента, о чем свидетельствуют повышение суммарного относительного содержания продуктов ОМБ в области видимого света, снижение — в УФ-области. Анализ

Таблица 3. Содержание маркеров СРО в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника у крыс при ЯК и БК ($Q_{25}-Q_{75}$)

Показатели	Группа 1	3-и сутки эксперимента		7-е сутки эксперимента	
	Интактные	Группа 2	Группа 3	Группа 2	Группа 3
	($n = 7$)	БК ($n = 7$)	ЯК ($n = 7$)	БК ($n = 7$)	ЯК ($n = 7$)
ДК (г), е.и.о.	0,63 (0,55–0,65)	0,79 (0,79–0,81)*	0,79 (0,75–0,81)*	0,75 (0,74–0,81)*	0,76 (0,75–0,77)*
КДиСТ (г), е.и.о.	0,06 (0,05–0,06)	0,09 (0,06–0,09)*	0,08 (0,07–0,08)*	0,07 (0,06–0,09)	0,09 (0,09–0,11)*#
ШО (г), е.и.о.	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,01)	0,03 (0,02–0,04)*#	0,03 (0,03–0,04)*	0,05 (0,04–0,06)*#
ДК (и), е.и.о.	0,34 (0,32–0,36)	0,38 (0,38–0,45)*	0,38 (0,33–0,43)*	0,43 (0,41–0,45)*	0,43 (0,43–0,45)*
КДиСТ (и), е.и.о.	0,31 (0,29–0,32)	0,61 (0,61–0,71)*	0,72 (0,56–0,91)*#	0,51 (0,51–0,55)*	0,58 (0,57–0,59)*#
ШО (и), е.и.о.	0,01 (0,01–0,02)	0,08 (0,08–0,11)*	0,07 (0,07–0,09)*	0,14 (0,12–0,14)*	0,11 (0,11–0,14)*
S ОМБ спонт., у.е./мг	141,86 (136,04–166,74)	324,21 (313,48–340,93)*	194,91 (182,07–201,07)*#	392,31 (272,17–497,71)*	343,48 (332,13–358,22)*#
АДНФГ, спонт.	93,71 (93,69–93,71)	92,59 (91,61–93,41)	91,79 (91,48–91,98)*	89,13 (88,99–90,02)*	90,71 (90,69–90,71)*
КДНФГ, % спонт., %	6,29 (6,09–6,31)	7,41 (6,59–8,38)	8,51 (8,21–9,44)*#	11,02 (10,93–11,12)*	10,58 (10,31–11,34)*
uv, спонт., %	96,57 (96,41–96,58)	95,57 (95,27–96,01)	95,32 (95,29–95,74)	92,88 (92,72–93,59)*	94,58 (94,23–95,21)*#
vs, спонт., %	3,42 (3,41–3,59)	4,42 (3,99–4,72)	4,71 (4,67–5,85)	7,11 (6,41–7,27)*	5,76 (5,41–6,77)*#
S ОМБ индуц., у.е./мг	266,76 (256,21–280,81)	380,93 (373,56–427,51)*	321,71 (284,89–377,77)*#	662,05 (643,29–690,09)*	544,66 (479,92–600,42)*#
АДНФГ индуц., %	86,94 (85,98–88,02)	89,34 (89,03–90,07)	83,13 (82,89–85,89)*#	81,15 (81,01–83,48)*	83,07 (82,62–87,41)*
КДНФГ индуц., %	13,05 (11,97–14,01)	10,65 (9,92–10,96)	16,86 (14,11–17,11)*#	18,84 (16,51–18,99)*	16,92 (12,58–17,37)*
uv, индуц., %	88,99 (88,99–90,83)	91,91 (91,27–92,31)	85,67 (85,44–85,44)*#	84,52 (83,91–86,37)*	86,13 (85,01–89,91)
vs, индуц., %	11,01 (9,16–11,01)	8,09 (7,69–8,72)	14,32 (12,19–14,55)*#	15,47 (13,62–16,08)*	13,89 (10,09–14,98)
РАП, %	54,71 (51,53–56,71)	80,25 (74,89–87,87)*	49,51 (46,77–51,14)*#	57,15 (50,11–59,71)	42,31 (28,17–47,78)*#

Примечание: * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1, # — с группой 2. Показатели отражают содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта гомогената слизистой оболочки толстого кишечника.

Таблица 4. Корреляция между индексом активности болезни (DAI, у.е.) и показателями СРО у крыс при ЯК и БК

Показатели	3-и сутки эксперимента		7-е сутки эксперимента	
	Группа 2	Группа 3	Группа 2	Группа 3
	БК (<i>n</i> = 7)	ЯК (<i>n</i> = 7)	БК (<i>n</i> = 7)	ЯК (<i>n</i> = 7)
ДК (г), е.и.о.	<i>R</i> = 0,15	<i>R</i> = 0,58	<i>R</i> = 0,43	<i>R</i> = 0,72
КДиСТ (г), е.и.о.	<i>R</i> = 0,51	<i>R</i> = 0,82	<i>R</i> = 0,32	<i>R</i> = 0,66
ШО (г), е.и.о.	<i>R</i> = 0,13	<i>R</i> = 0,17	<i>R</i> = 0,43	<i>R</i> = 0,88
ДК (и), е.и.о.	<i>R</i> = 0,27	<i>R</i> = 0,75	<i>R</i> = 0,51	<i>R</i> = 0,92
КДиСТ (и), е.и.о.	<i>R</i> = 0,64	<i>R</i> = 0,76	<i>R</i> = 0,51	<i>R</i> = 0,88
ШО (и), е.и.о.	<i>R</i> = 0,32	<i>R</i> = 0,31	<i>R</i> = 0,67	<i>R</i> = 0,72
S ОМБ спонт., у.е./мг	<i>R</i> = 0,69	<i>R</i> = 0,77	<i>R</i> = 0,83	<i>R</i> = 0,89
S ОМБ инд., у.е./мг	<i>R</i> = 0,41	<i>R</i> = 0,85	<i>R</i> = 0,63	<i>R</i> = 0,81

Примечание: полужирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,05$) связи.

содержания при экспериментальном ЯК продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме показал повышение на 3-и и 7-е сутки суммарного количества продуктов ОМБ. Относительное количество АДНФГ снижается, а относительное количество КДНФГ увеличивается на 3-и и 7-е сутки эксперимента. Выявлено преимущественное повышение суммарного относительного содержания продуктов ОМБ в области видимого света на 3-и сутки наблюдения, что указывает на смещение спектра продуктов ОМБ в сторону образования АДНФГ и КДНФГ основного характера. Общий резервно-адаптационный потенциал статистически значимо снижался на 3-и и 7-е сутки экспериментального ЯК.

При проведении корреляционного анализа установлены ассоциации между интегральным показателем клинического статуса DAI и содержанием продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника (табл. 4). На 3-и сутки эксперимента ассоциации представлены при БК средней силы связями DAI с содержанием вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, суммарным количеством продуктов ОМБ в спонтанном режиме, при ЯК — сильными связями DAI с содержанием вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, первичных и вторичных продуктов в изопропанольной фазе, суммарным количеством продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах. На 7-е сутки эксперимента ассоциации представлены при БК связями DAI с содержанием первичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, суммарным количеством продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах. Наибольшее количество сильных связей было выявлено при ЯК: из 12 связей 10 сильных, в то время как при БК из 9 связей обнаружена только одна сильная.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При экспериментальном моделировании БК и ЯК наблюдаемая клиническая картина характерна для этих заболеваний, что позволяет применять представленные модели с использованием ТНБС и оксазолона для

изучения патогенеза изменений гомеостаза. Потеря веса у крыс в среднем не превышала 10%, принято считать, что она обусловлена как диареей, так и системным воспалительным ответом, в частности анорексигенным эффектом некоторых провоспалительных цитокинов [22]. Полагают, что ТНБС выступает в роли гаптена и индуцирует после ректального введения Th1-зависимый иммунный ответ с участием различных провоспалительных цитокинов и медиаторов против гаптен-модифицированных аутологических белков (антигенов) в стенке толстого кишечника или белков кишечной микробиоты, что приводит к трансмуральной инфильтрации лейкоцитами и воспалению [23–25]. Оксазолон рассматривают в качестве гаптена, опосредующего Th2-зависимый иммунный ответ, характерный для ЯК, и большинство исследователей предпочитают его как наиболее востребованный агент при моделировании этого заболевания у крыс [26]. Используемый в качестве растворителя для ТНБС и оксазолона 50%-й раствор этилового спирта вызывает дополнительное повреждение слизистой оболочки толстого кишечника [27].

При экспериментальных БК и ЯК наряду со снижением массы тела, увеличением частоты и изменением консистенции стула, а также наличием крови в каловых массах, зафиксировано накопление продуктов ПОЛ в слизистой оболочке толстого кишечника. Такое накопление выявлено как в изопропанольной фазе липидного экстракта слизистой толстого кишечника, которая аккумулирует преимущественно фосфолипиды клеточных мембран, так и в гептановой фазе (в триацилглицеридах). Кроме того, обнаружено накопление продуктов ОМБ, преимущественно вторичных — КДНФГ и преимущественно основного характера в спонтанном и индуцированном режимах. Это позволяет говорить об аккумуляции поздних маркеров окислительной деструкции белка и преимущественно фрагментации белков под влиянием совместного действия радикалов OH^\cdot и O_2^\cdot [20, 28, 29]. Белковые фрагменты высокоустойчивы к протеолизу, имеют токсичные свойства и могут инициировать апоптоз или некроз клеток, расширяя зону вторичной альтерации [30]. Есть ряд особенностей СРО в толстом кишечнике при БК и ЯК в отношении окислительной деструкции липидов и белков. Во-первых, сравнительный анализ показывает, что на 3-и сутки эксперимента содержание конечных продуктов ПОЛ в гептановой фракции и вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фракции липидного экстракта толстого

кишечника, а также на 7-е сутки количество вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой фракции, количество вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фракции значимо выше у крыс с ЯК (см. табл. 3). Во-вторых, при сравнительной оценке продуктов ОМБ в гомогенате толстого кишечника выявлено, что при БК резервно-адаптационный потенциал и суммарное содержание продуктов ОМБ выше в спонтанном и индуцированном режимах на 3-и и 7-е сутки эксперимента. Кроме того, при сравнительной оценке относительного количества первичных и вторичных продуктов ОМБ основного и нейтрального характера видно, что при БК по сравнению с ЯК на 3-и сутки превалирует содержание первичных основного характера продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах, на 7-е сутки — содержание основного характера продуктов ОМБ в спонтанном режиме.

Полагаем, что эскалация оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами в очаге первичного повреждения в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиоксидантной защиты, приводит к дополнительному повреждению, дисфункции и гибели клеток толстого кишечника, расширению зоны вторичной альтерации и, как следствие, утяжелению симптомов в динамике БК и ЯК. По данным корреляционного анализа такое предположение подтверждено ассоциацией показателя клинического статуса DAI и содержания продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при БК и ЯК.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило выполнить поставленную цель и установить, что в динамике экспериментальных ТНБС-индуцированной БК и оксазолон-индуцированного ЯК на 3-и и 7-е сутки наблюдения увеличивается индекс клинической активности болезни, в толстом кишечнике повышается количество первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, повышается суммарное количество продуктов ОМБ, при БК на 7-е сутки увеличивается доля вторичных продуктов ОМБ основного характера. Особенности СРО при ЯК выступают преимущественное накопление продуктов ПОЛ, при БК — продуктов ОМБ; при ЯК прежде всего накапливаются конечные продукты ПОЛ в гептановой фазе и вторичные продукты в изопропанольной фазе липидного экстракта; при БК — вторичные продукты ОМБ основного характера. При БК и ЯК установлена ассоциация индекса клинической активности болезни и содержания продуктов ПОЛ преимущественно в изопропанольной фазе, продуктов ОМБ в спонтанном режиме; наибольшее количество сильных связей зафиксировано при ЯК. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли изменений редокс-статуса в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению СРО в толстом кишечнике в клинических условиях у больных БК и ЯК для обозначения продуктов ПОЛ и ОМБ в качестве диагностических маркеров заболевания, а также показателей эффективности проводимой терапии при купировании обострений и пролонгации ремиссии.

Литература

- Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunology Letters*. 2014; 161 (2): 231–35.
- Долгушина А. И., Хусаинова Г. М., Василенко Г. М., Кононенко А. Г. Распространенность воспалительных заболеваний кишечника в Челябинской области. *Альманах клинической медицины*. 2019; 47 (6): 511–17.
- Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015; 50 (8): 942–51.
- Su HJ, Chiu YT, Chiu CT, Lin YC, Wang CY, Hsieh JY, et al. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc*. 2019; 118 (7): 1083–92.
- Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018 Feb; 64 (2): 20–57.
- Ray G, Longworth MS. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019; 25 (2): 235–47.
- Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*. 2018; 16 (1): 26–42.
- Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 4535194.
- Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2019; 10 (276). URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00276/full> (дата обращения: 24.04.2020).
- Kiernan MG, Coffey JC, Sahebally SM, Tibbitts P, Lyons EM, O'Leary E, et al. Systemic molecular mediators of inflammation differentiate between Crohn's disease and ulcerative colitis, implicating threshold levels of IL10 and relative ratios of pro-inflammatory cytokines in therapy. *J Crohns Colitis*. 2020; 14 (1): 118–119.
- Assadsangabi A, Evans CA, Corfe BM, Lobo A. Application of Proteomics to Inflammatory Bowel Disease Research: Current Status and Future Perspectives. *Gastroenterol Res Pract*. 2019; 2019: 1426954.
- Titz B, Gadaleta RM, Lo Sasso G, Elamin A, Ekroos K, Ivanov NV, et al. Proteomics and Lipidomics in Inflammatory Bowel Disease Research: From Mechanistic Insights to Biomarker Identification. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9): 2775–96.
- Ashton JJ, Mossotto E, Ennis S. Personalising medicine in inflammatory bowel disease-current and future perspectives. *Transl Pediatr*. 2019; 8 (1): 56–69.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et. al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 3: 795–803.
- Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis Is Mediated by IL13-Producing NK-T Cells. *Immunity*. 2002; 17 (5): 629–38.
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et. al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993; 69 (2): 238–49.
- Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualised experiments*. 2012; 60 (60): 3678.
- Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников О. Л., Цейликман В. Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: ЧелГПУ, 2000; 167 с.
- Львовская, Е. И., Волчегорский И. А., Шемяков С. Е., Лифшиц Р. И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов ПОЛ. *Вопросы мед. химии*. 1991; 4: 92–93.

20. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса, 2006; 400 с.
21. Фомина М. А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. Рязань, 2014; 60 с.
22. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg (Lond)*. 2016; 11: 9–15.
23. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007; 2 (3): 541–6.
24. Bramhall M, Flórez-Vargas O, Stevens R, Brass A, Cruickshank S. Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21 (6): 1248–59.
25. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014; 18 (4): 279–88.
26. Weigmann B, Neurath MF. Oxazolone-induced colitis as a model of Th2 immune responses in the intestinal mucosa. *Methods Mol Biol*. 2016; 1422: 253–61.
27. Ikeda M, Takeshima F, Isomoto H, Shikuwa S, Mizuta Y, Ozono Y, et al. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2008; 53: 1869–75.
28. Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левинский Е. Л., Коваленко С. И., Павлов С. В., Ганчева О. В. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях. Современные проблемы токсикологии. 2005; 8 (3): 20–27.
29. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2005; 24: 55–99.
30. Муравлева Л. Е., Молотов-Лучанский В. Б., Ключев Д. А., Бакенова Р. А., Култанов Б. Ж., Танкибаева Н. А. и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. Фундаментальные исследования. 2010; 1: 74–78.

References

1. Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunology Letters*. 2014; 161 (2): 231–35.
2. Dolgushina AI, Husainova GM, Vasilenko GM, Kononenko AG. Rasprostranennost' vospalitel'nyh zabolevanij kishechnika v Chelyabinskoj oblasti. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2019; 47 (6): 511–17. Russian.
3. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015; 50 (8): 942–51.
4. Su HJ, Chiu YT, Chiu CT, Lin YC, Wang CY, Hsieh JY, et al. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc*. 2019; 118 (7): 1083–92.
5. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018 Feb; 64 (2): 20–57.
6. Ray G, Longworth MS. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019; 25 (2): 235–47.
7. Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*. 2018; 16 (1): 26–42.
8. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 4535194.
9. Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2019; 10 (276). URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00276/full> (дата обращения: 24.04.2020).
10. Kiernan MG, Coffey JC, Sahebally SM, Tibbitts P, Lyons EM, O'Leary E, et al. Systemic molecular mediators of inflammation differentiate between Crohn's disease and ulcerative colitis, implicating threshold levels of IL10 and relative ratios of pro-inflammatory cytokines in therapy. *J Crohns Colitis*. 2020; 14 (1): 118–119.
11. Assadsangabi A, Evans CA, Corfe BM, Lobo A. Application of Proteomics to Inflammatory Bowel Disease Research: Current Status and Future Perspectives. *Gastroenterol Res Pract*. 2019; 2019: 1426954.
12. Titz B, Gadaleta RM, Lo Sasso G, Elamin A, Ekroos K, Ivanov NV, et al. Proteomics and Lipidomics in Inflammatory Bowel Disease Research: From Mechanistic Insights to Biomarker Identification. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (9): 2775–96.
13. Ashton JJ, Mossotto E, Ennis S. Personalising medicine in inflammatory bowel disease-current and future perspectives. *Transl Pediatr*. 2019; 8 (1): 56–69.
14. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 3: 795–803.
15. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis Is Mediated by IL13-Producing NK-T Cells. *Immunity*. 2002; 17 (5): 629–38.
16. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993; 69 (2): 238–49.
17. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualised experiments*. 2012; 60 (60): 3678.
18. Volchegorskij IA, Dolgushin II, Kolesnikov OL, Cejlikman VJe. Jeksperimental'noe modelirovanie i laboratornaja ocenka adaptivnyh reakcij organizma. *Cheljabinsk: ChelGPU*, 2000; 167 s. Russian.
19. Lvovskaya, EI, Volchegorskij IA, Shemyakov SE, Lifshic RI. Spektrofotometricheskoe opredelenie konechnykh produktov POL. *Voprosy med. himii*. 1991; 4: 92–93. Russian.
20. Dubinina EE. Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie). *Fiziologicheskie i kliniko-biohimicheskie aspekty*. SPb.: Medicinskaya pressa, 2006; 400 s. Russian.
21. Fomina MA. Sposob kompleksnoj ocenki soderzhaniya produktov oksiditel'noj modifikacii belkov v tkanyah i biologicheskikh zhidkostyah: metodicheskie rekomendacii. *Ryazan'*, 2014; 60 s. Russian.
22. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg (Lond)*. 2016; 11: 9–15.
23. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007; 2 (3): 541–6.
24. Bramhall M, Flórez-Vargas O, Stevens R, Brass A, Cruickshank S. Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21 (6): 1248–59.
25. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014; 18 (4): 279–88.
26. Weigmann B, Neurath MF. Oxazolone-induced colitis as a model of Th2 immune responses in the intestinal mucosa. *Methods Mol Biol*. 2016; 1422: 253–61.
27. Ikeda M, Takeshima F, Isomoto H, Shikuwa S, Mizuta Y, Ozono Y, et al. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2008; 53: 1869–75.
28. Gubskij Yul, Belenichev IF, Levinskij EL, Kovalenko SI, Pavlov SV, Gancheva OV, i dr. Toksikologicheskie posledstviya oksiditel'noj modifikacii belkov pri razlichnyh patologicheskikh sostoyaniyah. *Sovremennye problemy toksikologii*. 2005; 8 (3): 20–27.

29. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2005; 24: 55–99.
30. Muravleva LE, Molotov-Luchanskij VB, Klyuev DA, Bakenova RA, Kultanov BZH, Tankibaeva NA, i dr. Okislitel'naya modifikaciya belkov: problemy i perspektivy issledovaniya. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2010; 1: 74–78. Russian.

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОСТРЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

В. И. Вечорко, В. Д. Аносов, Б. В. Силаев ✉

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

Экстренная хирургическая помощь в условиях инфекционного стационара — актуальная проблема во время пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19. Городская клиническая больница № 15 имени О. М. Филатова оказывает экстренную хирургическую помощь в условиях перепрофилирования с 27 марта 2020 г. по настоящее время. Специалистами больницы накоплен большой практический опыт: в апреле 2020 г. выполнено 194, а в мае — 289 оперативных пособий. В статье представлен опыт работы экстренной хирургической службы на этапе перепрофилирования в инфекционный стационар. Среди всех госпитализированных пациентов 482 (5,29%) имели острую хирургическую патологию, потребовавшую экстренного оперативного вмешательства. У 472 (98%) экстренно прооперированных пациентов присутствовала вызванная COVID-19 внебольничная пневмония разной степени тяжести. В статье рассмотрены некоторые особенности острой хирургической патологии и осложнения, встречающиеся у пациентов с COVID-19. Особенности хирургической помощи в перепрофилированном стационаре — это строгое соблюдение эпидемиологического режима, минимизация численности персонала в операционной, возможная минимизация числа оперативных пособий и сокращение их длительности. Наиболее важной задачей в условиях пандемии COVID-19 является безопасность персонала.

Ключевые слова: острая хирургическая патология, перитонит, острая кишечная непроходимость, кровотечение, острый аппендицит, острый холецистит, грыжи, острый панкреатит, COVID-19, мезентериальный тромбоз

Вклад авторов: все авторы внесли равный вклад в планирование исследования, организацию работы стационара, сбор и обобщение материала, а также написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: все пациенты подписали согласие на обработку персональных данных, а также согласие на оперативное лечение. В случае невозможности получения информированного согласия пациента ввиду тяжести его состояния, в соответствии с требованиями этического комитета и действующих нормативных актов был оформлен консилиум.

✉ **Для корреспонденции:** Борислав Владимирович Силаев
ул. Вешняковская, д. 23, г. Москва, 111539; drsilae@yandex.ru

Статья получена: 15.06.2020 **Статья принята к печати:** 22.06.2020 **Опубликована онлайн:** 29.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.038

DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ACUTE SURGICAL DISEASES IN PATIENTS WITH COVID-19

Vechyorko VI, Anosov VD, Silaev BV ✉

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

Emergency surgery in the infectious diseases hospital is an urgent problem during the COVID-19 pandemic. Municipal Clinical Hospital No.15 named after O. M. Filatov has been providing emergency surgical care after conversion, from March 27, 2020 until now. The hospital's medical staff has built up extensive experience: 194 surgical procedures were carried out in April, and 289 surgical procedures were carried out in May 2020. The paper reports the experience of emergency surgery at the stage of conversion to an infectious diseases hospital. Among all hospitalized patients, 482 (5.29%) people had acute surgical pathology requiring emergency surgery. Among patients who underwent urgent surgery, 472 (98%) people had the caused by COVID-19 community-acquired pneumonia of various degrees of severity. The paper discusses some features of acute surgical pathology and complications identified in patients with COVID-19. The surgical care features in the hospital after conversion are proper epidemiological regime implementation, minimization of the number of staff in the operating room, possible minimization of the number and reduction of the duration of surgical procedures. The most important challenge during the COVID-19 pandemic is medical staff safety.

Keywords: acute surgical pathology, peritonitis, acute intestinal obstruction, bleeding, acute appendicitis, acute cholecystitis, hernias, acute pancreatitis, COVID-19, mesenteric thrombosis

Author contribution: all authors made an equal contribution to study planning, hospital management, data acquisition and summarizing, as well as to manuscript writing.

Compliance with ethical standards: all patients submitted the informed consent to personal data processing and surgical treatment. When it was not possible to obtain the patient's informed consent due to the severity of the disease, a consultation was issued in accordance with the Ethics Committee requirements and local regulations.

✉ **Correspondence should be addressed:** Borislav V. Silaev
Veshnyakovskaya, 23, Moscow, 111539; drsilae@yandex.ru

Received: 15.06.2020 **Accepted:** 22.06.2020 **Published online:** 29.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.038

Вспышка коронавирусной инфекции в 2019 г. (COVID-19) бросила серьезный вызов всему человечеству [1]. Повсеместное введение режима самоизоляции и социального дистанцирования привело к прекращению роста заболеваемости, однако говорить о полном контроле над ситуацией пока рано.

В условиях пандемии нагрузка на хирургические службы существенно возросла [2–5]. Мировые хирургические сообщества (Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons (SAGES) [6, 7], American College of Surgeons [8], Royal College of Surgeons of England [9]), а также российские общества хирургов [10], урологов

и акушеров-гинекологов опубликовали совместные рекомендации по работе хирургической службы в новых условиях [10, 11]. Основные положения «Временных методических рекомендаций» направлены, во-первых, на предотвращение заражения медицинского персонала, и, во-вторых, на разработку принципов оказания инфицированным пациентам медицинской помощи, которую нельзя отложить до окончания пандемии. Согласно «Временным методическим рекомендациям»:

- все плановые оперативные вмешательства, манипуляции и исследования должны быть отложены;
- при проведении экстренных медицинских процедур

следует учитывать факт возможного инфицирования медицинских работников, поэтому объем вмешательства необходимо по возможности минимизировать;

- в лечебном процессе должно быть задействовано минимально необходимое количество персонала; следует максимально использовать возможности дистанционного общения между лечащей стороной и пациентом, а также дистанционные консультации специалистов;

- вполне вероятен дефицит кадров в хирургической службе, так как хирурги могут быть призваны оказывать медицинскую помощь пациентам в инфекционных стационарах.

Целью настоящей работы было представить результаты диагностики и лечения острых хирургических заболеваний в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С 27 марта 2020 г. после репрофилирования, занявшего около пяти суток, ГКБ № 15 имени О. М. Филатова приступила к приему пациентов с COVID-19.

В короткие сроки был построен шлюз с каналами для входа, переодевания персонала в защитную одежду и выхода из «красной зоны».

Хирургическая служба была сокращена до минимума, так как большинство врачей всех специальностей, в том числе врачи хирургического профиля, были призваны оказывать помощь пациентам с COVID-19. Прием плановых пациентов был прекращен. Наряду с пациентами инфекционного профиля, в госпиталь стали поступать пациенты с острой хирургической патологией, травмами, острой урологической и гинекологической патологией на фоне COVID-19.

Несмотря на проблемы, экстренная хирургическая помощь должна была быть оказана всем пациентам своевременно, качественно и в полном объеме. Для решения этой задачи основополагающим было соблюдение следующих условий:

- а) правильная маршрутизация больных;
- б) выбор оптимального (чаще минимального) объема операции;
- в) создание безопасных условий для работы операционной бригады.

К настоящему моменту опыт, накопленный уже столкнувшимися с новой инфекцией странами, позволил выработать принципы проведения операций в условиях пандемии COVID-19. Эти принципы в полном объеме реализованы в ГКБ №15:

- режим работы вентиляции операционного блока изменен в сторону преобладания вытяжки над притоком и создания отрицательного давления в операционной;
- весь хирургический персонал заходит в операционный

блок в средствах индивидуальной защиты (СИЗ): защитный комбинезон, шапочка, медицинские очки или пластиковый щиток, бахилы, латексные перчатки и фильтрующий респиратор;

- помимо СИЗ хирурги и операционные медсестры надевают одноразовую стерильную операционную одежду и стерильные перчатки;

- пациенту надевают одноразовую шапочку и одноразовую хирургическую маску;

- в операционной поддерживают оптимальную температуру и влажность (с учетом того, что члены операционной бригады одеты в двойной комплект одежды);

- максимально используется одноразовый хирургический инструментарий;

- в операционной находятся только члены операционной бригады, во время операции двери предоперационной и операционной плотно закрыты;

- ответственные за доставку инструментария дежурные медсестры находятся в предоперационной;

- переговоры между операционным залом и вспомогательными службами проходят только по внутренней связи.

Все операции были выполнены в условиях соблюдения эпидемиологического режима предварительно обученным и проинструктированным персоналом с соблюдением правил асептики и антисептики.

С 1 апреля по 23 мая 2020 г. в ГКБ № 15 было прооперировано 482 пациента, что составило 5,29% от общего числа поступивших в стационар пациентов. Среди пациентов с хирургическими патологиями было 226 мужчин (46,8%) и 256 женщин (53,2%), средний возраст пациентов составил $57,2 \pm 6,9$ лет (табл. 1).

У 436 (90,4%) пациентов наличие вируса было подтверждено результатами лабораторных исследований (назо-фарингеальный мазок, ПЦР). У остальных 46 (9,6%) пациентов отсутствовало лабораторное подтверждение наличия вируса, однако все они имели четкую картину пневмонии вирусной этиологии высокой степени вероятности.

Пневмония вирусной этиологии высокой степени вероятности (различной степени тяжести) была обнаружена у 472 пациентов (97,9%). Распределение больных по степени тяжести вирусной пневмонии отражено в табл. 2.

Критерии включения в исследование: пациенты обоего пола, любого возраста, с доказанной посредством ПЦР новой коронавирусной инфекцией COVID-19, выявленной острой хирургической патологией, требующие неотложной хирургической помощи. Критерии исключения: недоказанная новая коронавирусная инфекция COVID-19 у пациентов обоих полов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов и приложения Microsoft Excel (Microsoft; США).

Таблица 1. Распределение пациентов по возрасту

Возраст	Число пациентов	% от общего числа пациентов
18–44 лет	107	22,3
44–60 лет	192	39,9
60–75 лет	104	21,5
75–90 лет	73	15,1
> 90 лет	6	1,2
Всего:	482	100

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характер и количество операций, выполненных в клинике в период с 1 апреля по 23 мая 2020 г., представлены в табл. 3.

Из всех прооперированных пациентов только 32 (6,6%) были помещены в реанимационные отделения. Остальных после пробуждения транспортировали в палату непосредственно из операционной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С учетом полученных данных, необходимо подробнее остановиться на особенностях диагностики и лечения некоторых острых хирургических заболеваний в условиях перепрофилирования в инфекционный стационар для пациентов с COVID-19.

До перепрофилирования в инфекционный стационар диагностически «неясным» больным с подозрением на *острый аппендицит* назначали мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) брюшной полости, но в условиях перегруженности кабинетов КТ стали чаще использовать диагностические возможности лапароскопии. Так, из 36 пациентов с подозрением на острый аппендицит во время диагностической лапароскопии диагноз был подтвержден у 28.

В некоторых публикациях рекомендуют выполнение открытых, а не лапароскопических операций, так как считается, что во время лапароскопической процедуры увеличивается риск инфицирования персонала [7, 8]. Другие специалисты выполняют аппендэктомию лапароскопическим доступом даже у пациентов с вирусной пневмонией [12]. Мы не стали менять привычную хирургическую тактику. В период перепрофилирования было выполнено 27 лапароскопических аппендэктомий. Длительность операции составила в среднем 44,7 мин (для сравнения, средняя длительность 25 лапароскопических аппендэктомий, выполненных в январе–феврале 2020 г., составляла 42,4 мин). В одном случае мы прибегли к лапаротомии и выполнили аппендэктомию «открытым» способом. Осложнений в послеоперационном периоде не было.

В литературе обсуждают разные подходы к лечению *острого холецистита* у соматически ослабленных пациентов [6, 7, 13]. В описанный период в клинике проводили лечение 16 пациентам с острым калькулезным холециститом. У девяти из них провели консервативное лечение с эффектом, в шести случаях была выполнена лапароскопическая холецистэктомия. У шести пациентов имело место сочетание острого холецистита с вирусной пневмонией со степенью поражения легочной паренхимы КТ-3–4. Этим пациентам было выполнено дренирование желчного пузыря под УЗ-контролем. В дальнейшем — гладкое течение послеоперационного периода,

холецистостома была удалена в срок от 9 до 18 суток после операции.

По поводу *острого деструктивного панкреатита* были пролечены 12 пациентов. Диагноз был подтвержден с помощью МСКТ, во всех случаях было выполнено чрескожное пункционное дренирование жидкостных скоплений под УЗ-контролем. В одном случае имел место летальный исход у пациента с деструктивным панкреатитом и тяжелой (КТ-4) вирусной пневмонией.

У девяти пациентов были проведены вмешательства по поводу *острой кишечной непроходимости* на фоне вирусной пневмонии со степенью поражения легочной паренхимы КТ-3–4. В пяти случаях непроходимость имела спаечную природу, было выполнено рассечение спаек (в двух случаях лапароскопически). В четырех случаях непроходимость была вызвана опухолью прямой и сигмовидной кишки. Этим пациентам в двух случаях, ввиду наличия признаков перфорации опухоли, была выполнена резекция сигмовидной кишки с выведением стомы, а в двух остальных случаях — выведение «двухствольных» колостом. В раннем послеоперационном периоде умерли два пациента с тяжелой вирусной пневмонией (КТ-3–4) и сопутствующей патологией.

По поводу *ущемленных грыж* было прооперировано три пациента. В одном случае имела место ущемленная паховая грыжа (выполнено грыжесечение с последующим выздоровлением), в другом — ущемленная гигантская вентральная грыжа у пациентки с многочисленными сопутствующими заболеваниями (выполнено грыжесечение с летальным исходом ввиду тяжелого коморбидного фона), в третьем случае — ущемленная диафрагмальная грыжа у пациентки на третьи сутки после кесарева сечения. Пациентке были выполнены лапаротомия, низведение желудка в брюшную полость, ушивание дефекта диафрагмы. Послеоперационный период протекал гладко, пациентка была выписана.

За период перепрофилирования трех пациентов прооперировали по поводу *перфоративных язв желудка и двенадцатиперстной кишки*. Во всех наблюдениях ушивание язв выполняли «открытым» способом. В одном случае у 92-летней пациентки имел место распространенный перитонит, в послеоперационном периоде возникла несостоятельность ушитой язвы. Были выполнены две релапаротомии, пациентка скончалась на восьмые сутки с момента поступления в стационар.

У 34 больных имели место язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, осложненные кровотечением. Экстренная фиброгастродуоденоскопия (ФГДС) у пациентов с COVID-19 несет в себе риск инфицирования эндоскопической бригады, поэтому некоторые специалисты рекомендуют выполнять ее только по особым показаниям в течение 24 ч с момента поступления больного в стационар [7, 14]. В нашем случае всем пациентам была выполнена экстренная ФГДС в течение первых трех ч с момента

Таблица 2. Распределение пациентов по степени тяжести пневмонии

Степень тяжести пневмонии	Число пациентов	% от общего числа пациентов
COVID-19 без пневмонии	10	2
Пневмония КТ-1	118	24,5
Пневмония КТ-2	228	47,4
Пневмония КТ-3	85	17,6
Пневмония КТ-4	41	8,5
Всего:	482	100

поступления. Эндоскопическое исследование было закончено первичным гемостазом, однако рецидив кровотечения возник у 12 пациентов. Повторный эндоскопический гемостаз был эффективен у 11 из них. Один пациент после повторного рецидива был экстренно прооперирован: выполнены лапаротомия, дуоденотомия, прошивание кровоточащей язвы с последующим полным выздоровлением.

Некоторой особенностью описанного в статье периода можно считать практически одновременное поступление

двух пациентов со *спонтанным разрывом селезенки*. Из симптомов заболевания пациенты жаловались на боль в левой половине грудной клетки, возникающую при кашле. В обоих случаях диагноз был установлен при УЗ-исследовании. Объем подкапсульной гематомы у пациентов составил 55 и 120 мл. Нами была выбрана консервативно-выжидательная тактика. В первые сутки отрицательной динамики отмечено не было, а на вторые сутки было выявлено увеличение гематомы до 150 и 220 мл соответственно с появлением полосы свободной

Таблица 3. Операции, выполненные в ГКБ № 15 имени О. М. Филатова в условиях перепрофилирования в инфекционный стационар для пациентов с COVID-19

Название операции	Апрель 2020 г.	Май 2020 г.	Прирост числа операций, %
Общехирургический профиль			
Аппендэктомия	9	19	
Ампутация (пальцев, голени, бедра)	14	25	
Резекция сигмовидной кишки на фоне перитонита	3	1	
Лапаротомия, тромбэктомия из верхнебрыжеечной артерии при мезентериальном тромбозе	2	2	
Рассечение спаек при острой кишечной непроходимости	3	2	
Спленэктомия	2	1	
Лапароскопическая холецистэктомия (ЛХЭ)	0	6	
Микрохолецистостомия	2	4	
Операции при ущемленных грыжах	0	2	
Ушивание перфоративных язв	0	2	
Чрескожное чреспеченочное дренирование желчных протоков	1	0	
Эндоскопическая ретроградная папиллотомия	5	5	
Вскрытие флегмоны	14	24	
ВСЕГО:	55	93	69,09
Кардиохирургия и сосудистый профиль			
Ангиопластика коронарных артерий	13	21	
Тромбэктомия из артерий нижних конечностей	12	21	
Установка кава-фильтра	1	3	
Формирование артерио-венозной фистулы	1	5	
Протезирование аорты	1	0	
Имплантация кардиостимулятора	0	4	
Аортокоронарное шунтирование (АКШ)	0	1	
Протезирование клапанов сердца	0	2	
Стентирование артерий нижних конечностей	0	2	
Имплантация сосудистого катетера	6	4	
ВСЕГО:	34	63	85,29
Травматологический профиль			
Остеосинтез	8	15	
Транспедикулярная фиксация позвонков	0	1	
Эндопротезирование тазобедренного сустава при переломе	0	3	
ВСЕГО:	8	19	137,5
Нейрохирургический профиль			
Трепанация черепа при внутричерепных гематомах	0	6	
ВСЕГО:	0	6	
Урологический профиль			
Нефростомия	5	10	
ВСЕГО:	5	10	100
Прочие (диагностическая лапароскопия, первичная хирургическая обработка ран, трахеостомия, дренирование плевральной полости и т. п.)	92	98	
ИТОГО:	194	289	48,96

жидкости в брюшной полости. Обоих пациентов прооперировали в объеме спленэктомии с последующим полным выздоровлением.

У двух больных, поступивших в клинику с тяжелой пневмонией (КТ-3–4), проводили ИВЛ ввиду дыхательной недостаточности, у них был обнаружен *пневмоперитонеум на фоне пневмомедиастинума*. Дежурный хирург заподозрил перфорацию полого органа, однако во время операции повреждений органов брюшной полости обнаружено не было. Оба пациента скончались при нарастающих явлениях острой дыхательной и полиорганной недостаточности. Описанные случаи требуют дальнейшего подробного анализа и оценки.

Следует особо обсудить пациентов с *мезентериальным тромбозом*. Летальность в этой группе превышает 75% даже в «мирное» время [15]. В описанной нами группе таких пациентов было восемь. В четырех случаях больные поступили с клинической картиной перитонита, и во время экстренной операции был обнаружен тотальный некроз тонкой кишки и правой половины толстой кишки. У четырех больных были выполнены тромбэктомия из верхнебрыжеечной артерии с резекцией тонкой кишки. В одном случае тромбэктомия была выполнена эндоваскулярно. Однако, несмотря на назначения антикоагулянтов в лечебных дозах, у всех пациентов в раннем послеоперационном периоде наступили ретромбоз, некроз оставшейся части тонкой кишки и летальный исход.

Представленные данные свидетельствуют о значительном увеличении числа экстренных и срочных оперативных вмешательств в мае 2020 г. по сравнению с апрелем 2020 г. В апреле 2020 г. в клинику в основном поступали пациенты с вирусной пневмонией, вызванной COVID-19, а экстренные хирургические заболевания были обнаружены лишь у некоторых из них. В мае 2020 г. ситуация изменилась. В связи с тем, что в Москве для лечения пациентов с COVID-19 открыли несколько

других крупных клиник, в ГKB № 15 им. О. М. Филатова стали поступать пациенты, изначально имевшие острую хирургическую патологию на фоне COVID-19.

Накопленный клинический опыт позволяет констатировать, что принципиальных изменений в тактике ведения больных с острой хирургической патологией нет. Однако в условиях наличия у пациента, помимо острого хирургического заболевания, COVID-19 и вирусной пневмонии различной степени тяжести необходимо учитывать повышенный риск как бактериальных, так и тромбозомболических осложнений.

На основании неполных двух месяцев работы сложно делать выводы об особенностях течения острой хирургической патологии на фоне вирусной пневмонии. Однако уже очевидно, что на пике заболеваемости COVID-19 при правильной организации хирургической помощи в инфекционном стационаре для пациентов с новой коронавирусной инфекцией можно соблюсти баланс между уменьшением объема хирургической помощи до уровня неотложной с одной стороны и риском заражения медицинского персонала с другой.

ВЫВОДЫ

В условиях наличия у пациента, помимо острого хирургического заболевания, COVID-19 и вирусной пневмонии различной степени тяжести необходимо учитывать повышенный риск как бактериальных, так и тромбозомболических осложнений. Среди особенностей хирургической помощи в инфекционном стационаре для пациентов с COVID-19 можно назвать необходимость строгого соблюдения эпидемиологического режима, минимизации численности персонала в операционной, возможной минимизации числа оперативных пособий и сокращения их длительности. Наиболее важной задачей в этих условиях является безопасность персонала.

Литература

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19 марта 2020 г. № 198н «О временном порядке организации работы медицинских организаций в целях реализации мер по профилактике и снижению рисков распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19» (2020).
2. Ti LK, Ang LS, Foong TW, Ng BSW. What we do when a COVID-19 patient needs an operation: operating room preparation and guidance. *Can J Anaesth*. 2020; 67 (6): 756–8. DOI: 10.1007/s12630-020-01617-4.
3. Lenzen-Schulte M. COVID-19: Chirurgie in Zeiten der Pandemie. *Dtsch Arztebl*. 2020; 117 (18): A-940/B-793.
4. Akladios C, Azais H, Ballester M, et al. Recommendations for the surgical management of gynecological cancers during the COVID-19 pandemic — FRANCOGYN group for the CNGOF. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020; 49 (6): 101729. DOI:10.1016/j.jogoh.2020.101729.
5. Smith D, Montagne J, Raices M, et al. Tracheostomy in the intensive care unit: Guidelines during COVID-19 worldwide pandemic [published online ahead of print, 2020 Jun 1]. *Am J Otolaryngol*. 2020; 41 (5): 102578. doi:10.1016/j.amjoto.2020.102578.
6. Pryor A. SAGES and EAES recommendations regarding surgical response to COVID-19 crisis. Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons, 2020 March 29. Available at: <https://www.sages.org/recommendations-surgical-response-covid-19/>.
7. Sultan S, Lim JK, Altayar O, et al. AGA Institute Rapid Recommendations for Gastrointestinal Procedures During the COVID-19 Pandemic [published online ahead of print, 2020 Mar 31]. *Gastroenterology*. 2020; S0016-5085 (20) 30458–3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.072.
8. COVID 19: Elective Case Triage Guidelines for Surgical Care, Emergency General Surgery. American College of Surgeons. 2020 March 24. Available at: <https://www.facs.org/covid-19/clinical-guidance/elective-case>.
9. Updated General Surgery Guidance on COVID-19. 2020 April 6. Available at: <https://www.augis.org/wp-content/uploads/2020/04/2nd-Update-Intercollegiate-General-Surgery-Guidance-on-COVID-19-6-April-...pdf>.
10. Готье С. В., Ревитшвили А. Ш., Пушкарь Д. Ю. и др. Методические рекомендации «Экстренная хирургическая помощь в условиях COVID-19». М., 2020.
11. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID 19), версия 6. Москва. 28.04.2020.
12. Schreckenbach T, Fritsch N, Lahrso M. SARS-CoV-2 pandemic — a complicated case of appendicitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2020; 117: 364. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0364.
13. Ambe PC, Kaptanis S, Papadakis M, Weber SA, Jansen S, Zirngibl H. The Treatment of Critically Ill Patients With Acute Cholecystitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2016; 113 (33–34): 545–51. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0545.
14. Lau JYW, Yu Y, Tang RSY, et al. Timing of Endoscopy for Acute Upper Gastrointestinal Bleeding. *N Engl J Med*. 2020; 382 (14):

1299–308. DOI: 10.1056/NEJMoa1912484.

15. Bala M, Kashuk J, Moore EE, et al. Acute mesenteric ischemia:

guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World J Emerg Surg.* 2017; 12:38. DOI: 10.1186/s13017-017-0150-5.

References

1. Prikaz Ministerstva zdravooohranenija RF ot 19 marta 2020 g. № 198n "O vremennom porjadke organizacii raboty medicinskih organizacij v celjah realizacii mer po profilaktike i snizheniju riskov rasprostraneniya novoj koronavirusnoj infekcii COVID-19" (2020). Russian.
2. Ti LK, Ang LS, Foong TW, Ng BSW. What we do when a COVID-19 patient needs an operation: operating room preparation and guidance. *Can J Anaesth.* 2020; 67 (6): 756–8. DOI: 10.1007/s12630-020-01617-4.
3. Lenzen-Schulte M. COVID-19: Chirurgie in Zeiten der Pandemie. *Dtsch Arztebl.* 2020; 117 (18): A-940/B-793.
4. Akladios C, Azais H, Ballester M, et al. Recommendations for the surgical management of gynecological cancers during the COVID-19 pandemic — FRANCOGYN group for the CNGOF. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020; 49 (6): 101729. DOI:10.1016/j.jogoh.2020.101729.
5. Smith D, Montagne J, Raices M, et al. Tracheostomy in the intensive care unit: Guidelines during COVID-19 worldwide pandemic [published online ahead of print, 2020 Jun 1]. *Am J Otolaryngol.* 2020; 41 (5): 102578. doi:10.1016/j.amjoto.2020.102578.
6. Pryor A. SAGES and EAES recommendations regarding surgical response to COVID-19 crisis. Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons, 2020 March 29. Available at: <https://www.sages.org/recommendations-surgical-response-covid-19/>.
7. Sultan S, Lim JK, Altayar O, et al. AGA Institute Rapid Recommendations for Gastrointestinal Procedures During the COVID-19 Pandemic [published online ahead of print, 2020 Mar 31]. *Gastroenterology.* 2020; S0016-5085 (20) 30458-3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.072.
8. COVID 19: Elective Case Triage Guidelines for Surgical Care, Emergency General Surgery. American College of Surgeons. 2020 March 24. Available at: <https://www.facs.org/covid-19/clinical-guidance/elective-case>.
9. Updated General Surgery Guidance on COVID-19. 2020 April 6. Available at: <https://www.augis.org/wp-content/uploads/2020/04/2nd-Update-Intercollegiate-General-Surgery-Guidance-on-COVID-19-6-April-...pdf>.
10. Gote SV, Revishvili ASH, Pushkar DJu i dr. Metodicheskie rekomendacii "Jekstrennaja hirurgicheskaja pomoshh' v uslovijah COVID-19". M., 2020. Russian.
11. Vremennye metodicheskie rekomendacii: profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID 19), versija 6. Moskva. 28.04.2020. Russian.
12. Schreckenbach T, Fritsch N, Lahrsow M. SARS-CoV-2 pandemic — a complicated case of appendicitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2020; 117: 364. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0364.
13. Ambe PC, Kaptanis S, Papadakis M, Weber SA, Jansen S, Zirngibl H. The Treatment of Critically Ill Patients With Acute Cholecystitis. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113 (33–34): 545–51. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0545.
14. Lau JYW, Yu Y, Tang RSY, et al. Timing of Endoscopy for Acute Upper Gastrointestinal Bleeding. *N Engl J Med.* 2020; 382 (14): 1299–308. DOI: 10.1056/NEJMoa1912484.
15. Bala M, Kashuk J, Moore EE, et al. Acute mesenteric ischemia: guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World J Emerg Surg.* 2017; 12:38. DOI: 10.1186/s13017-017-0150-5.

СТРУКТУРА ТРЕВОЖНЫХ ПЕРЕЖИВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАСПРОСТРАНЕНИЕМ COVID-19: ДАННЫЕ ОНЛАЙН-ОПРОСА

М. Ю. Сорокин¹✉, Е. Д. Касьянов¹, Г. В. Рукавишников¹, О. В. Макаревич¹, Н. Г. Незнанов^{1,2}, Н. Б. Лутова¹, Г. Э. Мазо¹¹ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Пандемия COVID-19 не только создала серьезные угрозы для физического здоровья населения, но и вызвала широкий спектр психологических проблем. Целью работы было выявить структуру тревожных переживаний населения в период эпидемии и определить наиболее уязвимые социальные группы (в том числе среди лиц с аффективными расстройствами), больше всего нуждающиеся в психологической и/или психиатрической помощи. Было проведено онлайн-анкетирование 1957 русскоговорящих респондентов старше 18 лет в период с 30 марта по 5 апреля 2020 г. Уровень тревожного дистресса верифицировали по шкале психологического стресса (PSM-25), стигматизацию лиц с респираторными симптомами — по модифицированному опроснику обесценивания/дискриминации (PDD; Cronbach's $\alpha = 0,707$). У 99,8% респондентов обнаружено сочетание нескольких типов тревожных переживаний о COVID-19, показатель стресса был повышен до уровня средней интенсивности ($104,9 \pm 34,4$ балла), а показатель стигматизации превосходил медианное значение по выборке ($19,5 \pm 3,4$; Me = 17). До 35% респондентов имели опасения, ассоциированные с тревожным дистрессом (Cohen's $d = 0,16-0,39$): «риск изоляции» и «возможное отсутствие лекарств для ежедневного приема». Особенно подверженными психологическому стрессу оказались страдающие аффективными расстройствами, лица молодого возраста (≤ 20 лет), безработные, холостые/незамужние, не имеющие высшего образования и женщины. Таким образом, широкие слои населения нуждаются в коррекции дистрессовых опасений на фоне пандемии COVID-19, поэтому их проведение должно быть адресным, ориентированным по степени охвата и содержанию на выявленные уязвимые социальные группы.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, пандемия, COVID-19, психическое здоровье, тревога, аффективные расстройства, ассоциированная стигма

Благодарности: членам Российского общества психиатров, Анастасии Петровой и АНО «Партнерство равных», Марии Фаворской и ассоциации «Биполярники», Виктору Лебедеву и проекту «Дело Пинеля», а также просветительскому portalу «Психиатрия & Нейронауки».

Вклад авторов: М. Ю. Сорокин — разработка дизайна исследования, статистическая обработка и анализ полученных данных, подготовка текста; Е. Д. Касьянов — разработка дизайна исследования, сбор материала, анализ полученных данных, подготовка текста; Г. В. Рукавишников — разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста; О. В. Макаревич — разработка дизайна исследования, подготовка текста; Н. Г. Незнанов — редактирование; Н. Б. Лутова, Г. Э. Мазо — разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2013). Все участники дали согласие на обработку персональных данных перед включением в исследование.

✉ Для корреспонденции: Михаил Юрьевич Сорокин
ул. Бехтерева, д. 3, г. Санкт-Петербург, 192019; m.sorokin@list.ru

Статья получена: 06.05.2020 Статья принята к печати: 21.05.2020 Опубликована онлайн: 02.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.030

STRUCTURE OF ANXIETY ASSOCIATED WITH COVID-19 PANDEMIC: THE ONLINE SURVEY RESULTS

Sorokin MYu¹✉, Kasyanov ED¹, Rukavishnikov GV¹, Makarevich OV¹, Neznakov NG^{1,2}, Lutova NB¹, Mazo GE¹¹ V.M. Bekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology, Saint-Petersburg, Russia² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

The COVID-19 pandemic imposed not only serious threats to the physical health of the population, but also provoked a wide range of psychological problems. The study was aimed to define the structure of anxiety in the population during the epidemic period, as well as to identify the most vulnerable social groups (including individuals with affective disorders) which were most in need of psychological and/or psychiatric help. The online survey of 1957 Russian-speaking respondents aged over 18 was carried out from March 30 to April 5, 2020. The anxiety distress level was verified using the Psychological Stress Measure (PSM-25), the stigmatization of individuals experiencing respiratory symptoms was assessed using the modified Perceived Evaluation-Discrimination Questionnaire (PDD; Cronbach's $\alpha = 0.707$). In 99.8% of respondents, the combination of various concerns associated with COVID-19 was observed, the mean psychological stress score was increased to moderate level (score 104.9 ± 34.4), and the stigmatization score exceeded the whole sample median value (19.5 ± 3.4 ; Me = 17). About 35% of respondents had concerns associated with anxiety distress (Cohen's $d = 0.16-0.39$): these were the "risk of social isolation" and the "possible lack of medication for daily use". The following groups of respondents were the most susceptible to the stress: people with affective disorders, young people (aged ≤ 20), unemployed persons, single persons, people with no formal education, and women. Thus, the broad sectors of the population need correction of anxiety distress associated with the COVID-19 pandemic. Therefore, the measures' implementation should be targeted, and in terms of coverage and content oriented to the identified vulnerable social groups.

Keywords: coronavirus infection, pandemic, COVID-19, mental health, anxiety, affective disorders, associated stigma

Acknowledgements: we would like to express our gratitude to the Russian Society of Psychiatrists (RSP) members, to Anastasia Petrova and the Partnership of Equal ANPO, to Maria Pushkina (Favorskaya) and the Bipolar association, to Victor Lebedev and the Pinel's Affair project, and to the Psychiatry & Neurosciences educational service.

Author contribution: Sorokin MYu — research design, statistical processing and data analysis, manuscript writing; Kasyanov ED — research design, data acquisition and analysis, manuscript writing; Rukavishnikov GV — research design, data analysis, manuscript writing; Makarevich OV — research design, manuscript writing; Neznakov NG — editing; Lutova NB, Mazo GE — research concept and design, data analysis, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was performed in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki (2013). All participants submitted the consent to personal data processing.

✉ Correspondence should be addressed: Mikhail Yu. Sorokin
Bekhtereva, 3, Saint-Petersburg, 192019; m.sorokin@list.ru

Received: 06.05.2020 Accepted: 21.05.2020 Published online: 02.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.030

В ноябре 2019 г. впервые была зарегистрирована новая коронавирусная инфекция COVID-19 (от англ. coronavirus disease 2019), вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 [1]. Данная инфекция довольно быстро распространилась в Ухане (столице китайской провинции Хубэй) и затем по всему Китаю, перекинувшись на другие страны (в том числе Российскую Федерацию (РФ)), вызвав глобальную чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения [2]. Уже 11 марта 2020 г. в связи с высокой распространенностью COVID-19 Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала текущую ситуацию пандемией [3]. В РФ первые лица с COVID-19 были выявлены 31 января 2020 г., а в начале апреля уже более 5000 россиян имели подтвержденные диагнозы [4, 5].

Пандемия COVID-19 создала серьезные угрозы для физического здоровья и жизни людей. Кроме того, опасность заражения коронавирусом вызвала среди населения стран с высоким уровнем распространения вирусной инфекции широкий спектр психологических проблем, таких как паническое расстройство, тревога и депрессия [6]. С марта 2020 г. правительства многих стран ввели карантинные меры, чтобы ограничить распространение инфекции и минимизировать нагрузку на медицинские службы. Лицам старше 65 лет, лицам с сопутствующими заболеваниями и беременным было предложено изолировать себя от прямого контакта с людьми в течение как минимум 12 недель, а лицам с подозрением на носительство коронавируса было поручено оставаться в своих домах и изолировать себя и всех, кто живет с ними, в течение как минимум 14 дней [7].

Таким образом возникли условия, когда одновременно присутствует ряд факторов, оказывающих влияние на психическое здоровье населения:

- 1) беспрецедентная потенциально угрожающая жизни ситуация с неопределенной продолжительностью;
- 2) широкомасштабные карантинные меры во всех крупных городах, которые, по сути, ограничивают жителей пребыванием в своих домах;
- 3) неопределенный инкубационный период вирусной инфекции и ее возможная бессимптомная передача;
- 4) сообщения о нехватке медицинских средств защиты;
- 5) неустойчивый информационный фон с переизбытком противоречивой информации;
- 6) неопределенность, связанная с влиянием коронавирусной инфекции COVID-19 на экономическую ситуацию в стране.

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, по данным китайских исследователей, спровоцировала параллельно идущую эпидемию тревожных и депрессивных реакций [8, 9]. При этом определенные группы населения могут быть более уязвимыми к психологическому стрессу, ассоциированному с данным заболеванием. В первую очередь лица с аффективными расстройствами — они значительно более подвержены эмоциональным откликам на пандемию COVID-19, проявляющимся в рецидивах уже имеющихся психических расстройств или ухудшении состояния, в силу высокой чувствительности к стрессу в сравнении с общей популяцией, а также в связи с ограничением планового амбулаторного приема врачей-психиатров. Кроме того, помимо возрастания уровня переживаемого стресса среди населения возрастают стигма и дискриминация по отношению к определенным группам населения [10], даже при отсутствии доказательств об увеличении риска заболеваемости среди дискриминируемых групп.

Целью исследования было выявить структуру тревожных переживаний населения в период эпидемии и определить наиболее уязвимые социальные группы (в том числе среди лиц с аффективными расстройствами), больше всего нуждающиеся в психологической и/или психиатрической помощи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение данных

Данные для исследования были получены на основании онлайн-опроса, проведенного с 30 марта по 5 апреля 2020 г. Участникам исследования предлагали заполнить анкету через интернет-платформу Google Forms, что в среднем требовало около 15 мин. Анкету распространяли в социальных сетях, а также на сайтах общественных организаций и тематических сообществ (см. Благодарности).

Критерии включения: способность читать на русском языке, наличие согласия на обработку персональных данных, фактом которого считали заполнение всех предложенных форм опроса. Критерии исключения (определены максимально свободно с целью репрезентации возможно большего числа социальных групп среди респондентов): 1) возраст участников < 18 лет; 2) наличие незаполненных разделов анкеты.

Анкета включала социодемографические данные респондентов, а также сведения о наличии/отсутствии аффективных расстройств (депрессивного расстройства, биполярного аффективного расстройства, генерализованного тревожного расстройства, дистимии и циклотимии), соматической патологии на основании самоотчетов участников исследования.

Респондентам предлагали отметить любое количество из предложенных 10 пунктов анкеты, описывающих различные варианты опасений в связи с пандемией COVID-19, а также любое число среди шести поведенческих вариантов предотвращения заражения, которые они практиковали (полная анкета представлена в Приложении). Отдельно респонденты могли определить, с какой частотой они обращались за информацией о пандемии в течение последней недели, если ее ранжировать на восемь градаций в диапазоне от «ни разу» до «ежечасно». Для оценки тревожного дистресса были использованы вопросы Шкалы психологического стресса (PSM-25) [11]. На основе широко распространенного опросника воспринимаемой стигматизации, его раздела обесценивания/дискриминации (PDD) [12] нами были сформулированы утверждения, описывающие предвзятое отношение к лицам, имеющим признаки простудного заболевания (кашель, насморк, чихание). Степень согласия с утверждениями этого опросника респонденты оценивали по четырехбалльной шкале Лайкерта, и большее суммарное значение соответствовало интенсивной стигме.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного продукта SPSS-16 (SPSS Inc., США). Использовали дескриптивные статистики. Проверку на нормальность распределения осуществляли по методу оценки асимметрии. Дисперсионный анализ для данных с номинальными шкалами проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона, с порядковыми шкалами — по U -критерию Манна-Уитни. Для групп, различающихся на

уровне статистической значимости $p \leq 0,05$, вычисляли размеры эффектов по критериям Cohen's d и Cramer's V. При сопоставлении номинальных признаков с более чем двумя градациями интерпретацию размера эффекта проводили с поправкой на число степеней свободы и указанием пороговых значений для слабого/умеренного/сильного эффекта. Вычисляли корреляционные коэффициенты Спирмена. Оценку внутренней согласованности оригинального опросника стигматизации проводили с использованием коэффициента α Кронбаха.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В финальный реестр вошли 2117 записей, сделанных в течение первой недели рекомендуемого в России режима самоизоляции (с 30 марта по 5 апреля). Из анализа были исключены данные 160 респондентов, не соответствующих возрастному критерию. Таким образом, статистический анализ был проведен для данных опроса 1957 респондентов.

Демографические показатели

Большую часть выборки составили женщины — 1649 человек (84,3%). Средний возраст респондентов достигал 31 года ($Me = 27$; $Q_{25} = 22$, $Q_{75} = 38$). В выборку вошли респонденты из городов федерального значения — Санкт-Петербурга (21,1%), Москвы (16,8%) — и всех федеральных округов России (57,6%), а также стран ближнего и дальнего зарубежья (4,5%).

Социальные показатели

Около половины всех респондентов имели высшее образование (55,3%). О наличии неоконченного высшего образования сообщили 25,6% опрошенных. Значительная часть респондентов на момент опроса работала в частных (23,6%) и государственных (32,2%) организациях. До 10,3% выборки составили медицинские работники. Не имели постоянного места работы 22,2% респондентов. Холосты или не замужем были 51,8% респондентов. В зарегистрированном браке состояли 26,9% респондентов, в незарегистрированном — 12,4%.

Сопутствующие заболевания

Наличие сопутствующей соматической патологии было указано в 54,8% случаев. О наличии тех или иных

аффективных расстройств сообщили 29,5% выборки. Наиболее часто респонденты указывали депрессивное и биполярное аффективное расстройства (19,8%), реже — тревожные расстройства (6,0%) и циклотимию или дистимию (3,7%).

Характеристика психологических и поведенческих реакций респондентов

Проведенный корреляционный анализ всего массива данных показал, что попытки приспособления к новым условиям жизни в период распространения COVID-19 представляют собой многоуровневый процесс, имеющий сложную структуру взаимосвязанных факторов. Большое количество практикуемых мер предотвращения заражения коронавирусом (в среднем — четыре: $Me = 4$; $Q_{25} = 3$, $Q_{75} = 4$) и частый поиск информации об эпидемии (в среднем двукратное в течение дня: $Me = 6$; $Q_{25} = 5$, $Q_{75} = 7$) предсказуемо коррелировали друг с другом и были связаны интенсификацией психологических реакций участников исследования в ответ на пандемию: увеличивались число сюжетов опасений о COVID-19, уровень связанного с ними психологического стресса, а также склонность респондентов стигматизировать лиц с респираторными симптомами. Практически все перечисленные показатели тоже были чувствительны к социально-демографическим параметрам обследованной выборки (табл. 1).

Среди участников исследования 99,8% сообщали о наличии как минимум двух сюжетов для волнения по поводу коронавируса, наиболее распространенное число тем тревожных переживаний было равно пяти ($Me = 5$; $Q_{25} = 4$, $Q_{75} = 6$) (табл. 2). Разнообразие тревожных реакций было ассоциировано с показателем психологического стресса (PSM-25), достигающим по всей выборке уровня средней интенсивности 104,9 балла ($Me = 106$; $Q_{25} = 80$, $Q_{75} = 130$). Качественный анализ взаимосвязи отдельных тем переживания о COVID-19 с уровнями психологического стресса и стигматизации-дискриминации лиц с респираторными симптомами показал разнонаправленные эффекты отдельных опасений.

Наличие опасения о жизни и здоровье близких не было ассоциировано со статистически значимым нарастанием уровня стресса или существенным увеличением стигмы, что, вероятно, определялось максимальной охваченностью этим переживанием подавляющего числа респондентов. В то же время с клинически значимым эффектом нарастания психологического стресса (слабым по магнитуде) было связано наличие двух наиболее редко встречающихся из

Таблица 1. Взаимосвязь социально-демографических характеристик с психологическими и поведенческими реакциями респондентов в отношении COVID-19

	Частота поиска информации о COVID-19	Число сюжетов волнения о COVID-19	Число мер предотвращения COVID-19	Стресс (PSM-25)	Стигматизация
Возраст	0,06***	-0,23***	—	-0,38***	0,06**
Образование	0,08***	-0,15***	—	-0,22***	—
Частота поиска информации о COVID-19	1,000	—	—	—	—
Число сюжетов волнения о COVID-19	0,22***	1,000	—	—	—
Число мер предотвращения COVID-19	0,17***	0,30***	1,000	—	—
Стресс по PSM-25	0,14***	0,28***	0,05*	1,000	—
Стигматизация	0,10***	0,12***	0,12***	—	1,000

Примечание: корреляционные коэффициенты Spearman's rho; $N = 1957$; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$.

Таблица 2. Типология опасений о COVID-19 с сопутствующими уровнями тревожного дистресса и выраженности стигматизации лиц с респираторными симптомами

Тип присутствующего волнения	Представленность (человек/доля в %)	Изменение уровней (SE):	
		стресса	стигмы
Риск для жизни и здоровья родственников и близких	1527 / 77,2	– *	+0,06
Возможные материальные трудности	1128 / 57,0	+0,16	–0,04
Тяжелые социальные последствия	980 / 49,5	+0,14	–0,08
Отсутствие специального лечения COVID-19	789 / 39,9	+0,1	+0,19
Невозможность привычного образа жизни	766 / 38,7	+0,17	–0,16
Заразность вируса	708 / 35,8	+0,1	+0,27
Опасность для собственной жизни	619 / 31,3	+0,14	+0,36
Отсутствие в продаже средств защиты	544 / 27,5	+0,16	+0,23
Возможное отсутствие лекарств для ежедневного приема	434 / 21,9	+0,39	+0,19
Риск изоляции	351 / 17,7	+0,43	–0,14

Примечание: размер эффекта (SE) слабый при $0,2 \leq \text{Cohen's } d \leq 0,49$; $p \leq 0,05$.

10 сюжетов для волнения: «возможного отсутствия лекарств для ежедневного приема» и «риска изоляции» (табл. 2). В совокупности среди участников исследования 688 человек (35% выборки) сообщали о наличии хотя бы одного из них.

Средний суммарный показатель опросника стигматизации лиц с респираторными симптомами достигал 19,5 балла при $M_e = 17$ ($Q_{25} = 15$, $Q_{75} = 19$) и достаточной внутренней согласованности инструмента (коэффициент α Кронбаха — 0,707). При этом «риск изоляции» был связан с достоверным снижением склонности респондентов к стигматизации лиц с респираторными симптомами. Однако эффекты нарастания стигмы достигали уровня практической значимости в случаях, когда у участников исследования присутствовало волнение на темы «заразности вируса», его «опасности для собственной жизни» или «отсутствия в продаже средств защиты».

Психологические реакции отдельных групп населения

Среди отдельных групп респондентов конкретные сюжеты тревожных переживаний имели свои особенности. Два типа наиболее ассоциированных с психологическим стрессом сюжетов были присущи, в частности, лицам, сообщившим о наличии у них аффективных нарушений (табл. 3). Причем «риск изоляции» в большей степени вызывал опасения среди тех, кто имел сочетанную с аффективной соматическую патологию. В то же время «возможное отсутствие лекарств, необходимых для ежедневного приема», чаще волновало респондентов, страдающих аффективными расстройствами без соматической коморбидности.

Важно отметить, что среди 688 участников исследования, имеющих не один, а сочетание обоих ассоциированных с психологическим стрессом

типов тревожных переживаний, респонденты без психических нарушений встречались столь же часто, как страдающие аффективными расстройствами. Неожиданным подтверждением внешней валидности онлайн-анкеты стало выявленное превалирование специфичного для лиц с тревожными расстройствами опасения за собственную жизнь, отличающего их от респондентов, имеющих патологию настроения (табл. 4).

Кроме традиционных групп населения, считающихся уязвимыми в отношении тревожных реакций, — страдающих аффективными и соматическими заболеваниями, — гораздо более широкие слои населения демонстрировали различные превалирующие типы опасений о COVID-19. Так, женщины чаще мужчин переживали об отсутствии в продаже индивидуальных средств защиты, а также опасались за собственную жизнь (табл. 4). Более склонны опасаться изоляции были холостые и незамужние участники исследования, безработные и трудоустроенные в государственных учреждениях (табл. 5).

Существенно реже сюжет тревожных опасений по поводу риска изоляции встречался среди респондентов, имеющих высшее образование или ученую степень, а также лиц старше 31 года. Категорию участников опроса старше 60 лет выделяла большая склонность опасаться материальных трудностей, возможных на фоне развития пандемии (табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании проведения онлайн-опроса нами были получены данные, которые позволяют оценить структуру психологических переживаний, характерных для русскоязычных респондентов на первой неделе рекомендуемого режима самоизоляции в России. Проведенный анализ показал широкое распространение

Таблица 3. Специфика тревожных переживаний в зависимости от группы здоровья респондентов

Типы волнения о COVID-19		Здоровые $n = 643$	Наличие заболевания			Критерий статистической значимости
			аффективного $n = 242$	соматического $n = 737$	коморбидно $n = 336$	
Риск изоляции	+	11,0%	21,5%	17,9%	31,0%	$\chi^2 = 63,8$; $p = 0,000$ SE = 0,25
	–	89,0%	78,5%	82,1%	69,0%	
Недоступность лекарств	+	22,2%	34,3%	14,4%	30,4%	$\chi^2 = 59,6$; $p = 0,000$ SE = 0,21
	–	77,8%	65,7%	85,6%	69,6%	

Примечание: размер эффекта (SE) средний при $0,17 \leq \text{Cramers's } V \leq 0,29$.

Таблица 4. Специфика тревожных переживаний в зависимости от типа аффективного расстройства и пола

Типы волнения о COVID-19	Представленность по группам			Критерий статистической значимости
	1	2		
Гендерный фактор: 1 — мужчины, 2 — женщины				
Дефицит средств защиты	+	20,1%	29,2%	$\chi^2 = 10,7; p = 0,001$ SE = 0,14
	–	79,9%	70,8%	
Опасность для собственной жизни	+	23,1%	33,2%	$\chi^2 = 12,4; p = 0,000$ SE = 0,14
	–	76,9%	66,8%	
Тип аффективных нарушений: 1 — нарушения настроения, 2 — тревожные расстройства				
Опасность для собственной жизни	+	26,7%	40,7%	$\chi^2 = 8,8; p = 0,003$ SE = 0,12
	–	73,3%	59,3%	

Примечание: размер эффекта (SE) малый при $0,1 \leq \text{Cramers's } V \leq 0,3$.

среди участников исследования различных причин для тревожных переживаний в связи с пандемией COVID-19, которые в совокупности обеспечивали повышенный уровень психологического стресса в обследованной выборке.

На фоне изменившихся условий жизни и деятельности, связанных с карантинными мероприятиями, у респондентов ожидаемо сформировались разнообразные опасения, вызванные пандемией COVID-19. Важно отметить, что переживания по поводу «риска для жизни и здоровья родственников и близких» не приводили к нарастанию психологического стресса, в силу чего их можно рассматривать в рамках адаптационных личностных и психологических реакций. Одновременно расширение списка сюжетов волнений приводило к срыву адаптационных механизмов, провоцируя интенсификацию как психологического напряжения, проявляющегося в усилении тревоги, так и социального, когда переживаемый стресс сознательно или неосознанно перемещался во вне, вызывая усиление стигмы. Важно подчеркнуть, что психологический стресс особенно нарастал на фоне опасений в связи с «возможным отсутствием лекарств для ежедневного использования» и «риском изоляции», что в первом случае, по-видимому, связано с ухудшением субъективного восприятия, а во втором — с тем, что сами по себе карантинные мероприятия провоцируют волну тревоги и гнева. Нарастание стигматизационных установок в наибольшей степени оказалось связано со следующими переживаниями: «опасность для собственной жизни», «заразность вируса» и «отсутствие в продаже средств защиты», по-видимому, в большей степени обусловленных ощущением утраты контроля за ситуацией.

Отдельного внимания заслуживают данные, полученные от респондентов, сообщивших о наличии у

них аффективных расстройств. Для них, как и для лиц, не сообщивших о каких-либо психических нарушениях, были характерны те же типы наиболее ассоциированных с психологическим стрессом сюжетов — «риск изоляции» и «недоступность лекарств». Однако «риск изоляции» в большей степени вызывал опасения среди тех, кто имел сочетанную с аффективной соматическую патологию. В то же время «возможное отсутствие лекарств, необходимых для ежедневного приема» чаще волновало респондентов, страдающих аффективными расстройствами без соматической коморбидности. Кроме того, для лиц с тревожными расстройствами было характерно превалирование специфичного для них «опасения за собственную жизнь», в сравнении с больными аффективными расстройствами, что подчеркивает клиническое своеобразие их переживаний.

Полученные данные о структуре тревожных переживаний респондентов позволяют выделить их особенности среди разных групп населения, что важно для формирования дифференцированных программ оказания психологической и социальной помощи. В частности, волнения по поводу «риска изоляции» в наибольшей степени свойственны молодым респондентам (моложе 31 года), относящимся к холостым или незамужним, не имеющим высшего образования и безработным, а также лицам с сочетанной аффективной и соматической патологией. Если в первых трех случаях это может быть обусловлено личностной незрелостью, несформированными навыками самоконтроля и самозанятости, а также временной утратой возможности общения, то для безработных основная причина — это снижение возможности для материального обеспечения. Для лиц старшей возрастной группы особой темой волнений оказались «материальные трудности»,

Таблица 5. Специфика тревожных переживаний в группах респондентов по их занятости и семейному статусу

Тип волнения о COVID-19		Представленность по группам:					Критерий статистической значимости
		1	2	3	4	5	
Трудовой статус: 1 — обучение, $n = 271$; 2 — безработные, $n = 435$; 3 — частный наем, $n = 462$; 4 — государственный наем, $n = 631$; 5 — собственный бизнес, $n = 158$							
Риск изоляции	+	19,6%	25,1%	8,2%	20,9%	12,0%	$\chi^2 = 52,6$; $p = 0,000$ SE = 0,19
	–	80,4%	74,9%	92,8%	79,1%	88,0%	
Семейный статус: 1 — вдовцы/вдовы, $n = 30$; 2 — разведенные, $n = 144$; 3 — холостые/незамужние, $n = 1014$; 4 — незарегистрированный брак, $n = 243$; 5 — зарегистрированный брак, $n = 526$							
Риск изоляции	+	3,3%	13,2%	22,5%	16,9%	11,8%	$\chi^2 = 34,5$; $p = 0,000$ SE = 0,16
	–	96,7%	86,8%	77,5%	83,1%	88,2%	

Примечание: размер эффекта (SE) средний при $0,15 \leq \text{Cramers's } V \leq 0,25$.

Таблица 6. Специфика тревожных переживаний в зависимости от образования и возраста

Тип волнения о COVID-19		Представленность по группам						Критерий статистической значимости
		1	2	3	4	5	6	
Образование: 1 — неоконченное среднее, $n = 31$; 2 — среднее, $n = 98$; 3 — профессиональное, $n = 164$; 4 — неоконченное высшее, $n = 501$; 5 — высшее, $n = 1082$; 6 — степень, $n = 81$								
Риск изоляции	+	25,8%	24,5%	22,6%	24,0%	14,5%	6,2%	$\chi^2 = 35,1$; $p = 0,000$ SE = 0,14
	–	74,2%	75,5%	77,4%	76,0%	82,5%	93,8%	
Возраст: 1 — 18–20 лет, $n = 310$; 2 — 21–30 лет, $n = 859$; 3 — 31–40 лет, $n = 363$; 4 — 41–50 лет $n = 231$; 5 — 51–60 лет, $n = 136$; 6 — 60–78 лет, $n = 58$								
Риск изоляции	+	28,7%	20,0%	14,3%	8,2%	8,8%	12,1%	$\chi^2 = 54,0$; $p = 0,000$ SE = 0,18
	–	71,3%	80,0%	85,7%	91,8%	91,2%	87,9%	
Материальные трудности	+	31,3%	32,2%	30,6%	29,9%	30,9%	39,7%	$\chi^2 = 101,6$; $p = 0,000$ SE = 0,13
	–	68,7%	67,8%	69,4%	70,1%	69,1%	60,3%	

Примечание: размер эффекта (SE) средний при $0,13 \leq \text{Cramers's } V \leq 0,22$.

что очевидным образом диктует необходимость иных информационных и социальных интервенций.

В стратегическом плане ВОЗ по обеспечению готовности и реагирования на COVID-19 еще не определены какие-либо стратегии, направленные на возникшие потребности в области психического здоровья [13], хотя необходимость в них с большой долей вероятности будет возрастать как в процессе эпидемии, так и после ее завершения.

В доступной нам научной литературе отсутствуют данные о психологических реакциях на начальных этапах ухудшения эпидемиологической обстановки и объявления карантинных мероприятий как факта официального признания нарастания эпидемиологического неблагополучия. В Китае, который первым столкнулся с вопросами организации всех уровней медицинской помощи при распространении коронавируса, был разработан Принцип обеспечения поддержки психического благополучия. Он включал: 1) определение актуального статуса психического здоровья у населения; 2) определение круга лиц с высоким риском суицида и агрессии; 3) разработку структурированных мер помощи [14]. Но результативность оказания психологической помощи в этом регионе была признана недостаточной, что связывали с отсутствием опыта обучению принципам сохранения психического здоровья [15].

Таким образом, размеры и социальная гетерогенность группы риска обуславливают необходимость использовать для преодоления социально-психологических последствий пандемии широкие социальные интервенции, которые могут быть реализованы по принципу эшелонирования помощи: этап психо-социальной поддержки, специальной психологической помощи, а также клинично-психологическая помощь с привлечением психиатров. Как видно из опыта организации подобной работы в Китае, а также полученных нами данных, одним из препятствий организации эффективной поддержки населения может быть стигматизация/дискриминация [16].

Ограничения. Результаты исследования получены на основании самоотчетов респондентов. При том что степень корреляции самоотчетов с результатами объективных экспериментально-психологических обследований обычно бывает достаточно высока, дополнительная верификация анкетных сведений в ходе личной экспертной оценки исследователем могла бы повысить объективность полученных данных. В то же время подобная перекрестная оценка существенно ограничила бы размер выборки, представленность различных социальных групп, в том числе за счет переживания стигмы респондентами с аффективными расстройствами, кратно увеличила бы

период получения первых результатов. Кроме того, в условиях настоятельной рекомендации социального дистанцирования возможность проведения очных визитов, которые предполагают посещение респондентом клиники, крайне ограничена. К тому же скорость развития эпидемического процесса и возникновения психологических реакций населения в ответ на пандемию COVID-19 определяет важность оперативности проведения исследований и формулирования на их основе рекомендаций психолого-психиатрической помощи.

Следует отдельно отметить, что выявленная сила корреляций психологических реакций населения с практикуемыми мерами предотвращения заражения и частотой поиска информации о пандемии соответствовала лишь уровню слабой или умеренной ассоциации признаков. Подобная ситуация достаточно характерна для исследований психологии поведения человека. С одной стороны, это очевидным образом иллюстрирует недопустимость интерпретации корреляционной связи как причинно-следственной даже в рамках проведенного исследования, когда наблюдаемые признаки семантически тесно связаны. С другой стороны, выявленная сила связей подчеркивает многофакторный характер регуляции поведения, где ни один из параметров нельзя считать детерминирующим.

ВЫВОДЫ

Вмешательство в психологический кризис должно быть рассмотрено как часть ответных мер общественного здравоохранения на вспышку COVID-19. Первым шагом должно стать широкое привлечение авторитетных профессионалов в области инфекционных заболеваний, эпидемиологии и психического здоровья в СМИ с целью информирования граждан о действенных мерах по предупреждению развития инфекции и способах предотвращения развития стресса в противовес дилетантским суждениям, наводняющим Интернет. Кроме того, наши данные позволяют рекомендовать проведение коррекции дистрессовых опасений широко, но и более адресно, с преимущественным охватом лиц молодого возраста, женщин, лиц, не имеющих высшего образования, не занятых в трудовой или учебной деятельности, холостых и незамужних, а не только пациентов с аффективными расстройствами. Наиболее острая необходимость коррекции опасений о пандемии COVID-19 выявлена в случае возникновения беспокойства по поводу возможного отсутствия лекарств для ежедневного приема и

риска изоляции, поскольку эти типы переживаний связаны с максимальным нарастанием тревожного дистресса в обследованной выборке. Необходимы создание доступа к индивидуальному психологическому консультированию широких масс в онлайн-режиме на государственном

уровне и обеспечение психолого-психиатрической помощи нуждающимся при адекватном обеспечении эпидемиологической безопасности, поскольку психологическая стабильность способствует сохранению и физического здоровья населения.

Литература

- Chan JF-W, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020; 395 (10223): 514–23. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).
- Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). World Health Organization (WHO), 2020. Available from (assessed Feb 15, 2020): [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
- "WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19". World Health Organization (WHO) (Press release), 11 March 2020. Archived from the original on 11 March 2020. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- В России выявили двух первых больных коронавирусом. Доступно по ссылке: <https://www.interfax.ru/russia/693554>.
- COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
- Qiu J, Shen B, Zhao M, et al A nationwide survey of psychological distress among Chinese people in the COVID-19 epidemic: implications and policy recommendations. *General Psychiatry*. 2020; 33: e100213.
- Brooks SK, Webster RK, Smith LE, Woodland L, Wessely S, Greenberg N, et al. The Psychological Impact of Quarantine and How To Reduce It: Rapid Review of the Evidence. *The Lancet*. 2020; 395 (10227): 912–20. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30460-8).
- Yao H, Chen JH, Xu YF. Patients with mental health disorders in the COVID-19 epidemic. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (4): e21. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30090-0.
- Lai J, Ma S, Wang Y, Cai Z, Hu J, Wei N, et al. Factors Associated With Mental Health Outcomes Among Health Care Workers Exposed to Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open*. 2020; 3 (3): e203976. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.3976.
- Addressing Stigma. Centers for disease control and prevention. Available from: https://emergency.cdc.gov/cerc/cerccorner/article_123016.asp.
- Водопьянова Н. Е. Психодиагностика стресса. СПб.: Питер, 2009; 336 с.
- Link B, Cullen F, Frank J, Wozniak J. The Social Rejection of Former Mental Patients: Understanding Why Labels Matter. *American Journal of Sociology*. 1987; 92 (6): 1461–500. Retrieved April 12, 2020. Available from: www.jstor.org/stable/2779844.
- Novel coronavirus (2019-nCoV): strategic preparedness and response plan Feb 3, 2020. World Health Organization, 2019 [cited 2020 Feb 7]. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/srp-04022020.pdf>.
- Li W, Yang Y, Liu ZH, Zhao Y-J, Zhang Q, Zhang L, et al. Progression of Mental Health Services during the COVID-19 Outbreak in China. *Int J Biol Sci*. 2020; 16 (10): 1732–8. DOI: 10.7150/ijbs.45120.
- Chen Q, Liang M, Li Y, Cuo J, Fei D, Wang L, et al. Mental health care for medical staff in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (4): e15–e16. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30078-X.
- Kang L, Li Y, Hu S, Chen M, Yang C, Yang BX, et al. The mental health of medical workers in Wuhan, China dealing with the 2019 novel coronavirus. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (3): e14. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30047-X.

References

- Chan JF-W, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020; 395 (10223): 514–23. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).
- Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV). World Health Organization (WHO), 2020. Available from (assessed Feb 15, 2020): [https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)).
- "WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19". World Health Organization (WHO) (Press release), 11 March 2020. Archived from the original on 11 March 2020. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- V Rossii vyjavili dvuh pervyh bol'nyh koronavirusom. Available from: <https://www.interfax.ru/russia/693554>. Russian.
- COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Available from: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
- Qiu J, Shen B, Zhao M, et al A nationwide survey of psychological distress among Chinese people in the COVID-19 epidemic: implications and policy recommendations. *General Psychiatry*. 2020; 33: e100213.
- Brooks SK, Webster RK, Smith LE, Woodland L, Wessely S, Greenberg N, et al. The Psychological Impact of Quarantine and How To Reduce It: Rapid Review of the Evidence. *The Lancet*. 2020; 395 (10227): 912–20. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30460-8).
- Yao H, Chen JH, Xu YF. Patients with mental health disorders in the COVID-19 epidemic. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (4): e21. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30090-0.
- Lai J, Ma S, Wang Y, Cai Z, Hu J, Wei N, et al. Factors Associated With Mental Health Outcomes Among Health Care Workers Exposed to Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw Open*. 2020; 3 (3): e203976. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.3976.
- Addressing Stigma. Centers for disease control and prevention. Available from: https://emergency.cdc.gov/cerc/cerccorner/article_123016.asp.
- Vodopjanova NE. Psihodiagnostika stressa. SPb.: Piter, 2009; 336 s. Russian.
- Link B, Cullen F, Frank J, Wozniak J. The Social Rejection of Former Mental Patients: Understanding Why Labels Matter.

- American Journal of Sociology. 1987; 92 (6): 1461–500. Retrieved April 12, 2020. Available from: www.jstor.org/stable/2779844.
13. Novel coronavirus (2019-nCoV): strategic preparedness and response plan Feb 3, 2020. World Health Organization, 2019 [cited 2020 Feb 7]. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/srp-04022020.pdf>.
 14. Li W, Yang Y, Liu ZH, Zhao Y-J, Zhang Q, Zhang L, et al. Progression of Mental Health Services during the COVID-19 Outbreak in China. *Int J Biol Sci*. 2020; 16 (10): 1732–8. DOI: 10.7150/ijbs.45120.
 15. Chen Q, Liang M, Li Y, Cuo J, Fei D, Wang L, et al. Mental health care for medical staff in China during the COVID-19 outbreak. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (4): e15–e16. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30078-X.
 16. Kang L, Li Y, Hu S, Chen M, Yang C, Yang BX, et al. The mental health of medical workers in Wuhan, China dealing with the 2019 novel coronavirus. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7 (3): e14. DOI: 10.1016/S2215-0366(20)30047-X.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ УСТРОЙСТВ УЧАСТНИКАМИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ТРАДИЦИОННОЙ И ДИСТАНЦИОННОЙ ФОРМАХ ОБУЧЕНИЯ

О. Ю. Милушкина¹, В. И. Попов², Н. А. Скоблина¹, С. В. Маркелова¹✉, Н. В. Соколова³

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия

³ Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

Внедрение дистанционного обучения весной 2020 г. привело к увеличению интенсивности использования информационно-коммуникационных технологий участниками образовательного процесса. Цель работы — дать гигиеническую характеристику использования электронных устройств школьниками, их родителями и учителями организаций общего образования в условиях различных режимов обучения (традиционного и дистанционного). В исследовании посредством онлайн-опроса приняли участие 200 школьников, 389 учителей и 251 родитель в период традиционного обучения, 658 учителей и 500 родителей — в период дистанционного обучения. При статистической обработке результатов использовали t -критерий Стьюдента, критерий χ^2 , коэффициент сопряженности Пирсона, относительный риск определяли с помощью четырехпольных таблиц сопряженности, $p \leq 0,05$. В период дистанционного обучения увеличилось число используемых электронных устройств у 96,6% школьников и время работы с ними. Увеличение числа жалоб на самочувствие учащихся отметили до 80% родителей, из них более 60% указывали на симптомы, характерные для компьютерно-зрительного синдрома. Установлена связь между возможностью отказа от использования электронного устройства и субъективной оценкой респондентами своего зрения как «отличное» и «хорошее» (КС Пирсона 0,3; $p \leq 0,05$). Подтвержден риск субъективной оценки зрения как «удовлетворительное» и «плохое» при ежедневном использовании электронного устройства: для школьников — 1,13, родителей — 1,41, учителей — 1,27 ($p \leq 0,05$). Обоснован в качестве меры профилактики нарушения зрения отказ от использования электронного устройства минимум на один день в неделю.

Ключевые слова: школьники, учителя, родители, дистанционное обучение, поведенческие риски, электронные устройства, информационно-коммуникационные технологии

Вклад авторов: О. Ю. Милушкина, В. И. Попов, Н. А. Скоблина — планирование и научное руководство, обработка материала, написание статьи; С. В. Маркелова, Н. В. Соколова — анализ литературных данных, сбор и обработка материала. Все авторы — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 159 от 21 ноября 2016 г.). Проведение опроса не ущемляло права человека, не подвергало опасности респондентов, соответствовало требованиям биомедицинской этики.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Валерьевна Маркелова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; markelova_sv@rsmu.ru

Статья получена: 14.05.2020 **Статья принята к печати:** 15.06.2020 **Опубликована онлайн:** 28.06.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.037

THE USE OF ELECTRONIC DEVICES BY STUDENTS, PARENTS AND TEACHERS BEFORE AND AFTER THE TRANSITION TO DISTANCE LEARNING

Milushkina OYu¹, Popov VI², Skoblina NA¹, Markelova SV¹✉, Sokolova NV³

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

³ Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, Russia

Transition to distance education in spring 2020 led to the overuse of information and communication technologies by the participants of the educational process. The aim of this study was to characterize the patterns of using electronic devices in high school students, their parents, and teachers in the settings of traditional brick-and-mortar education and distance learning. We created online questionnaires that were used to survey 200 high school students, 389 teachers and 251 parents before the transition to distance learning and also 658 teachers and 500 parents after the transition. Statistical analysis was conducted using Student's t test, χ^2 , and Pearson's contingency coefficient; relative risks were calculated using fourfold contingency tables. Differences were considered significant at $p \leq 0,05$. After the transition to distance learning, the number of electronic devices used by each student increased for 96.6% of the surveyed students; the average screen time also increased. About 80% of the surveyed parents reported that their children had more health complaints; of them, 60% reported symptoms typical of computer vision syndrome. We established a correlation between the readiness to cut down on screen time and the subjective assessment of vision as perfect or good by the respondents (Pearson's contingency coefficient 0.3; $p \leq 0.05$). Our study confirms the relative risk for subjectively assessing one's vision as satisfactory or poor in individuals who use ED on a daily basis; the risk is 1.13 for students, 1.41 for parents, and 1.27 for teachers ($p \leq 0.05$). The study proves that eliminating screen time from daily activities for at least one day per week is an effective measure for preventing vision disorders.

Keywords: students, teachers, parents, distance learning, health risk behavior, electronic devices, information and communication technologies

Author contribution: Milushkina OYu, Popov VI, Skoblina NA planned and supervised the study, analyzed the obtained data and wrote the manuscript; Markelova SV, Sokolova NV analyzed the literature, collected and processed the questionnaires. All authors participated in manuscript revision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 159 dated November 21, 2016). The survey did not encroach upon human rights, did not expose the respondents to any dangers and complied with the principles of biomedical ethics.

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana V. Markelova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; markelova_sv@rsmu.ru

Received: 14.05.2020 **Accepted:** 15.06.2020 **Published online:** 28.06.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.037

Юридические основы реализации образовательных программ с применением электронного обучения и дистанционных образовательных технологий были впервые закреплены Федеральным законом Российской Федерации еще в 2012 г. [1]. Однако были отмечены неготовность педагогического сообщества к предложенным формам обучения и низкая гигиеническая грамотность педагогов в вопросах безопасного использования электронных устройств, профилактики их неблагоприятного воздействия на организм человека [2].

Информационно-коммуникационные технологии (ИКТ) были постепенно введены в образовательный процесс, и сегодня обучение уже нельзя представить без компьютеров и интерактивных досок, интернета, аудио- и видео ресурсов. Смартфоны, планшеты, компьютеры стали частью повседневной жизни детей, подростков и молодежи. В России около 10 млн детей в возрасте до 14 лет — активные пользователи интернета [2–6].

Многофакторность проблемы электронного обучения определяет нерешенность вопросов ее гигиенического регламентирования. Внедряемые в деятельность образовательных организаций новые формы профилактической работы не могут решить всего комплекса существующих проблем [7–11].

Эпидемиологическая ситуация, возникшая весной 2020 г., послужила основанием для спонтанного вынужденного перехода на дистанционное образование (ДО) в период самоизоляции, что повлекло за собой бесконтрольное и необоснованно широкое использование ИКТ всеми группами населения, включая учащихся. Зарубежные публикации о вынужденном переходе на ДО в основном посвящены экономическим (сокращение штата и средств), а также педагогическим аспектам (сравнение результатов итогового тестирования при традиционном обучении (ТО) и ДО), не затрагивают вопросов профилактики и увеличения жалоб на состояние здоровья обучающихся [12–13].

Массовое распространение электронных устройств (ЭУ), подкрепляемое профессиональной и социальной необходимостью, на фоне низкой грамотности населения в вопросах их безопасного использования служит предпосылкой к увеличению числа заболеваний по целому ряду нозологий. В литературных данных представлены сведения об ухудшении психофизиологического состояния молодежи: повышении среди пользователей ЭУ нервно-эмоционального напряжения, раздражительности, нарушениях сна, появлении зависимости [14–19]. Ограничение двигательной активности, неудобная статическая поза негативно сказываются на состоянии опорно-двигательной, дыхательной и сердечно-сосудистой систем, снижается внимание, ослабляется память [20–23]. Качество изображения на экране монитора, удаленность экрана от глаз, уровень освещенности рабочей поверхности, время непрерывной работы с ЭУ являются факторами риска развития заболеваний органов зрения [24–27].

Высокие уровни заболеваний органов зрения, отмечаемые на протяжении последних 15 лет среди детей и подростков, тоже совпали с массовым распространением ЭУ [28–29].

Возросли объемы информационных нагрузок на обучающихся, связанные с увеличением частоты использования ИКТ посредством применения стационарных и мобильных ЭУ. При этом существующие на сегодняшний

день гигиенические требования по регламентации продолжительности применения ЭУ в образовательном процессе не выполняются [28].

Использование ЭУ любой категорией населения, особенно детьми, должно предусматривать информированность о возможном негативном влиянии ЭУ на здоровье и сформированность навыков их безопасного использования, особенно при дистанционном обучении, когда отсутствует контроль со стороны учителя за соблюдением гигиенических требований. Данная ситуация накладывает большую ответственность на родителей, которые должны обладать знаниями в вопросах здоровьесбережения и создать ребенку дома максимально комфортные условия для обучения с точки зрения сохранения его здоровья.

В настоящее время в России исследование гигиенических аспектов массового перехода в 2020 г. на ДО не проводили.

Целью исследования было дать гигиеническую характеристику использования ЭУ школьниками, их родителями и учителями организаций общего образования в условиях различных режимов обучения (традиционного и дистанционного).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На кафедре гигиены педиатрического факультета РНИМУ им. Н. И. Пирогова преподавателями, имеющими сертификат специалиста «Гигиеническое воспитание», «Гигиена детей и подростков», «Общая гигиена», было разработано пять вариантов опросников, размещенных на онлайн-сервисе Google Forms. Чувствительность онлайн-анкет по отношению к бланковому опросу составила не менее 82% (DI: 80,5–83,5), специфичность — не менее 90% (DI: 88,1–92,2). Анкеты имели четкую адресованность в период ТО (для школьников, родителей и учителей, Приложение 1) и в период ДО (для родителей и учителей, Приложение 2). Критерии включения в исследование: принадлежность респондента к школьникам, родителям школьника, учителям организации общего образования; корректность заполнения формы. Критерии исключения: отсутствие принадлежности к опрашиваемой категории респондентов; некорректное заполнение опросника. Опросники включали блоки: «паспортная часть»; «здоровье»; вопросы, характеризующие особенности использования ИКТ с применением стационарных и мобильных ЭУ; сформированность практических навыков безопасного использования ЭУ.

Проведение традиционного обучения в 2019 г.

В период ТО опросили 200 школьников 9–11 классов из восьми субъектов РФ, включая города-миллионники; 43% проходили обучение в организациях общего образования, остальные — в гимназиях, лицеях, школах с углубленным изучением предметов и пр.

Среди 251 родителя, проживающего в 15 субъектах РФ, включая города-миллионники, основная доля (86%) относилась к возрастной группе 30–49 лет. Более 85% из них — женщины.

Среди 389 учителей, проживающих в 25 субъектах РФ, включая города-миллионники, наибольшая доля относилась к возрастной группе 40–49 лет (31%). Более 90% из них — женщины.

Проведение дистанционного обучения в 2020 г.

В этот период опросили 500 родителей более чем из 15 регионов РФ, включая города-миллионники. Основную долю составляли женщины (более 90%). Доля опрошенных, относящихся к возрастной группе 30–49 лет, — 89%.

Проводили опрос 658 учителей более чем из 30 регионов РФ, включая города-миллионники. Основную долю среди них составили женщины (более 85%). Наибольшая часть опрошенных относилась к возрастной группе 40–49 лет (32%).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 13.0. (StatSoft Inc.; США). Использовали t -критерий Стьюдента, критерий χ^2 , коэффициент сопряженности Пирсона. Относительный риск (RR-вероятность появления определенного исхода в зависимости от фактора среды) определяли с использованием четырехпольных таблиц сопряженности. Критический уровень значимости принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период ТО респондентам были предложены вопросы, касающиеся наличия практических навыков безопасного применения ЭУ и профилактики нарушения здоровья, обусловленного работой с ними.

Установлено, что при использовании ЭУ большинство школьников и родителей (64,5 и 63,0% соответственно) не делают рекомендуемый перерыв в работе каждый час, а каждый шестой школьник (17,0%) и родитель (17,5%) работают с ЭУ вообще без перерыва (табл. 1).

Среди учителей не прерывают работу с ЭУ каждый час более половины (53,1%) и каждый седьмой (15,2%) работает без перерыва вообще (см. табл. 1).

Выявлено, что только каждый восьмой школьник (13%) и родитель (12,7%) предпочтут воздержаться от работы с ЭУ в условиях недостаточной освещенности, что соответствует гигиеническим рекомендациям, в то время как каждый третий школьник (37%) и каждый пятый родитель (20,7%) продолжают работать при любых условиях (см. табл. 1).

Каждый пятый учитель (18,8%) отметил, что прекратит работу с ЭУ в условиях недостаточной освещенности, а каждый восьмой (12,9%) продолжит ее при любых условиях (см. табл. 1).

Большинство педагогов (86,6%) считают необходимым проведение среди подрастающего поколения работы по формированию здорового образа жизни начиная с раннего детского возраста. В то же время почти треть учителей (26,5%) во время уроков не проводят динамических пауз, а около половины (44,4%) — гимнастику для глаз, т. е. не предпринимают действий, направленных на охрану зрения школьников в рамках имеющихся должностных

обязанностей. При этом большинство опрошенных учителей (67,5%) отмечают у современных школьников наличие проблем со здоровьем.

Субъективная оценка качества своего зрения, проведенная в период ТО, показала, что около половины школьников (51%) и родителей (48,6%) оценивают свое зрение как «отличное» (24,5 и 19,5% соответственно) и «хорошее» (26,5 и 29,1% соответственно). Каждый шестой школьник (18,0%) и каждый третий родитель (31,5%) оценили его на «удовлетворительно»; указали, что зрение у них «плохое», каждый третий школьник (31,0%) и каждый пятый родитель (19,9%). Опрос, проведенный среди учителей, показал, что из них оценивают свое зрение как «отличное» 10,7%, «хорошее» — 29,9%, «удовлетворительно» — 46,0%, «плохое» — 13,4% (см. табл. 1).

Указали, что не нуждаются в коррекции зрения только половина школьников (49,0%), доля которых соотносится с количеством учащихся, оценивших свое зрение как «отличное» и «хорошее». При работе с ЭУ только 5,5% школьников отметили, что пользуются специально подобранными очками, в то время как остальные либо отрицали использование специально подобранных очков, либо отмечали, что никогда очками не пользовались (см. табл. 1).

Аналогичный опрос родителей и учителей показал, что 47,4 и 40,6% из них соответственно не нуждаются в коррекции зрения, что сопоставимо с долей респондентов, оценивших свое зрение как «отличное» и «хорошее». При работе с ЭУ только 7,5% родителей и 11,0% учителей пользуются специально подобранными очками, остальные ими не пользуются, хотя этого и требует острота их зрения, или пользуются очками, не предназначенными для работы с ЭУ, например, подобранными «для зрения вдаль» (см. табл. 1).

Путем построения таблиц сопряженности установлено, что около 50% школьников, родителей и учителей не уделяют должного внимания проблеме снижения у них остроты зрения, используют неэффективные средства коррекции зрения при работе с ЭУ ($p \leq 0,05$).

Проведенный опрос позволил распределить респондентов на группы в зависимости от возможности отказа от использования ЭУ (табл. 2).

Сравнительная оценка результатов опроса родителей и учителей выявила достоверные различия в субъективной оценке респондентами качества своего зрения, а также в возможности отказаться от использования ЭУ на день в неделю и более ($p \leq 0,05$) (см. табл. 2).

Среди школьников, родителей и учителей, указавших, что не могли бы обойтись без ЭУ ни одного дня, треть (37,5, 38,1 и 36,0% соответственно) субъективно оценивали свое зрение как «отличное» и «хорошее», а среди тех, кто мог бы обойтись без ЭУ больше трех дней, таких ответов было достоверно больше (64,0, 58,75 и 48,0% соответственно) ($p \leq 0,05$).

Таблица 1. Субъективная оценка своего зрения и распространенность поведенческих факторов риска бесконтрольного использования ЭУ школьниками, родителями и учителями в период традиционного обучения, %

Фактор риска	Школьники	Родители	Учителя
Отсутствие рекомендованных перерывов в работе	64,5 ± 3,4	63,0 ± 3,1	53,1 ± 2,5*
Работа с ЭУ в условиях недостаточного освещения	87,0 ± 2,4	87,3 ± 2,1	81,2 ± 2,0*
Использование очков, специально подобранных для работы с ЭУ	5,5 ± 1,6	7,5 ± 1,7	11,0 ± 1,6
Субъективная оценка своего зрения как «удовлетворительное» и «плохое»	49,0 ± 3,5	51,4 ± 3,2	59,4 ± 2,5*

Примечание: * — различия достоверны, $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Субъективная оценка респондентами своего зрения и доля школьников, родителей и учителей, допускающих отказ от использования ЭУ, %

Отказ от использования ЭУ	Школьники	Родители	Учителя
– не допускают	24,0 ± 3,0	41,8 ± 3,1	38,4 ± 2,5
– допускают на 1–3 дня	38,5 ± 3,4	33,1 ± 3,0	47,8 ± 2,5*
– допускают на 3 дня и больше	37,5 ± 3,4	25,1 ± 2,7	33,5 ± 2,4*
Субъективная оценка своего зрения как «хорошее» и «отличное»	51,0 ± 3,5	48,6 ± 3,2	40,6 ± 2,5*

Примечание: * — различия достоверны, $p \leq 0,05$.

Установлена связь между возможностью отказа от использования ЭУ и субъективной оценкой респондентами своего зрения как «отлично» и «хорошо» (коэффициент сопряженности Пирсона 0,3; $p \leq 0,05$).

В период ДО отмечено достоверное увеличение числа ЭУ, используемых школьниками для целей обучения (табл. 3).

В период ДО время работы школьников с ЭУ тоже увеличилось. По мнению родителей, оно возросло на 2 ч у 15,0% школьников, на 3 ч у 20,8%, на 4 ч у 18,6%, на 5 ч у 10,0%, на 6 ч и более часов у 25,0% учащихся.

При этом у учителей среднее время использования мобильных ЭУ, согласно приложению «Экранное время», в период ТО составило 5,0 ± 0,3 ч, а в период проведения ДО — 8,0 ± 0,3 ч ($p \leq 0,01$).

По субъективной оценке подавляющего большинства родителей (80%), в период ДО увеличилось число жалоб школьников на самочувствие. По характеру проявлений жалобы можно разделить на группы, характерные для компьютерно-зрительного синдрома (усталость глаз — 60,6%, боли в области глаз — 27,0%, расплывчатость изображения — 19,4%, ощущение мелькания перед глазами — 11,4%, ощущение песка в глазах — 16,2%), нарушений опорно-двигательного аппарата (боль в спине — 37,6%, боль в шее — 31,8%), поражений нервно-психической сферы (головные боли — 40,2%, тяжесть в голове — 21,0%, заложенность и шум в ушах — 7,8%, быстро развивающееся утомление — 58,0%, нервно-психическое напряжение — 49,8%, нарушения режима сна и трудности засыпания — 30,4%). Только 17,2% школьников жалоб не имели.

В ходе оценки риска здоровью использования ИКТ установлены статистически значимые величины относительного риска для субъективной оценки зрения как «удовлетворительное» и «плохое» от различной частоты использования ЭУ (ежедневно или при наличии перерывов в 1–3 дня и более). Величина относительного риска для субъективной оценки зрения «удовлетворительное» и «плохое» при ежедневном использовании ЭУ у школьников составила 1,13 (ДИ: 1,07–1,47); у родителей — 1,41 (ДИ: 1,11–1,79); для учителей — 1,27 (ДИ: 1,07–1,52).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активно развивающиеся на протяжении последних 20 лет ИКТ на базе различных ЭУ получили широкое распространение в повседневной жизни и образовательном

процессе. Эпидемиологическая ситуация, возникшая весной 2020 г., способствовала введению ДО в работу организаций общего образования.

Ранее, в период ТО, было показано, что только 0,5% учащихся не имеют доступа к ЭУ, остальные применяют от одного до нескольких ЭУ ежедневно. Продолжительность использования ЭУ школьниками сопоставима с использованием ЭУ взрослыми пользователями и составляет 7–10 ч в день в зависимости от возраста, пола, учебного или каникулярного периода [19, 25]. Увеличивается продолжительность использования ЭУ [30].

В период ДО практически у всех учащихся (96,6%) увеличилось число используемых ЭУ от одного до трех и более ($p \leq 0,05$) (см. табл. 3), возросло время работы с ними от 2 ч (15,0% школьников) до 6 ч и более (у 25,0%). В результате большинство родителей (80%) отметило увеличение числа жалоб на плохое самочувствие школьников. Наибольшее число жалоб (60%) вписывалось в клиническую картину компьютерно-зрительного синдрома, поражения опорно-двигательного аппарата и нервно-психических нарушений.

Согласно мобильному приложению «Экранное время», продолжительность работы с ЭУ учителей увеличилась на 3 ч в день ($p \leq 0,01$).

Подобная ситуация является следствием бесконтрольного использования ЭУ, возникшего в том числе в результате введения режима «самоизоляции» и вынужденного перехода на ДО, использования неадаптированных для ДО образовательных технологий и программ по причине их отсутствия. Также необходимо отметить отсутствие четких критериев регламентирования времени работы с ЭУ в зависимости от возраста, периода обучения (учебный или каникулярный), требований безопасности к качеству изображения на экране, недостаточность критериев оценки технических характеристик ЭУ, а также низкую информированность населения и отсутствие сформированности у него навыков безопасного использования ЭУ.

«В ходе исследования среди всех групп респондентов отмечена высокая потребность в использовании ЭУ. Каждый четвертый школьник (24,0%), каждый второй родитель (41,8%) и каждый третий учитель (38,4) не готовы отказаться от ежедневного использования ЭУ (см. табл. 2).

Опрос учителей, школьников и их родителей, проведенный в периоды ТО и ДО, выявил наличие поведенческих факторов риска для здоровья от

Таблица 3. Доля школьников, использующих различное число ЭУ при традиционной и дистанционной формах обучения, по данным опроса родителей, %

Число используемых при обучении ЭУ	Традиционное обучение	Дистанционное обучение
Не используют ЭУ	36	3,4*
Используют одно ЭУ	47,4	29,8*
Используют два ЭУ	11,4	51,8*
Используют три и более ЭУ	5,2	15,0*

Примечание: * — различия достоверны, $p \leq 0,05$.

бесконтрольного использования ИКТ посредством применения различных видов ЭУ.

Установлено несоблюдение правил безопасного использования ЭУ большинством респондентов: отсутствие перерыва после каждого часа работы с ЭУ (64,5% школьников, 63,0% родителей, 53,1% учителей); работа в условиях недостаточной освещенности (87,0, 87,3 и 81,2% соответственно); отсутствие необходимых средств коррекции зрения или использование очков, не предназначенных для работы с ЭУ (45,5%, 44,8% и 48,4% соответственно).

Доказано более широкое распространение поведенческих факторов риска бесконтрольного использования ЭУ среди родителей школьников в сравнении с учителями ($p \leq 0,05$), а также более частая субъективная оценка ими своего зрения как «удовлетворительное» и «плохое» ($p \leq 0,05$) (см. табл. 1).

Роль семьи, образовательной организации, личный пример родителей и учителей в формировании основ безопасного использования ЭУ очевидны. Установлена низкая настороженность респондентов к этой проблеме, что требует повышения эффективности мер просветительного характера среди учителей, родителей и учащихся. Особую актуальность приобретает повышение информированности родителей об основах безопасного использования ЭУ в связи с распространением электронного обучения, снижением контролирующей функции учителя, увеличением доли ИКТ в досуговом времени детей.

Большинство учителей указывают на наличие у детей нарушений в состоянии здоровья (67,5%), осознают потребность в формировании у них основ здорового образа жизни, к которым относится и безопасность работы с ЭУ (86,6%). В то же время, вопреки имеющимся профессиональным обязанностям, треть педагогов (26,5%) не проводит с детьми во время уроков динамические паузы, а каждый второй учитель (44,4%) — гимнастику для глаз. Вероятно, подобная ситуация стала возможной вследствие низкой заинтересованности учителей в соблюдении гигиенических требований, высокой интенсивности образовательного процесса.

Следствием недостаточной информированности населения является и отмеченная среди 50% респондентов низкая настороженность в вопросах профилактики уже имеющихся нарушений зрения, обусловленных в том числе использованием неэффективных средств коррекции зрения при работе с ЭУ ($p \leq 0,05$).

Ранее было доказано наличие риска возникновения миопии средней и высокой степеней ($RR - 6,62$) в зависимости от частоты использования ноутбука и компьютера ($p \leq 0,05$) [25].

Изучение зависимости между возможностью отказа респондента от использования ЭУ и субъективной оценкой качества своего зрения на «хорошо» и «отлично» позволяет говорить о наличии действенного механизма профилактики нарушения зрения у пользователей ЭУ путем регламентирования времени работы с ним. Так, среди респондентов, допускающих отказ от использования ЭУ в течение одного дня в неделю и более, доля субъективных оценок качества зрения на «хорошо» и «отлично» оказалась достоверно больше ($p \leq 0,05$).

Установлено наличие статистически значимых величин относительного риска (RR) возникновения состояния, субъективно характеризующегося как «удовлетворительное» и «плохое» зрение, от ежедневного использования ЭУ: для школьников — 1,13, для родителей — 1,41, для учителей — 1,27 ($p \leq 0,05$).

Таким образом, можно констатировать выявление управляемого с точки зрения гигиенических принципов поведенческого фактора риска — ежедневное использование ЭУ.

Полученные данные позволяют рекомендовать как в период проведения ТО, так и в период ДО в качестве мероприятия по профилактике неблагоприятного влияния факторов риска использования ИКТ с применением различных ЭУ введение регуляторного механизма, направленного на сокращение времени использования ЭУ, вплоть до отказа от их применения минимум на один день в неделю. Данное мероприятие позволит не только сократить время контакта с неблагоприятными факторами, но и выделить в режиме дня время для занятий физической активностью и спортом, что, безусловно, повысит эффективность мер профилактики путем улучшения образа жизни, а значит окажет благоприятное воздействие на здоровье населения.

Повысив информированность населения в вопросах безопасного использования ЭУ, предложив эффективные меры учета и контроля времени работы с ЭУ, возможно ожидать увеличения числа респондентов с сформированными навыками безопасного использования ЭУ.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены поведенческие факторы риска бесконтрольного использования ИКТ всеми участниками образовательного процесса, особенно в период вынужденного перехода на ДО: отсутствие перерывов в работе с ЭУ, работа в условиях недостаточной освещенности, отсутствие специально подобранных средств коррекции зрения для работы с ЭУ, ежедневное использование ЭУ, длительность непрерывной работы с ЭУ, количество используемых ЭУ.
2. В период ДО по сравнению с ТО у школьников увеличилось количество используемых ЭУ и длительность их применения, возросло число жалоб на самочувствие. Увеличилось время использования ЭУ учителями.
3. Показана достоверно более низкая сформированность навыков безопасного использования ЭУ у родителей, что не позволяет им быть примером для подражания, а также контролировать безопасность использования ЭУ детьми дома.
4. Доказана эффективность отказа от использования ЭУ на один день в неделю и более с целью профилактики нарушения зрения.
5. Обоснована необходимость расширения спектра учебных дисциплин, направленных на формирование у обучающихся компетенций здоровьесбережения и гигиенического способа мышления в вопросах цифровой безопасности, а также обучения по данной теме педагогов, формирования культуры и навыков использования ЭУ родителями.

Литература

1. Федеральный закон «Об образовании в Российской Федерации» № 273 ФЗ от 29.12.2012. Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174/.
2. Кучма В. Р. Декларация о гигиенической безопасности для детей и подростков цифровой среды. Вопросы школьной и университетской медицины. 2014; 3: 62–63.
3. Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Храмцов П. И. Гигиеническая безопасность жизнедеятельности детей в цифровой среде. Здоровье населения и среда обитания. 2016; 8 (281): 4–7.
4. Бухтияров И. В., Денисов Э. И., Еремин А. Л. Основы информационной гигиены: концепции и проблемы инноваций. Гигиена и санитария. 2014; 93 (4): 5–9.
5. Большаков А. М., Крутько В. Н., Кутепов Е. Н., Мамиконян О. А., Потемкина Н. С., Розенблит С. И. и др. Информационные нагрузки как новый актуальный раздел гигиены детей и подростков. Гигиена и санитария. 2016; 2: 172–7.
6. Саньков С. В. Гигиеническая безопасность электронной информационно-образовательной среды в современной школе (научный обзор). Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья. 2018; 2: 13–20.
7. Концепция информационной безопасности детей. Распоряжение правительства РФ № 2471-р (02 декабря 2015). Доступно по ссылке: <http://static.government.ru/media/files/mPbAMyJ29uSPhL3p20168GA6hv3CtBxD.pdf>.
8. Янушанец О. И., Петрова Н. А., Беззубенкова Е. Ф., Нелюбова Е. А., Широкова А. Ю. Гигиеническая оценка технического оснащения реализации информационных технологий, используемых в обучении школьников. В сборнике: Профилактическая медицина–2019: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 14–15 ноября 2019 года. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2019: 244–50.
9. Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Храмцов П. И. Современные подходы к обеспечению гигиенической безопасности жизнедеятельности детей в гиперинформационном обществе. Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья. 2015; 3: 22–27.
10. Кучма В. Р., Текшева Л. М., Курганский А. М., Петренко А. О. Гигиеническая оценка использования ридеров в начальной школе. Гигиена и санитария. 2014; 93 (3): 57–60.
11. Кучма В. Р., Рапопорт И. К., Соколова С. Б., Александрова И. Э., Макарова А. Ю., Мустафаева К. Ш. и др. Распространенность и оценка использования электронных устройств в учебной и досуговой деятельности школьников 7–8 классов. Сеченовский вестник. 2015; 3 (21): 43–50.
12. Laks M, Guerra CM, Miraglia JL, Medeiros EA. Distance Learning in Antimicrobial Stewardship: Innovation in Medical Education. PMID: 31174524; PMCID: PMC6555969; DOI: 10.1186/s12909-019-1623-x.
13. Maria B, Oleksandr K, Valentina E, Olena Y. Distance-pedagogical technologies in olympic education for schoolchildren. Journal of Physical Education and Sport. Journal of Physical Education and Sport. 2019; 378 (4): 2497–503. Ukraine.
14. Дружилов С. А. Гигиенические аспекты информационно-технологической зависимости человека в новой реальности. Гигиена и санитария. 2019; 98 (7): 748–53.
15. Смирнова А. А., Синогина Е. С. Влияние компьютера и сети интернет на физическое и психическое здоровье школьников. Народное образование. 2017; 1 (2): 199–204.
16. Кучма В. Р., Ткачук Е. А., Тармаева И. Ю. Психофизиологическое состояние детей в условиях информатизации их жизнедеятельности и интенсификации образования. Гигиена и санитария. 2016; 12: 1183–8.
17. Lemola S, Perkinson-Gloor N, Brand S, Dewald-Kaufmann JF, Grob A. Adolescents' electronic media use at night, sleep disturbance, and depressive symptoms in the smartphone age. J Youth Adolesc. 2015; 44 (2): 405–18.
18. Шутова Н. В., Баранова Ю. М. Оценка риска интернет-зависимости для психического здоровья подростков. Гигиена и санитария. 2017; 96 (6): 568–72.
19. Кучма В. Р., Степанова М. И., Сазанок З. И., Поленова М. А., Александрова И. Э., Березина Н. О. и др. Гигиеническая оценка влияния учебных изданий с использованием электронных планшетов на функциональное состояние учащихся. Сеченовский вестник. 2015; 3 (21): 35–42.
20. Rideout VJ, Foehr UG, Roberts DF. Generation M2: Media in the Lives of 8- to 18-Year-Old. Henry J. Kaiser Family Foundation, Menlo Park, California. 2010. Available from: <http://www.kff.org/entmedia/upload/8010.pdf>.
21. Pope-Ford R. Back flexion and extension: The effects of static posture on children using mobile devices. In: Advances in Intelligent Systems and Computing. AHFE International Conference on Safety Management and Human Factors, 2018; Orlando; United States; 21–25 July 2018. 2019; 791: 342–51.
22. Бутуханов В. Д. К вопросу валеологических проблем двигательной активности и здоровья школьников. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук. 2009; 2: 227–8.
23. Милушкина О. Ю., Скоблина Н. А., Маркелова С. В., Татаринчик А. А., Бокарева Н. А., Федотов Д. М. Оценка рисков здоровью школьников и студентов при воздействии обучающих и досуговых информационно-коммуникационных технологий. Анализ риска здоровью. 2019; 3: 135–43.
24. Wimalasundera S. Computer vision syndrome. Galle Medical. 2006; 11 (1): 201–4.
25. Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю., Татаринчик А. А., Федотов Д. М., Цамерян А. П., Добрук И. В. и др. Гигиенические проблемы охраны зрения школьников и студентов в условиях гиперинформационного общества. Российская детская офтальмология. 2017; 4: 5–9.
26. Текшева Л. М., Эльксина Е. В., Перминов М. А. Гигиенические аспекты использования компьютерных средств обучения в системе общего образования. Гигиена и санитария. 2007; 4: 65–69.
27. Маркелова С. В. Роль печатных и электронных изданий в формировании функциональных нарушений и хронических заболеваний органа зрения обучающихся. Фундаментальная и клиническая медицина. 2019; 4 (4): 97–104.
28. Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Рапопорт И. К., Шубочкина Е. И., Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю. Популяционное здоровье детского населения, риски здоровью и санитарно-эпидемиологическое благополучие обучающихся: проблемы, пути решения, технологии деятельности. Гигиена и санитария. 2017; 96 (10): 990–5.
29. Здравоохранение в России 2017: статистический сборник. Росстат. М., 2017. Доступно по ссылке: <https://www.gks.ru/storage/mediabank/zdrav17.pdf>.
30. Лукьянец Г. Н., Макарова Л. В., Параничева Т. М., Тюрина Е. В., Шибалова М. С. Влияние гаджетов на развитие детей. Новые исследования. 2019; 1: 57: 25–35.

References

1. Federal'nyj zakon «Ob obrazovanii v Rossijskoj Federacii» # 273 FZ ot 29.12.2012. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174/. Russian.
2. Kuchma VR. Deklaracija o gigenicheskoj bezopasnosti dlja detej i podrostkov cifrovoj sredy. Voprosy shkol'noj i universitetskoy mediciny. 2014; 3: 62–63. Russian.
3. Kuchma VR, Suhareva LM, Hramcov PI. Gigenicheskaja bezopasnost' zhiznedejatel'nosti detej v cifrovoj srede. Zdorov'e naselenija i sreda obitanija. 2016; 8 (281): 4–7. Russian.
4. Buhtjarov IV, Denisov JE, Eremin AL. Osnovy informacionnoj gigeny: koncepcii i problemy innovacij. Gigena i sanitarija. 2014; 93 (4): 5–9. Russian.

5. Bolshakov AM, Krutko VN, Kutepov EN, Mamikonova OA, Potemkina NS, Rozenblit SI et al. Informational hygiene as a new topical branch of hygiene of children and adolescents. *Gigiena i sanitarija*. 2016; 2: 172–7. Russian.
6. Sankov SV. *Gigienicheskaja bezopasnost' jelektronnoj informacionno-obrazovatel'noj sredy v sovremennoj shkole (nauchnyj obzor). Voprosy shkol'noj i universitetskoj mediciny i zdorov'ja*. 2018; 2: 13–20. Russian.
7. Konceptcija informacionnoj bezopasnosti detej. *Rasporjazhenie pravitel'stva RF # 2471-r (02 dekabrja 2015)*. Available from: <http://static.government.ru/media/files/mPbAMyJ29uSPHL3p20168GA6hv3CtBxD.pdf>. Russian.
8. Janushanec OL, Petrova NA, Bezzubenkova EF, Neljubova EA, Shirokova AJu. *Gigienicheskaja ocenka tehničeskogo osnashhenija realizacii informacionnyh tehnologij, ispol'zuemyh v obuchenii shkol'nikov. V sbornike: Profilaktičeskaja medicina–2019: sbornik nauchnyh trudov Vserossijskoj nauchno-praktičeskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem. 14–15 nojabrja 2019 goda*. SPb.: IZD-VO SZGMU im. I. I. Mechniko-va, 2019: 244–50. Russian.
9. Kuchma VR, Suhareva LM, Hramcov PI. *Sovremennye podhody k obespečeniju gigieničeskoj bezopasnosti žiznedejatel'nosti detej v giperinformacionnom obščhestve. Voprosy shkol'noj i universitetskoj mediciny i zdorov'ja*. 2015; 3: 22–27. Russian.
10. Kuchma VR, Teksheva LM, Kurganskiy AM, Petrenko AO. *Hygienic assessment of the use of readers in elementary school. Gigiena i sanitarija*. 2014; 93 (3): 57–60. Russian.
11. Kuchma VR, Rapoport IK, Sokolova SB, Aleksandrova IYe, Makarova AYU, Mustafaeva KSh i dr. *Rasprostranennost' i ocenka ispol'zovanija jelektronnyh ustrojstv v učebnoj i dosugovoj dejatel'nosti shkol'nikov 7–8 klassov. Sechenovskij vestnik*. 2015; 3 (21): 43–50. Russian.
12. Laks M, Guerra SM, Miraglia JL, Medeiros EA. *Distance Learning in Antimicrobial Stewardship: Innovation in Medical Education*. PMID: 31174524; PMCID: PMC6555969; DOI: 10.1186/s12909-019-1623-x. Russian.
13. Maria B, Oleksandr K, Valentina E, Olena Y. *Distance-pedagogical technologies in olympic education for schoolchildren. Journal of Physical Education and Sport. Journal of Physical Education and Sport*. 2019; 378 (4): 2497–503. Ukraine.
14. Družilov SA. *Gigieničeskie aspekty informacionno-tehnologičeskoj zavisimosti čeloveka v novoj real'nosti. Gigiena i sanitarija*. 2019; 98 (7): 748–53. Russian.
15. Smirnova AA, Sinogina ES. *Vlijanie komp'jutera i seti internet na fizičeskoe i psihičeskoe zdorov'e shkol'nikov. Narodnoe obrazovanie*. 2017; 1 (2): 199–204. Russian.
16. Kuchma VR, Tkachuk EA, Tarmaeva IYu. *Psychophysiological state of children in conditions of informatization of their life activity and intensification of education. Gigiena i sanitarija*. 2016; 12: 1183–8. Russian.
17. Lemola S, Perkinson-Gloor N, Brand S, Dewald-Kaufmann JF, Grob A. *Adolescents' electronic media use at night, sleep disturbance, and depressive symptoms in the smartphone age. J Youth Adolesc*. 2015; 44 (2): 405–18.
18. Shutova NV, Baranova YuM. *Risk assessment of internet addiction for the mental health of adolescents. Gigiena i sanitarija*. 2017; 96 (6): 568–72. Russian.
19. Kuchma VR, Stepanova MI, Sazanyuk ZI, Polenova MA, Aleksandrova IE, Berezina NO, Makarova AYU. *The hygienic estimation of training sessions using electronic tablet on functional state of students. Sechenov Medical Journal*. 2015; 3 (21): 35–42. Russian.
20. Rideout VJ, Foehr UG, Roberts DF. *Generation M2: Media in the Lives of 8- to 18-Year-Old*. Henry J. Kaiser Family Foundation, Menlo Park, California. 2010. Available from: <http://www.kff.org/entmedia/upload/8010.pdf>.
21. Pope-Ford R. *Back flexion and extension: The effects of static posture on children using mobile devices. In: Advances in Intelligent Systems and Computing. AHFE International Conference on Safety Management and Human Factors, 2018; Orlando; United States; 21–25 July 2018*. 2019; 791: 342–51.
22. Butuhanov VD. *K voprosu valeologičeskikh problem dvigatel'noj aktivnosti i zdorov'ja shkol'nikov. Bjulleten' Vostočno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdelenija Rossijskoj akademii nauk*. 2009; 2: 227–8. Russian.
23. Milushkina OYu, Skoblina NA, Markelova SV, Tatarinchik AA, Bokareva NA, Fedotov DM. *Assessing health risk for schoolchildren and students caused by exposure to educational and entertaining information technologies. Health Risk Analysis*. 2019; 3: 135–43. Russian.
24. Wimalasundera S. *Computer vision syndrome. Galle Medical*. 2006; 11 (1): 201–4.
25. Skoblina NA, Milushkina OYu, Tatarinchik AA, Fedotov DM, Tsameryan AP, Dobruk IV, et al. *Hygienic problems of vision protection in schoolchildren and students in a hyper-information society. Russian ophthalmology of children*. 2017; 4: 5–9. Russian.
26. Teksheva LM, Jelksnina EV, Perminov MA. *Gigieničeskie aspekty ispol'zovanija komp'juternyh sredstv obuchenija v sisteme obščhego obrazovanija. Gigiena i sanitarija*. 2007; 4: 65–69. Russian.
27. Markelova SV. *The role of printed and electronic publications in development of vision disorders. Fundamental and Clinical Medicine*. 2019; 4 (4): 97–104. Russian.
28. Kuchma VR, Suhareva LM, Rapoport IK, Shubochkina EI, Skoblina NA, Milushkina OYu. *Population health of the children, health risks, sanitary and epidemiological well-being of students: problems, solutions, technology activities. Gigiena i sanitarija*. 2017; 96 (10): 990–5. Russian.
29. *Zdravoohranenie v Rossii 2017: statističeskij sbornik*. Rosstat. M., 2017. Available from: <https://www.gks.ru/storage/mediabank/zdrav17.pdf>. Russian.
30. Lukyanec GN, Makarova LV, Parancheva TM, Tyurina EV, Shibalova MS. *Vlijanie gadžetov na razvitie detej. Novye issledovanija*. 2019; 1: 57: 25–35. Russian.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТА ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ГИРУДОТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО АПИКАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТИТА

А. И. Абдуллаева ✉, А. Г. Притыко, П. А. Воронин, Е. Г. Михайлова

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

Для хронического апикального периодонтита (ХАП) характерно воспаление тканей, окружающих верхушку корня зуба. Отсутствие стабильности результатов стандартного лечения объясняет поиск новых лекарственных средств и методов лечения данного заболевания. Целью исследования было проанализировать влияние гирудотерапии в лечении ХАП при динамическом наблюдении с использованием клинических методов исследования. Пациенты в возрасте от 25 до 40 лет (всего 41 человек) были разделены на основную группу (20 человек) и группу сравнения (21 человек). У всех участников исследования определяли показатели выраженности постоянных болевых ощущений и десневого индекса GI. В первое посещение показатели выраженности болевых ощущений в группе сравнения ($5,81 \pm 0,65$) и основной группе ($5,75 \pm 0,92$) сильно не различались. К третьему посещению у пациентов основной группы боль почти отсутствовала ($1,05 \pm 0,34$), а в группе сравнения показатели были выше ($4,10 \pm 0,7$). Результаты клинических исследований указывают на положительное влияние гирудотерапии в составе комплексного лечения.

Ключевые слова: гирудотерапия, хронический апикальный периодонтит, воспаление, боль

Вклад авторов: А. И. Абдуллаева — анализ литературы и полученных данных, написание статьи; А. Г. Притыко — анализ полученных данных, участие в написании статьи; П. А. Воронин — обработка полученных данных, статистическая обработка данных, редактирование рукописи; Е. Г. Михайлова — обработка полученных данных, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 947 от 04 февраля 2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Айтан Измировна Абдуллаева
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; aitanka@list.ru

Статья получена: 01.05.2020 **Статья принята к печати:** 15.05.2020 **Опубликована онлайн:** 18.05.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.028

ANALYSIS OF LEECH THERAPY EFFECTS IN PATIENTS WITH CHRONIC APICAL PERIODONTITIS

Abdullaeva AI ✉, Prityko AG, Voronin PA, Mikhailova EG

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Chronic apical periodontitis (CAP) is characterized by tissue inflammation around the tooth tip. Unstable outcomes of current treatments against CAP dictate the need for novel therapeutic techniques and medications. The aim of this study was to analyze the effects of hirudotherapy on the treatment course in patients with CAP. Forty-one study participants aged 25 to 40 years were divided into the main group (20 patients) and the control group (21 patients). Pain level and the gingival index (GI) were measured in all study participants. During the first visit, pain scores did not differ significantly between the control (5.81 ± 0.65) and the main (5.75 ± 0.92) groups. During the second visit, pain was almost unnoticeable in the main group patients (1.05 ± 0.34), whereas pain scores were higher in the control group (4.10 ± 0.7). Our findings suggest a positive effect of hirudotherapy used in combination with standard treatment regimens.

Keywords: hirudotherapy, chronic apical periodontitis, inflammation, pain

Author contribution: Abdullaeva AI — literature and experimental data analysis, experimental data analysis; Prityko AG — experimental data analysis, experimental data analysis; Voronin PA — statistical analysis, manuscript revision; Mikhailova EG — statistical analysis, manuscript revision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 947 dated February 4, 2019). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aitan I. Abdullaeva
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; aitanka@list.ru

Received: 01.05.2020 **Accepted:** 15.05.2020 **Published online:** 18.05.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.028

Распространенность хронического апикального периодонтита (ХАП) в возрасте от 18 лет и старше составляет 95–100% [1]. Необходимость поиска новых медикаментозных средств и методик лечения этого заболевания обусловлена отсутствием стабильности результатов, получаемых при использовании известных методов лечения. На протяжении веков известен способ лечения пациентов с помощью лекарственных пиявок *Hirudo medicinalis* — гирудотерапия [2]. В прошлом метод оказался эффективным для лечения ряда заболеваний, включая лечение боевых ран [3]. К абсолютным противопоказаниям относят: онкологические заболевания, нарушения свертываемости крови, тромбоцитопению, непереносимость компонентов слюны пиявок [4, 5]. В настоящее время гирудотерапию используют для облегчения боли, при лечении астмы, гипертонии, мигрени, флебита, варикозного расширения вен, а также стоматологических заболеваний [2, 6–7]. Результаты

чаще положительны, но иногда возникают негативные последствия ее использования. Во время укуса пиявки выделяют в рану сложную смесь различных биологически и фармакологически активных веществ, в том числе гирудин [8]. Последний представляет собой полипептид, образующий необратимое соединение с тромбином, что препятствует переходу фибриногена в фибрин [9, 10]. Тем самым он улучшает микроциркуляцию в тканях, оказывает противовоспалительное и анальгетическое действия, стимулирует регенерацию тканей [11]. Гирудотерапия одобрена Минздравом России и имеет фармакопейную статью ФС-42-702-97, т. е. Госстандарт лекарственного средства с перечнем показателей и методов контроля качества. В доступной литературе мало работ по оценке эффективности этого метода в лечении периодонтита, и вопрос об обоснованности его использования при ХАП остается до конца нерешенным [12].

Таблица 1. Характеристика групп по возрасту и полу

	Основная группа (n = 20)	Группа сравнения (n = 21)
Пол М/Ж	8/12	9/12
Средний возраст (лет), M ± m	31,4 ± 0,4	30,2 ± 0,3

Целью исследования было изучить влияние гирудотерапии в комплексном лечении ХАП на скорость улучшения клинических показателей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В январе–марте 2020 г. на базе Научно-практического центра специализированной медицинской помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого были проведены лечение и клинические обследования 41 пациента с ХАП в стадии обострения. Среди обследуемых были 17 мужчин и 24 женщины 25–40 лет. Средний возраст женщин составил $29,1 \pm 1,7$ лет, мужчин $34,6 \pm 1,4$ лет. Критерии включения пациентов в исследование: наличие ХАП; повторное эндодонтическое лечение; отсутствие свища, возраст 25–40 лет. Критерии исключения: наличие сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации, обострение хронической сопутствующей патологии, наличие воспалительных заболеваний пародонта, беременность на любом сроке, ВИЧ-инфекция, нарушения в свертывающей системе крови, наличие злокачественных новообразований, отказ больного от участия в исследовании. Диагноз «хронический апикальный периодонтит» (код МКБ: K04.5) ставили на основании данных компьютерной томографии (GENORAY; Ю. Корея).

Все пациенты были разделены на две группы: основную и группу сравнения. В основную группу включены 20 пациентов, в их лечении применяли гирудотерапию в комплексе с принятым в клинике стандартным протоколом лечения данной патологии. Средний возраст женщин составил $30,0 \pm 1,0$ год; мужчин — $33,5 \pm 1,3$ года. Группа сравнения включила 21 пациента, проходившего лечение без применения гирудотерапии. Средний возраст женщин был $31,5 \pm 1,2$ года; мужчин — $28,4 \pm 1,4$ года (табл. 1). Между группами отсутствовали значимые различия по полу и возрасту.

Эндодонтическое лечение проводили по стандартам, утвержденным Европейской эндодонтической ассоциацией в 1994 г. (подготовка к эндодонтическому лечению, формирование доступа, установка коффердама, измерение полной рабочей длины, очистка и формирование корневых каналов, пломбирование корневых каналов). У всех пациентов, участвующих в данном исследовании, применяли идентичные препараты и материалы. После эндодонтических манипуляций проводили сеанс гирудотерапии: в область проекции верхушки корня причинного зуба аспирационным методом осуществляли постановку медицинской пиявки на слизистую оболочку альвеолярного отростка до полного кровенасыщения (20–30 мин). Все пиявки были приобретены в ООО

«ГирудоЦентр» (Россия) с сертификатом соответствия РОСС RU.АД77.Н00310 (срок действия с 29.01.2018 по 28.01.2021). Сеансы проводили 3 раза: на 1-й, 4-й, 7-й дни с начала лечения, согласно методическим рекомендациям по применению гирудотерапии [13].

Для оценки эффективности лечения определяли показатели выраженности постоянных болевых ощущений и десневого индекса GI по Loe и Silness (1963) причинного зуба у пациентов с ХАП в группе сравнения и в основной группе в динамике [8]. При оценке болевых ощущений применяли визуальную аналоговую шкалу боли (VAS), где «0» — нет боли; «1–3» — слабая боль; «4» — умеренная боль; «5–6» — сильная боль; «7–9» — очень сильная боль и «10» — нестерпимая боль. Десневой индекс GI оценивает состояние периодонта по клиническим признакам воспаления десны — гиперемии, отека и кровоточивости после прикосновения атравматичным зондом, в нашем случае, в области исследуемого зуба. Состояние каждого участка десны оценивают следующим образом: 0 — десна без признаков воспаления; 1 — небольшое изменение цвета, легкая отечность, нет кровоточивости при исследовании (легкое воспаление); 2 — покраснение, отек, кровоточивость при исследовании (умеренное воспаление); 3 — выраженная гиперемия, отек, изъязвления, тенденция к спонтанным кровотечениям (тяжелое воспаление) [8].

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения: SPSS 21 (IBM SPSS Statistics; США). Значимым уровнем достоверности считали 95% ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентов с ХАП в 1-й день показатели выраженности болевых ощущений значимо не различались. Во второе посещение в основной группе показатели выраженности постоянной боли уменьшились; в третье посещение боль почти отсутствовала и отмечалось противобольное действие гирудотерапии (табл. 2). На 4-й день в группе сравнения показатели выраженности боли тоже уменьшались, а уже в третье посещение они были значительно выше, чем в основной группе, где применяли гирудотерапию. Небольшое увеличение показателей выраженности болевых ощущений в группе сравнения на 7-й день связано с нормальной реакцией на лечебные манипуляции.

Значения десневого индекса GI с каждым посещением стабильно снижались в обеих группах, но в основной группе показатели индекса на 4-й и 7-й дни были ниже, чем в группе сравнения. Вместе с анальгезирующим

Таблица 2. Показатели десневого индекса GI и болевого синдрома при ХАП у пациентов основной группы и группы сравнения в динамике

	1-й день		4-й день		7-й день	
Показатели	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения
Болевые ощущения, баллы (M ± m)	5,75 ± 0,92	5,81 ± 0,65	2,5 ± 0,54	3,29 ± 0,68	1,05 ± 0,34*	4,1 ± 0,75
Десневой индекс GI, баллы (M ± m)	1,88 ± 0,06	1,92 ± 0,05	1,13 ± 0,10	1,45 ± 0,13	0,38 ± 0,06*	1,13 ± 0,06

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой сравнения.

эффектом гирудотерапия оказывала противоотечное действие, а также приводила к уменьшению гиперемии.

Таким образом, оценка показателей клинических проявлений свидетельствует о положительном влиянии гирудотерапии на комплексное лечение хронического верхушечного периодонтита.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании показано положительное влияние гирудотерапии в составе комплексного лечения ХАП, что наряду с данными других отечественных исследований еще раз доказывает аналгетический и противовоспалительный эффекты гирудотерапии. В работе, которая согласуется с нашим исследованием, говорится о том, что применение гирудотерапии при деструктивных формах верхушечного периодонтита приводит к снижению интоксикации в зубочелюстном сегменте, где имеется патологический очаг [14]. В данном исследовании мы показали эффективность гирудотерапии еще и в уменьшении показателей воспалительных изменений тканей периодонта. Так, к третьему посещению в основной группе признаки гиперемии исчезли, при этом в группе сравнения они практически не изменялись на протяжении всего наблюдения. В диссертационной работе 2003 г., которая также согласуется с результатами данного исследования, говорится о том, что использование в комплексном лечении гирудотерапии позволяет в более ранние сроки

купировать болевой, отечный, воспалительный синдром и сократить сроки лечения [15]. В нашем исследовании использованы дополнительные параметры в виде оценки болевых ощущений по 10-балльной шкале и определения десневого индекса GI.

На основании определения показателей постоянной боли, отека и гиперемии на 1-е, 4-е и 7-е сутки комплексного лечения, можно сделать вывод, что данные показатели были ниже у пациентов, в комплекс терапии которых входила гирудотерапия. У больных основной группы отмечалось клиническое улучшение состояния благодаря быстрому разрешению воспалительного процесса и выраженному деконгестивному и противоболевому действиям секрета медицинской пиявки. Побочных явлений при применении гирудотерапии отмечено не было.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования гирудотерапию можно рекомендовать в комплексном лечении ХАП. Полученные результаты могут пригодиться в клинической практике врача-стоматолога для более быстрого купирования боли и уменьшения воспаления у пациентов. Несомненно, требуются дополнительные исследования в отдаленные сроки наблюдений с использованием информативных, современных методов диагностики, в том числе рентгенологических.

Литература

1. Березин К. А., Греков А. Х., Зарипова Э. М., Старцева Е. Ю. Статистические аспекты изучения распространенности хронического апикального периодонтита у взрослого населения. Современные проблемы науки и образования. 2015; 2 (1). URL: <http://www.science-education.ru/ry/article/view?id=19306> (дата обращения: 8.05.2020).
2. Kunal J, Aarti G, Ridhi N, Sunanda D. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. J Clin Diagn Res. 2015; 9 (12): ZE05–ZE07.
3. Сашкина Т. И., Абдуллаева А. И., Рунова Г. С., Салдусова И. В., Зайченко О. В., Фасхутдинов Д. К. и др. Гирудотерапия в лечении хронического генерализованного пародонтита. Вестник РГМУ. 2019; 4: 83–86.
4. Spear M. Medicinal Leech Therapy: Friend or Foe. Plast Surg Nurs. 2016; 36 (3): 121–5.
5. Liu C, Barkley TW Jr. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment. Nursing. 2015; 45 (11): 25–30.
6. Федотова Ю. М., Костюкова Ю. И. Гирудотерапия: теория и практика. Научное обозрение. Медицинские науки. 2017; 2: 22–25.
7. Kulbida R, Mathes A, Loeser J. Beneficial effects of hirudotherapy in a chronic case of complex regional pain syndrome. J Integr Med. 2019; 17 (5): 383–6.
8. Şenel E, Taylan Özkan A, Mumcuoglu KY. Scientometric analysis of medicinal leech therapy. J Ayurveda Integr Med. 2019; S0975-9476(18)30349-8. DOI: 10.1016/j.jaim.2018.11.006.
9. Liu C, Barkley TW Jr. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment. Nursing. 2015; 45 (11): 25–30.
10. Sig AK, Guney M, Uskudar Guclu A, Ozmen E. Medicinal leech therapy-an overall perspective. Integr Med Res. 2017; 6 (4): 337–43.
11. Kim KS, Sim HS, Shin JH, Hwang JH, Lee SY. The Relationship between Explanation and Patient Compliance in Hirudotherapy. Arch Craniofac Surg. 2017; 18 (3): 179–85.
12. Kruer RM, Barton CA, Roberti G, Gilbert B, McMillian WD. Antimicrobial prophylaxis during Hirudo medicinalis therapy: a multicenter study. J Reconstr Microsurg. 2015; 31 (3): 205–9.
13. Использование метода гирудотерапии в практическом здравоохранении. Методические рекомендации № 2002/78 (утв. Минздравом РФ 15.07.2002). Доступно по ссылке: <https://www.lawmix.ru/medlaw/26582>.
14. Орлова Е. Е. Гирудотерапия деструктивных форм верхушечного периодонтита [диссертация]. М., 2003.
15. Денискина Е. В. Клинико-лабораторное обоснование гирудотерапии в комплексном лечении хронического периодонтита [диссертация]. М., 2003.

References

1. Berezin KA, Grekov AH, Zaripova YeM, Starceva EYu. Statisticheskie aspekty izuchenija rasprostranennosti hronicheskogo apikal'nogo periodontita u vzroslogo naselenija. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015; 2 (1). URL: <http://www.science-education.ru/ry/article/view?id=19306> (data obrashheniya: 8.05.2020). Russian.
2. Kunal J, Aarti G, Ridhi N, Sunanda D. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. J Clin Diagn Res. 2015; 9 (12): ZE05–ZE07.
3. Sashkina TI, Abdullaeva AI, Runova GS, Saldusova IV, Zajchenko OV, Fashutdinov DK, et al. Hirudotherapy in treatment of chronic generalised periodontitis. Vestnik RGMU. 2019; 4: 79–83.
4. Spear M. Medicinal Leech Therapy: Friend or Foe. Plast Surg Nurs. 2016; 36 (3): 121–5.
5. Liu C, Barkley TW Jr. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment. Nursing. 2015; 45 (11): 25–30.
6. Fedotova YuM, Kostjukova Yul. Girudoterapija: teorija i praktika. Nauchnoe obozrenie. Medicinskie nauki. 2017; 2: 22–25. Russian.
7. Kulbida R, Mathes A, Loeser J. Beneficial effects of hirudotherapy

- in a chronic case of complex regional pain syndrome. *J Integr Med*. 2019; 17 (5): 383–6.
8. Şenel E, Taylan Özkan A, Mumcuoglu KY. Scientometric analysis of medicinal leech therapy. *J Ayurveda Integr Med*. 2019; S0975-9476(18)30349-8. DOI: 10.1016/j.jaim.2018.11.006.
 9. Liu C, Barkley TW Jr. Medicinal leech therapy: New life for an ancient treatment. *Nursing*. 2015; 45 (11): 25–30.
 10. Sig AK, Guney M, Uskudar Guclu A, Ozmen E. Medicinal leech therapy-an overall perspective. *Integr Med Res*. 2017; 6 (4): 337–43.
 11. Kim KS, Sim HS, Shin JH, Hwang JH, Lee SY. The Relationship between Explanation and Patient Compliance in Hirudotherapy. *Arch Craniofac Surg*. 2017; 18 (3): 179–85.
 12. Kruer RM, Barton CA, Roberti G, Gilbert B, McMillian WD. Antimicrobial prophylaxis during *Hirudo medicinalis* therapy: a multicenter study. *J Reconstr Microsurg*. 2015; 31 (3): 205–9.
 13. Ispol'zovanie metoda girudoterapii v prakticheskom zdavoohranenii. Metodicheskie rekomendacii # 2002/78 (utv. Minzdravom RF 15.07.2002). Dostupno po ssylke: <https://www.lawmix.ru/medlaw/26582>. Russian.
 14. Orlova EE. Girudoterapija destruktivnyh form verhushechnogo periodontita [dissertacija]. M., 2003. Russian.
 15. Deniskina EV. Kliniko-laboratornoe obosnovanie girudoterapii v kompleksnom lechenii hronicheskogo periodontita [dissertacija]. M., 2003. Russian.