

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. Боженов, 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, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2018: 0,20

Журнал включен в WoS. JCR 2018: 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.2020-04

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 31.08.2020
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, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2018: 0.20

Scopus®

Indexed in WoS. JCR 2018: 0.21

WEB OF SCIENCE™

Five-year h-index is 6

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,321

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2020-04

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 31.08.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
МикроРНК и сосудистая патология глаза Л. К. Мошетова, С. А. Ушарова, К. И. Туркина, Д. А. Сычев, И. Н. Сабурина	
MicroRNA and vascular pathology of the eye Moshetova LK, Usharova SA, Turkina KI, Sychev DA, Saburina IN	
МЕТОД	10
<hr/>	
Новая модель <i>in vitro</i> для оценки высвобождения противотуберкулезных препаратов из биорезорбируемых полимерных носителей С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Е. Н. Антонов, Л. Н. Черноусова, С. Э. Богородский, Е. Е. Ларионова, В. К. Попов, А. Э. Эргешов	
New <i>in vitro</i> model to evaluate kinetics of antimycobacterial drug release from bioresorbable polymeric carriers Andreevskaya SN, Smirnova TG, Antonov EN, Chernousova LN, Bogorodsky SE, Larionova EE, Popov VK, Ergeshov AE	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	16
<hr/>	
Анализ микробиоты долгожителей Москвы с использованием высокопроизводительного секвенирования Д. А. Каштанова, Н. С. Клименко, И. Д. Стражеско, О. Н. Ткачева, Е. В. Старикова, О. Е. Глуценко, Д. А. Гудков, Е. Н. Ильина	
Gut microbiota assessment in Moscow long-livers using next generation sequencing Kashtanova DA, Klimenko NS, Strazhesko ID, Tkacheva ON, Starikova EV, Glushchenko OE, Gudkov DA, Ilna EN	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	21
<hr/>	
Распространение вариантов с частыми мутациями в гене капсидного белка N в российских изолятах SARS-CoV-2 С. А. Кирьянов, Т. А. Левина, М. Ю. Кириллов	
Spread of variants with gene N hot spot mutations in Russian SARS-CoV-2 isolates Kiryakov SA, Levina TA, Kirillov MYu	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	27
<hr/>	
Прогнозный мониторинг вторых волн эпидемии COVID-19 в Иране, России и других странах Д. А. Ковригин, С. П. Никитенкова	
Predictive monitoring of secondary epidemic waves of COVID-19 in Iran, Russia and other countries Kovrigine DA, Nikitenkova SP	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	34
<hr/>	
Реабилитация больных с детским церебральным параличом с помощью экзоскелета кисти, управляемого интерфейсом «мозг-компьютер» П. Д. Бобров, Е. В. Бирюкова, Б. А. Поляев, О. А. Лайшева, Е. Л. Усачёва, А. В. Соколова, Д. И. Михайлова, К. Н. Деметьева, И. Р. Федотова	
Rehabilitation of patients with cerebral palsy using hand exoskeleton controlled by brain-computer interface Bobrov PD, Biryukova EV, Polyayev BA, Lajsheva OA, Usachjova EL, Sokolova AV, Mihailova DI, Dement'eva KN, Fedotova IR	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	42
<hr/>	
Изменение ЭЭГ в частотном диапазоне α-ритма у детей с детским церебральным параличом при применении роботизированной терапии Н. В. Ларина, М. А. Начарова, Л. Л. Корсунская, С. В. Власенко, В. Б. Павленко	
Changes in EEG patterns in the α-frequency band following BCI-based therapy in children with cerebral palsy Larina NV, Nacharova MA, Korsunskaya LL, Vlasenko SV, Pavlenko VB	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	49
<hr/>	
Тромбогенность у больных ишемическим инсультом на фоне истинной полицитемии М. М. Танашян, А. А. Шабалина, Е. В. Ройтман, Т. В. Вавилова, П. И. Кузнецова	
Thrombogenicity in patients with ischemic stroke and pre-existing polycythemia vera Tanashyan MM, Shabalina AA, Roitman EV, Vavilova TV, Kuznetsova PI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	56
<hr/>	
Масс-спектрометрическое исследование и теоретическое моделирование комплексов флуконазола с аланином, лизином и треонином В. В. Чаговец, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич	
Complexes of fluconazole with alanine, lysine and threonine: mass spectrometry and theoretical modeling Chagovets VV, Starodubtseva NL, Frankevich VE	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	63
<hr/>	
Гипоксия усиливает трансцитоз в энтероцитах кишечника Д. В. Мальцева, М. Ю. Шкурников, С. А. Нерсисян, С. В. Никулин, А. А. Курносов, М. П. Райгородская, А. И. Осипьянц, Е. А. Тоневский	
Hypoxia enhances transcytosis in intestinal enterocytes Maltseva DV, Shkurnikov MYu, Nersisyan SA, Nikulin SV, Kurnosov AA, Raigorodskaya MP, Osipyants AI, Tonevitsky EA	

Изменения в стенке желудка после гастропликации у пациентов с морбидным ожирением

О. В. Галимов, В. О. Ханов, Р. А. Зиангиров, Е. С. Галимова, Д. М. Минигалин, Д. О. Галимов

Stomach wall changes after gastroplication in patients with morbid obesity

Galimov OV, Khanov VO, Ziangirov RA, Galimova ES, Minigalin DM, Galimov DO

Концепция информационной модели системы реабилитации больных с острым нарушением мозгового кровообращения

П. А. Рыбакова, Ю. И. Королева, Г. Е. Иванова, Т. В. Зарубина

Information model of post stroke rehabilitation conception

Rybakova PA, Koroleva Yul, Ivanova GE, Zarubina TV

МикроРНК И СОСУДИСТАЯ ПАТОЛОГИЯ ГЛАЗА

Л. К. Мошетьева, С. А. Ушарова [✉], К. И. Туркина, Д. А. Сычев, И. Н. Сабурина

Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

С момента открытия первой микроРНК несколько десятилетий назад представления о данных молекулах как о биомаркерах и потенциальных терапевтических мишенях различных заболеваний значительно расширились. В современном научном обществе активно обсуждают возможность применения микроРНК для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний. Более того, ряд недавно проведенных исследований доказывает, что уровни определенных микроРНК варьируют и при сосудистых заболеваниях глаза, включающих возрастную макулярную дегенерацию и диабетическую ретинопатию. Однако, несмотря на прогресс в исследовании роли некоторых микроРНК в диагностике ряда офтальмологических патологий, информации о возможности использования микроРНК в качестве биомаркеров окклюзии центральной вены сетчатки на сегодняшний день нет. Возможно, что поиск и идентификация данных молекул смогут облегчить постановку диагноза и улучшить качество оказываемой медицинской помощи.

Ключевые слова: окклюзия сосудов сетчатки, микроРНК, биомаркеры, сосудистая патология, ретинальные сосуды

Вклад авторов: Л. К. Мошетьева — определение концепции рукописи и ее редактирование; С. А. Ушарова, К. И. Туркина — подбор и анализ литературы, подготовка рукописи; Д. А. Сычев, И. Н. Сабурина — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Александровна Ушарова
ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, г. Москва, 125993; svetlalexar@gmail.com

Статья получена: 26.06.2020 **Статья принята к печати:** 09.07.2020 **Опубликована онлайн:** 15.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.042

MICRORNA AND VASCULAR PATHOLOGY OF THE EYE

Moshetova LK, Usharova SA [✉], Turkina KI, Sychev DA, Saburina IN

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Since the discovery of microRNAs just a few decades ago, our knowledge of these molecules and their potential as diagnostic biomarkers and therapeutic targets has significantly expanded. There is an ongoing discussion in the scientific community about the possibility of using microRNA for the diagnosis of cardiovascular diseases. It has been shown recently that levels of some microRNAs vary in vascular eye disorders, such as age-related macular degeneration and diabetic retinopathy. However, despite serious advances in our understanding of microRNA's role in eye pathology, we still do not know whether it is possible to use microRNA as a biomarker for central retinal vein occlusion. Perhaps, the discovery of such candidate microRNAs will help in making the timely diagnosis and improve the quality of medical care in patients with retinal vein occlusion.

Keywords: retinal vessel occlusion, microRNA, biomarkers, vascular pathology, retinal vessels

Author contribution: Moshetova LK — concept and manuscript preparation; Usharova SA, Turkina KI — literature analysis and manuscript preparation; Sychev DA, Saburina IN — manuscript preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana A. Usharova
Barrikadnaya, 2/1, str. 1, Moscow, 125993, svetlalexar@gmail.com

Received: 26.06.2020 **Accepted:** 09.07.2020 **Published online:** 15.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.042

Быстрая и точная диагностика заболеваний, особенно сосудистого генеза, — необходимый компонент оказания медицинской помощи для развития благополучного исхода заболевания. МикроРНК (miR) были открыты в 1993 г. [1]. Это одноцепочечные некодирующие РНК длиной 16–27 (чаще всего 22) нуклеотидов [2]. Транскрипция генов, кодирующих предшественники микроРНК, зависит от профилей метилирования геномной ДНК и модификаций гистонов, которые, в свою очередь, могут изменяться при различных заболеваниях [3]. В настоящее время научные коллективы из разных стран активно исследуют возможность использования микроРНК в качестве биомаркеров при диагностике широкого спектра патологий. Использование микроРНК как биомаркеров заболеваний органов зрения, в частности окклюзий ретинальных сосудов, на данный момент еще не получило широкой распространенности, однако в связи с активным изучением роли микроРНК при системных сосудистых патологических изменениях можно сделать вывод о чрезвычайной перспективности данного направления.

МикроРНК при системных сосудистых патологиях

Многочисленные данные свидетельствуют о значительном изменении экспрессии микроРНК при различных системных и локальных сосудистых патологиях, а также указывают на огромный диагностический потенциал изменений микроРНК, в частности так называемых «циркулирующих» микроРНК, как биомаркеров [4]. Циркулирующие микроРНК выступают в качестве динамических показателей, изменяющихся как при физиологических состояниях, так и при различного рода патологических процессах, в том числе сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях. К примеру, miR-1, miR-133b, miR-145, miR-208b и miR-499, miR-133a, miR-208a вовлечены в диагностику ишемической болезни сердца [5].

Было установлено, что при атеросклерозе в крови пациентов значительно изменен уровень ряда микроРНК (повышено содержание miR-122, miR-21, miR-130a и miR-211c и снижено количество miR-92a, miR-222, и miR-126) [6]. Более того, помимо важного диагностического значения,

установлена возможность применения вышеупомянутых микроРНК или их ингибиторов в качестве терапевтических агентов при атеросклерозе [7].

Известно, что наиболее тяжелые осложнения атеросклеротического поражения сосудов — ишемический инсульт и инфаркт миокарда. Многочисленные наблюдения, проводимые как на животных моделях, так и на пациентах, указывают на связь содержания некоторых циркулирующих и тканевых микроРНК с ишемическим инсультом, а также с развитием патологических изменений в постинсультном периоде. Так, в острой фазе ишемического инсульта возрастает концентрация miR-124, miR-21 и снижается концентрация miR-221, а повышение уровней miR-145 и miR-210 является предиктором лучшего исхода патологического процесса [8]. Инфаркт миокарда тоже сопровождается рядом специфических изменений микроРНК. В частности, отмечается, что при ишемическом инфаркте миокарда резко снижается уровень miR-375 [9].

Гипертоническая болезнь представляет собой наиболее распространенное заболевание сердечно-сосудистой системы и выступает в качестве провоцирующего фактора у множества сосудистых нарушений, в том числе и со стороны органов зрения. Отечественными учеными была проведена работа, в рамках которой обследовали пациентов с гипертонической болезнью и без нее для изучения характеристик определенных микроРНК: miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. В результате было выявлено увеличение дисперсии всех рассматриваемых биомаркеров у пациентов с гипертонией по сравнению со здоровой группой. При этом у лиц с повышенным уровнем артериального давления преобладает miR-221, а у здоровых обследуемых — miR-126 [10].

Таким образом, при системных сосудистых заболеваниях происходят изменения уровня определенных циркулирующих микроРНК. Данные микроРНК могут выступать как потенциальные биомаркеры патологических состояний. В связи с общностью патогенеза системных сосудистых заболеваний и сосудистых заболеваний органов зрения можно предположить, что существуют микроРНК, которые способны выступать в качестве биомаркеров состояний, связанных с нарушением кровообращения по сосудам сетчатки. Качественный и количественный составы микроРНК при окклюзии ретинальных сосудов сетчатки до настоящего времени не подвергали изучению, однако имеющиеся положительные данные об изменении профилей микроРНК при офтальмологических заболеваниях, в основе которых лежит сосудистая патология, подтверждают перспективность проведения исследований в данном направлении.

Таблица. Экспрессия микроРНК-кандидатов при различных патологических состояниях

	miR-126	miR-155	miR-21
Сосудистая патология			
Атеросклероз	Экспрессия снижается [6]	[6]*	Экспрессия возрастает [6]
Ишемический инсульт	Экспрессия снижается [36]	[36]*	Экспрессия возрастает [36]
Гипертоническая болезнь	Экспрессия возрастает [10]	[10]*	Экспрессия возрастает [38]
Ишемическая болезнь сердца	Экспрессия возрастает [10, 24]	[10, 39]*	Экспрессия возрастает [38]
Офтальмологическая патология			
Диабетическая ретинопатия	Экспрессия снижается [17–19, 22]	Экспрессия возрастает [31]	Экспрессия возрастает [40]
Возрастная макулярная дегенерация	Экспрессия снижается [23–25]	Экспрессия возрастает [13]	Экспрессия возрастает [35]

Примечание: * — характер изменений обусловлен особенностями патологического процесса.

МикроРНК при возрастной макулярной дегенерации

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — основная причина необратимой потери центрального зрения у пожилых людей. Снижение зрения развивается в результате хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) с последующим повышением проницаемости сосудистой стенки, экссудацией и, как следствие, необратимым повреждением фоторецепторов. Будучи сложным и прогрессирующим заболеванием, ВМД связана как с генетическими (в том числе комплементарными) факторами, так и с факторами окружающей среды [11]. Определенные микроРНК, связанные с комплементарными факторами, изменяют свою регуляцию в циркулирующей крови и тканях глаза, взятых у больных с ВМД. Так, при исследовании 384 микроРНК в плазме крови пациентов с влажной формой ВМД с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) характеристики 16 микроРНК были существенно изменены, а 10 микроРНК были экспрессированы исключительно у пациентов с экссудативной формой ВМД [12]. Группа ученых из Италии оценили профиль экспрессии различных микроРНК у пациентов с ВМД, без данного заболевания, а также на животной модели (использовали сетчатку крыс с индуцированными изменениями). Анализ показал, что у пациентов с ВМД в плазме крови изменены уровни miR-9, miR-23a, miR-27a, miR-34a, miR-146a, miR-155. Наиболее существенно искажены показатели miR-27a, miR-146a и miR-155, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных биомаркеров и фармакологических мишеней для лечения ВМД [13].

Роль микроРНК при диабетической ретинопатии

Возможность использования микроРНК в качестве биомаркеров рассматривают также еще при одной серьезной офтальмологической патологии, в основе которой лежат сосудистые нарушения, — диабетической ретинопатии (ДР). ДР является одним из наиболее часто встречающихся микрососудистых осложнений сахарного диабета (СД), признанным в настоящее время глобальной эпидемией. В основе патогенеза ДР лежит повреждение микрососудов в результате длительного воздействия гипергликемии. Прогрессирующая ишемия сетчатки в итоге стимулирует экспрессию индуцируемых гипоксией факторов роста, таких как VEGF, которые стимулируют неоваскуляризацию сетчатки [14]. При этом происходит разрушение гематоретинального барьера и, как следствие, просачивание сосудов и развитие отека сетчатки [15]. Анализ циркулирующих микроРНК из образцов сыворотки

или плазмы пациентов с наличием или отсутствием ДР показал изменение уровней экспрессии многих микроРНК в популяциях пациентов, различающихся по возрасту, типу СД, сроку от начала заболевания и т. д. [16]. По результатам исследований у пациентов с ДР были выявлены изменения качественных и количественных характеристик miR-126 [17–19], miR-150 [20], miR-155 [21] и miR-200b. Наибольшей клинической значимостью обладают miR-155 и miR-126 [22]. Группа ученых из Китая изучала уровень miR-126 в сыворотке крови пациентов с ДР и у здоровых добровольцев с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии miR-126 у здоровых добровольцев достоверно отличался от уровня лиц с ДР. Анализ сыворотки крови пациентов, страдающих как пролиферативной (ПДР), так и непролиферативной диабетической ретинопатией (НПДР), показал, что содержание miR-126 различалось у пациентов с разной степенью патологических изменений сетчатки. При этом содержание miR-126 уменьшалось по мере развития пролиферативных патологических изменений сетчатки. Были обнаружены диагностические пороговые значения уровня miR-126, используя которые можно достоверно прогнозировать риск развития ПДР или НПДР, а также определить пограничные состояния с риском перехода в ПДР. Авторы предполагают, что miR-126 можно использовать в качестве биомаркера для скрининга эндотелиального повреждения сетчатки и ранней диагностики ПДР [17].

На основании вышеизложенного было определено несколько микроРНК-кандидатов, которые, на наш взгляд, могут представлять наибольшую ценность и обладать высокой информативностью в качестве потенциальных биомаркеров окклюзии ретинальных вен (таблица).

miR-126

MiR-126 является одной из ключевых проангиогенных микроРНК, участвующих в регуляции экспрессии факторов роста, таких как VEGF и FGF [23, 24]. Профили экспрессии микроРНК были исследованы на нескольких животных моделях, имитирующих патологические особенности сосудистых заболеваний глаз человека. Среди таких моделей кислород-индуцированная модель ретинопатии, включающая неоваскуляризацию по типу ДР, а также лазер-индуцированная ХНВ-модель, имитирующая влажную форму ВМД. Концентрация miR-126 понижается в хориоидеи мышей с лазер-индуцированной ХНВ [25], так же как в сетчатке и хориоидеи грызунов при кислород-индуцированной модели ретинопатии [26]. Кроме того, у мышей со сниженной концентрацией miR-126 наблюдали поражения периферических участков хориоидеи [27], а при кислород-индуцированной модели ретинопатии искусственное увеличение содержания miR-126 тормозит неоваскуляризацию сетчатки и разрушение гематоретинального барьера [28]. Эти данные свидетельствуют о том, что miR-126 является важным биомаркером, отражающим состояние сосудистой оболочки глаза при различных патологических процессах, а также может быть рассмотрена в качестве перспективной фармакологической мишени для разработки новых подходов к терапии сосудистых заболеваний глаз.

miR-155

MiR-155 является провоспалительной микроРНК, которая специфически экспрессируется в атеросклеротических

бляшках и провоспалительных макрофагах (M1-фенотип) [6]. При влажной форме ВМД, а также при нескольких экспериментальных моделях (кислород-индуцированной ретинопатии [29], светоиндуцированной дегенерации сетчатки [30] и ДР, индуцированной стрептозоцином [31]) в сетчатке можно наблюдать значительное изменение экспрессии miR-155. Отмечается, что дефицит этой микроРНК приводит к уменьшению площади сосудов и неоваскуляризации в кислород-индуцированной модели ретинопатии на грызунах [29]. Кроме того, доказано, что miR-155 регулирует комплементарный фактор H при ВМД [32], поддерживая его роль в ангиогенезе и воспалении при различных офтальмологических патологиях. MiR-155 можно рассматривать в качестве значимого биомаркера, отражающего провоспалительные каскады, сопровождающие развитие сосудистых заболеваний. Особый интерес представляют также исследования, направленные на оценку miR-155 как терапевтической мишени для лечения данных патологий.

miR-21

Доказано, что данная микроРНК тесно связана с процессом образования опухолей и неоваскуляризацией [33]. Известно также, что экспрессия miR-21 меняется при кардиологических патологиях [34]. Как показывают исследования, miR-21 играет важную роль в патогенезе ВМД. Она участвует в регуляции роста ретинальных сосудов, о чем свидетельствует ее высокая экспрессия в эндотелиальных клетках сетчатки. Повышение экспрессии miR-21 было обнаружено в экспериментальной модели при лазер-индуцированной ХНВ у мышей. Кроме того, искусственная стимуляция экспрессии miR-21 ингибирует пролиферацию и миграцию культивируемых эндотелиальных клеток путем целенаправленного ингибирования определенных белков, влияющих на динамику актиновых филаментов [35]. Эти данные указывают на диагностический и болезнь-модулирующий потенциалы miR-21.

ВЫВОДЫ

Исследования, в которых проанализированы изменения в профилях экспрессии различных генов микроРНК при сосудистых патологиях органов зрения, немногочисленны. Однако имеющиеся данные позволяют рассматривать микроРНК в качестве перспективных диагностических маркеров, в том числе и при такой серьезной сосудистой патологии глаза, как окклюзия ретинальных венозных сосудов. Комплексная оценка экспрессии определенных биомаркеров позволит проводить малоинвазивный скрининг, своевременное лечение и профилактику заболевания. Кроме того, важны разработка панелей микроРНК и поиск их пороговых показателей, выход за границы которых может потенцировать развитие осложнений у пациентов как до, так и после успешно проведенного лечения.

Для более полного и конкретного понимания роли отдельных микроРНК и их кластеров, а также оценки диагностического и терапевтического потенциала при нарушениях кровообращения по венозным сосудам сетчатки необходимо дальнейшее проведение фундаментальных и клинических исследований, включающих моделирование на основе сложных трехмерных клеточных органоидов и сфероидов.

Литература

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843–54. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Fang Z, Du R, Edwards A, Flemington EK, Zhang K. The Sequence Structures of Human MicroRNA Molecules and Their Implications. *PLoS ONE*. 2013; 8 (1): e54215. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054215>.
- Кучер А. Н., Бабушкина Н. П. Роль микро-РНК, генов, их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека. *Медицинская генетика*. 2011; 1: 3–13.
- Pogribny IP. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018; 243 (3): 283–90. DOI: 10.1177/1535370217731291.
- Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*. 2016; 111 (4): 322–37. DOI: 10.1093/cvr/cvw174.
- Кучер А. Н., Назаренко М. С. Роль микро-РНК при атерогенезе. *Кардиология*. 2017; 57 (9): 65–76. Available from: <https://doi.org/10.18087/cardio.2017.9.10022>.
- Королева Ю. А., Назаренко М. С., Кучер А. Н. Роль микроРНК в формировании нестабильных атеросклеротических бляшек. *Биохимия*. 2018; 83 (1): 34–46.
- Гареев И. Ф., Бейлерли О. А. Роль микро-РНК в ишемическом инсульте. *Неврологический журнал*. 2018; 23 (4): 166–75.
- Baulina N, Osmak G, Kiselev I, et al. NGS-identified circulating miR-375 as a potential regulating component of myocardial infarction associated network. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 121: 173–9. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.129.
- Щеглова Н. Е., Калинин М. Н. Качественные характеристики miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 у больных гипертензивной болезнью и постинфарктным кардиосклерозом [диссертация]. К., 2015.
- Coleman HR, Chan CC, Ferris FL 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2008; 372 (9652): 1835–45. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61759-6.
- Ertekin S, Yıldırım O, Dinç E, et al. Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Molecular Vision*. 2014; 20: 1057–66.
- Romano GL, Platania CBM, Drago F, et al. Retinal and circulating miRNAs in age-related macular degeneration: an in vivo animal and human study. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 168. DOI: 10.3389/fphar.2017.00168.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004 Oct; 27 (10): 2540–53. Available from: <https://doi.org/10.2337/diacare.27.10.2540>.
- Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*. 2009; 88 (4): 495–515. DOI: 10.1007/s12041-009-0068-0.
- Qing S, Yuan S, Yun C, et al. Serum miRNA biomarkers serve as a fingerprint for proliferative diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34 (5): 1733–40. DOI: 10.1159/000366374.
- Qin LL, An MX, Liu YL, Xu HC, Lu ZQ. MicroRNA-126: a promising novel biomarker in peripheral blood for diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10 (4): 530–4. DOI: 10.18240/ijo.2017.04.05.
- Barutta F, Bruno G, Matullo G, et al. MicroRNA-126 and micro-/macrovascular complications of type 1 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol*. 2017; 54 (2): 133–9. DOI: 10.1007/s00592-016-0915-4.
- Rezk NA, Sabbah NA, Saad MS. Role of MicroRNA 126 in screening, diagnosis, and prognosis of diabetic patients in Egypt. *IUBMB Life*. 2016; 68 (6): 452–8. DOI: 10.1002/ubb.1502.
- Mazzeo A, Beltramo E, Lopatina T, Gai C, Trento M, Porta M. Molecular and functional characterization of circulating extracellular vesicles from diabetic patients with and without retinopathy and healthy subjects. *Exp Eye Res*. 2018; 176: 69–77. DOI: 10.1016/j.exer.2018.07.003.
- Yang TT, Song SJ, Xue HB, Shi DF, Liu CM, Liu H. Regulatory T cells in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus retinopathy by miR-155. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19 (11): 2010–5.
- Li EH, Huang QZ, Li GC, Xiang ZY, Zhang X. Effects of miRNA-200b on the development of diabetic retinopathy by targeting VEGFA gene. *Biosci Rep*. 2017; 37 (2): BSR20160572. DOI: 10.1042/BSR20160572.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008; 15 (2): 261–71. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002.
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008; 15 (2): 272–84. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008.
- Wang L, Lee AY, Wigg JP, Peshavariya H, Liu P, Zhang H. miR-126 Regulation of Angiogenesis in Age-Related Macular Degeneration in CNV Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (6): 895. DOI: 10.3390/ijms17060895.
- Desjarlais M, Rivera JC, Lahaie I, Cagnone G, Wirt M, Omri S, et al. MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model. *PLoS ONE*. 2019; 14 (6): e0218282. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218282>.
- Zhao F, Anderson C, Karnes S, et al. Expression, regulation and function of miR-126 in the mouse choroid vasculature. *Exp Eye Res*. 2018; 170: 169–76. DOI: 10.1016/j.exer.2018.02.026.
- Bai X, Luo J, Zhang X, et al. MicroRNA-126 Reduces Blood-Retina Barrier Breakdown via the Regulation of VCAM-1 and BCL2L1 in Ischemic Retinopathy. *Ophthalmic Research*. 2017; 57 (3): 173–85. DOI: 10.1159/000454716.
- Yan L, Lee S, Lazzaro DR, Aranda J, Grant MB, Chaqour B. Single and Compound Knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and Its Angiogenic Gene Target Ccn1 in Mice Alter Vascular and Neovascular Growth in the Retina via Resident Microglia. *J Biol Chem*. 2015; 290 (38): 23264–81. DOI: 10.1074/jbc.M115.646950.
- Plakka-Kanthikeel S, Raymond A, Atluri VS, et al. Sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1 (SAMHD1)-facilitated HIV restriction in astrocytes is regulated by miRNA-181a. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 66. DOI: 10.1186/s12974-015-0285-9.
- Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, Xu S. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52 (7): 4402–9. DOI: 10.1167/iov.10-6879.
- Lukiw WJ, Surjyadipta B, Dua P, Alexandrov PN. Common microRNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *Int J Biochem Mol Biol*. 2012; 3 (1): 105–16.
- Liu HY, Zhang YY, Zhu BL, et al. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23 (10): 4149–55. DOI: 10.26355/eurev_201905_17917.
- Yuan J, Chen H, Ge D, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42 (6): 2207–19. DOI: 10.1159/000479995.
- Sabatell C, Malvaux L, Bovy N, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One*. 2011; 6 (2): e16979. DOI: 10.1371/journal.pone.0016979.
- Айтбаев К. А., Муркамилов И. Т., Фомин В. В., Муркамилова Ж. А., Юсупов Ф. А. МикроРНК при ишемическом инсульте. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2018; 118 (3): 48–56. Available from: <https://doi.org/10.17116/jnevro20181183248-56>.
- Li X, Wei Y, Wang Z. microRNA-21 and hypertension. *Hypertens Res*. 2018; 41: 649–61. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0071-z>.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008; 456 (7224): 980–4. DOI: 10.1038/nature07511.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010; 107 (5): 677–84. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566.
- Chen Q, Qiu F, Zhou K, et al. Pathogenic Role of microRNA-21 in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPARα. *Diabetes*. 2017; 66 (6): 1671–82. DOI: 10.2337/db16-1246.

References

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843–54. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Fang Z, Du R, Edwards A, Flemington EK, Zhang K. The Sequence Structures of Human MicroRNA Molecules and Their Implications. *PLoS ONE*. 2013; 8 (1): e54215. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054215>.
- Kucher AN, Babushkina NP. Role of microRNA, genes involved in their biogenesis and functioning in the development of human disorders. *Medical Genetics*. 2011; 1: 3–13. Russian.
- Pogribny IP. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018; 243 (3): 283–90. DOI: 10.1177/1535370217731291.
- Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*. 2016; 111 (4): 322–37. DOI: 10.1093/cvr/cvw174.
- Kucher AN, Nazarenko MS. The role of microRNA in atherogenesis. *Kardiologija*. 2017; 57 (9): 65–76. Available from: <https://doi.org/10.18087/cardio.2017.9.10022>. Russian.
- Koroleva IA, Nazarenko MS, Kucher AN. Role of microRNA in development of instability of atherosclerotic plaque. *Biochemistry*. 2018; 83 (1): 34–46. Russian.
- Gareev IF, Beilerly OA. Role of microRNA in ischemic stroke. *Neurologic magazine*. 2018; 23 (4): 166–75. Russian.
- Baulina N, Osmak G, Kiselev I, et al. NGS-identified circulating miR-375 as a potential regulating component of myocardial infarction associated network. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 121: 173–9. DOI: 10.1016/j.jmcc.2018.07.129.
- Shheglova NE, Kalinkin MN. Kachestvennye karakteristiki miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 u bol'nyh gipertonicheskoy boleznyu i postinfarktym kardiosklerozom [dissertacija]. K., 2015. Russian.
- Coleman HR, Chan CC, Ferris FL 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2008; 372 (9652): 1835–45. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61759-6.
- Ertekin S, Yıldırım O, Dinç E, et al. Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Molecular Vision*. 2014; 20: 1057–66.
- Romano GL, Platania CBM, Drago F, et al. Retinal and circulating miRNAs in age-related macular degeneration: an in vivo animal and human study. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 168. DOI: 10.3389/fphar.2017.00168.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004 Oct; 27 (10): 2540–53. Available from: <https://doi.org/10.2337/diacare.27.10.2540>.
- Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet*. 2009; 88 (4): 495–515. DOI: 10.1007/s12041-009-0068-0.
- Qing S, Yuan S, Yun C, et al. Serum miRNA biomarkers serve as a fingerprint for proliferative diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34 (5): 1733–40. DOI: 10.1159/000366374.
- Qin LL, An MX, Liu YL, Xu HC, Lu ZQ. MicroRNA-126: a promising novel biomarker in peripheral blood for diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10 (4): 530–4. DOI: 10.18240/ijo.2017.04.05.
- Barutta F, Bruno G, Matullo G, et al. MicroRNA-126 and micro-/macrovascular complications of type 1 diabetes in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol*. 2017; 54 (2): 133–9. DOI: 10.1007/s00592-016-0915-4.
- Rezk NA, Sabbah NA, Saad MS. Role of MicroRNA 126 in screening, diagnosis, and prognosis of diabetic patients in Egypt. *IUBMB Life*. 2016; 68 (6): 452–8. DOI: 10.1002/iub.1502.
- Mazzeo A, Beltramo E, Lopatina T, Gai C, Trento M, Porta M. Molecular and functional characterization of circulating extracellular vesicles from diabetic patients with and without retinopathy and healthy subjects. *Exp Eye Res*. 2018; 176: 69–77. DOI: 10.1016/j.exer.2018.07.003.
- Yang TT, Song SJ, Xue HB, Shi DF, Liu CM, Liu H. Regulatory T cells in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus retinopathy by miR-155. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19 (11): 2010–5.
- Li EH, Huang QZ, Li GC, Xiang ZY, Zhang X. Effects of miRNA-200b on the development of diabetic retinopathy by targeting VEGFA gene. *Biosci Rep*. 2017; 37 (2): BSR20160572. DOI: 10.1042/BSR20160572.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008; 15 (2): 261–71. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002.
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008; 15 (2): 272–84. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008.
- Wang L, Lee AY, Wigg JP, Peshavariya H, Liu P, Zhang H. miR-126 Regulation of Angiogenesis in Age-Related Macular Degeneration in CNV Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (6): 895. DOI: 10.3390/ijms17060895.
- Desjarlais M, Rivera JC, Lahaie I, Cagnone G, Wirt M, Omri S, et al. MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model. *PLoS ONE*. 2019; 14 (6): e0218282. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218282>.
- Zhao F, Anderson C, Karnes S, et al. Expression, regulation and function of miR-126 in the mouse choroid vasculature. *Exp Eye Res*. 2018; 170: 169–76. DOI: 10.1016/j.exer.2018.02.026.
- Bai X, Luo J, Zhang X, et al. MicroRNA-126 Reduces Blood-Retina Barrier Breakdown via the Regulation of VCAM-1 and BCL2L1 in Ischemic Retinopathy. *Ophthalmic Research*. 2017; 57 (3): 173–85. DOI: 10.1159/000454716.
- Yan L, Lee S, Lazzaro DR, Aranda J, Grant MB, Chaqour B. Single and Compound Knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and Its Angiogenic Gene Target Ccn1 in Mice Alter Vascular and Neovascular Growth in the Retina via Resident Microglia. *J Biol Chem*. 2015; 290 (38): 23264–81. DOI: 10.1074/jbc.M115.646950.
- Pilakka-Kanthikeel S, Raymond A, Atluri VS, et al. Sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1 (SAMHD1)-facilitated HIV restriction in astrocytes is regulated by miRNA-181a. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 66. DOI: 10.1186/s12974-015-0285-9.
- Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, Xu S. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52 (7): 4402–9. DOI: 10.1167/iov.10-6879.
- Lukiw WJ, Surjyadipta B, Dua P, Alexandrov PN. Common microRNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *Int J Biochem Mol Biol*. 2012; 3 (1): 105–16.
- Liu HY, Zhang YY, Zhu BL, et al. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23 (10): 4149–55. DOI: 10.26355/eurev.201905_17917.
- Yuan J, Chen H, Ge D, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42 (6): 2207–19. DOI: 10.1159/000479995.
- Sabatell C, Malvaux L, Bovy N, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One*. 2011; 6 (2): e16979. DOI: 10.1371/journal.pone.0016979.
- Aitbaev KA, Murkamirov IT, Fomin VV, Murkamirova JA, Yusupov FA. MicroRNA in ischemic stroke. *Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov. Special Issues*. 2018; 118 (3): 48–56. Available from: <https://doi.org/10.17116/jnevro20181183248-56>. Russian.
- Li X, Wei Y, Wang Z. microRNA-21 and hypertension. *Hypertens Res*. 2018; 41: 649–61. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0071-z>.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008; 456 (7224): 980–4. DOI: 10.1038/nature07511.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010; 107 (5): 677–84. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566.
- Chen Q, Qiu F, Zhou K, et al. Pathogenic Role of microRNA-21 in Diabetic Retinopathy Through Downregulation of PPARα. *Diabetes*. 2017; 66 (6): 1671–82. DOI: 10.2337/db16-1246.

НОВАЯ МОДЕЛЬ *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

С. Н. Андреевская¹✉, Т. Г. Смирнова¹, Е. Н. Антонов², Л. Н. Черноусова¹, С. Э. Богородский², Е. Е. Ларионова¹, В. К. Попов², А. Э. Эргешов¹

¹ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

² Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника», Москва, Россия

Создание противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия крайне перспективно, так как позволяет сохранить приверженность больных к лечению при длительных курсах терапии, особенно при химиотерапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Традиционно используемый для оценки кинетики выхода препаратов из полимерных носителей метод УФ-спектрофотометрии не подходит для применения в многокомпонентных питательных средах для культивирования микобактерий туберкулеза. Целью исследования было разработать метод оценки высвобождения противотуберкулезных препаратов из биорезорбируемых полимерных носителей, позволяющий проводить скрининг большого числа инкапсулированных пролонгированных форм противотуберкулезных препаратов и отбирать наиболее перспективные композиции. При изучении динамики роста лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии серии концентраций левофлоксацина (от 0,03 до 0,4 мкг/мл) была разработана модель, представляющая собой два параллельно проводимых опыта, позволяющих оценить кинетику высвобождения препарата в культуральную среду. Все эксперименты проводили трехкратно, при оценке использовали методы описательной статистики. Результаты, полученные в этой модели для трех инкапсулированных форм левофлоксацина в биорезорбируемых полимерных носителях из полилактидогликолида (частицы 50 и 100 мкм и матрикс), показали, что кинетика накопления препарата в среде существенно зависит от вида полимерного носителя. Наиболее перспективен из них матрикс, который хорошо включает в себя левофлоксацин и достаточно равномерно высвобождает его при инкубации в питательной среде.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, модель *in vitro*, левофлоксацин, биорезорбируемые полимерные носители, пролонгированное высвобождение

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части развития СКФ методов формирования биоактивных матричных структур, в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ «ЦНИИТ» № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам» в части оценки бактериостатической активности диапазона концентраций левофлоксацина и РФФИ (проект № 18-29-06062 мк) в части разработки лекарственных форм пролонгированного действия и *in vitro* модели оценки их эффективности.

Вклад авторов: С. Н. Андреевская — интерпретация результатов, написание текста рукописи; Т. Г. Смирнова — отработка условий для оценки высвобождения левофлоксацина из носителя, обсуждение результатов; Е. Н. Антонов — формирование матриц, обсуждение результатов; Л. Н. Черноусова, А. Э. Эргешов — разработка дизайна исследования, обсуждение результатов; С. Э. Богородский — формирование микрокапсул, обсуждение результатов; Е. Е. Ларионова — анализ литературы, обсуждение результатов; В. К. Попов — разработка метода включения антибиотика в полимеры, обсуждение результатов.

Соблюдение этических стандартов: работы с вирулентными штаммами *M. tuberculosis* проводили с соблюдением мер безопасности при работе с патогенами III–IV группы патогенности согласно требованиям СП 1.3.2322-08 (с дополнениями СП 1.3.2518-09 и СП 1.3.2885-11) «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

✉ Для корреспонденции: Софья Николаевна Андреевская
Яузская аллея, д. 2, стр. 1А, г. Москва, 107564; andsofia@mail.ru

Статья получена: 06.08.2020 Статья принята к печати: 20.08.2020 Опубликована онлайн: 30.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.050

NEW *IN VITRO* MODEL TO EVALUATE KINETICS OF ANTIMYCOBACTERIAL DRUG RELEASE FROM BIORESORBABLE POLYMERIC CARRIERS

Andreevskaya SN¹✉, Smirnova TG¹, Antonov EN², Chernousova LN¹, Bogorodsky SE², Larionova EE¹, Popov VK², Ergeshov AE¹

¹ Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

² Institute of Photon Technologies FSRC 'Crystallography and Photonics' RAS, Moscow, Russia

Sustained-release drugs against tuberculosis are a promising approach to therapy since they positively affect patient compliance with long regimens, especially when it comes to the multidrug-resistant form of the disease. Conventional UV-visible spectroscopy does not work well with multicomponental culture media used for growing *M. tuberculosis*. The aim of this study was to develop a method for evaluating the kinetics of anti-tuberculosis drug released from bioresorbable polymeric carriers suitable for screening a wide range of encapsulated prolonged-release drugs and identifying the best performing candidate. While studying the growth dynamics of the laboratory susceptible strain *M. tuberculosis* H37Rv in the presence of different levofloxacin concentrations (from 0.03 to 0.4 µg/ml), we developed a model, which is essentially a set of 2 parallel experiments evaluating the kinetics of drug release into the culture medium. The results of these 2 experiments conducted on 3 encapsulated forms of levofloxacin loaded onto bioresorbable polymeric PLGA carriers (particles sized 50 µm and 100 µm and the matrix) revealed that release kinetics of the drug largely depended on the type of polymeric carrier. The best encapsulation of the antibiotic and its gradual release into the culture medium was observed for the matrix. All experiments were run in 3 replicates. The obtained data were analyzed using descriptive statistics.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* model, levofloxacin, bioresorbable polymeric carrier, sustained-release

Funding: the study was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education and carried out as part of the State Assignment for FSRC "Crystallography and Photonics" RAS (developing an SCF-based method for creating bioactive matrices), as part of the State Assignment № 0515-2019-0015 (Formation of resistance to antimycobacterial drugs in mycobacteria and somatic cells) for the Central Tuberculosis Research Institute (evaluation of the bacteriostatic activity of different levofloxacin concentrations). The study was also supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 18-29-06062 mk: development of sustained-release therapeutic formulations and an *in vitro* model for the evaluation of their efficacy).

Author contribution: Andreevskaya SN — interpretation of study results, manuscript preparation; Smirnova TG — modeling of conditions for levofloxacin release from its carriers; discussion of study results; Antonov EN — preparation of matrices; discussion of study results; Chernousova LN, Ergeshov AE — study design; discussion of study results; Bogorodsky SE — preparation of microparticles; discussion of study results; Larionova EE — literature analysis; discussion of study results; Popov VK — method for antibiotic encapsulation into polymeric carriers; discussion of study results.

Compliance with ethical standards: manipulations with virulent strains of *M. tuberculosis* were conducted in compliance with the safety guidelines for the experiments involving Risk Group III–IV pathogens, infectious agents and utilization of medical waste specified in sanitary regulations 1.3.2322-08, 1.3.2518-09, 1.3.2885-11, and 2.1.7.2790-10.

✉ Correspondence should be addressed: Sofia N. Andreevskaya
Yauzskaya alleya, 2, str. 1A., Moscow, 107564; andsofia@mail.ru

Received: 06.08.2020 Accepted: 20.08.2020 Published online: 30.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.050

В последнее десятилетие во всем мире отмечен рост числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) [1]. Терапия МЛУ ТБ включает выполнение сложных и длительных лечебных протоколов, что негативно влияет на приверженность пациента к лечению. Поэтому перспективным направлением является разработка лекарственных форм противотуберкулезных препаратов (ПТП) пролонгированного действия, в частности активных субстанций, инкапсулированных в биорезорбируемые полимерные микрокапсулы, обеспечивающие контролируемый пространственный и временной выход препарата из полимерной структуры в окружающие ткани на протяжении 1–4 недель [2]. Применение сверхкритических флюидных технологий (СКФ) позволяет создавать универсальные экологически безопасные микронизированные системы, обеспечивающие полное отсутствие примесей органического растворителя [3]. Время выхода препарата из полимерного носителя во многом зависит от свойств полимерной матрицы (микрочастицы): состава, дисперсности и морфологии микрочастиц носителя. Причем в ряде случаев возможна ситуация, когда лекарственная субстанция располагается преимущественно на поверхности и в приповерхностной области, что приводит к быстрому и плохо контролируемому росту концентрации препарата во внешней среде. Такой высокий начальный выброс препарата представляет собой существенную проблему при использовании полимерных носителей, так как может оказывать токсическое воздействие на организм [4–6].

Для предварительной оценки кинетики высвобождения препарата из полимерных микрочастиц и матриц используют УФ-спектрофотометрию, которая позволяет определить накопление препарата в фосфатно-солевом буфере в процессе инкубации полимерного носителя [4]. Тем не менее эта модель оценки кинетики очень приближительна, поскольку для роста бактерий, и особенно микобактерий туберкулеза (МБТ), необходимы многокомпонентные среды, включающие большое число питательных веществ [7], что создает существенные помехи для УФ-спектрометрии и не позволяет использовать этот метод для оценки высвобождения препарата из носителя в условиях, приближенных к естественным.

Поэтому целью исследования была разработка *in vitro* модели для оценки высвобождения ПТП из полимерных носителей в среде, подходящей для культивирования микобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве лекарственной субстанции для включения в биорезорбируемый носитель был выбран левофлоксацин (LFX) — препарат, обязательный в схеме лечения туберкулеза с МЛУ.

Было запланировано адаптировать модель для работы в автоматизированной системе BACTEC MGIT 960. Преимущества использования системы BACTEC MGIT 960 обусловлены высокой эффективностью стандартизованных и сертифицированных по ISO 9001 производств реагентов и сред, а также применением стандартных протоколов исследования [8]. В системе BACTEC MGIT 960 культивирование микроорганизмов производят в специальных пробирках MGIT, на дне которых расположен связанный флюорофор под полупроницаемой

мембраной. Высвобождение флюорофора и испускание света определенной волны прямопропорционально зависят от потребления микобактериальными клетками кислорода в среде: чем больше активно делящихся клеток, тем интенсивнее они потребляют кислород и тем выше светимость флюорофора. Значимым параметром для определения антимикобактериального эффекта является время начала роста культуры под действием соединения. Существенная (более трех суток) задержка начала роста культуры *M. tuberculosis*, по сравнению с контролем без препарата, свидетельствует о гибели части микобактериальной популяции под действием тестируемого соединения.

Инкапсулированные формы LFX

В качестве исходного материала для формирования биорезорбируемых полимерных носителей левофлоксацина использовали полилактогликоolid (ПЛГ) марки Purasorb PDLG7502 (CorbionPurac; Нидерланды) с вязкостью 0,2 дЛ/г. В качестве активной субстанции использовали левофлоксацин (Sigma-Aldrich; США). Диоксид углерода марки ОСЧ (99,998%, «НИИХМ; Россия») использовали без дополнительной очистки. Антибиотик в количестве 10 мас. % (100 мг LFX на 900 мг полимера) инкапсулировали в ПЛГ-матрицы в пресс-формах цилиндрической формы с использованием сверхкритической флюидной пластификации исходной смеси с ПЛГ и LFX в среде диоксида углерода и ее последующего вспенивания при сбросе давления CO₂ до атмосферного. Микрочастицы со средним размером частиц 50 и 100 мкм получали путем криоизмельчения матриц в роторной мельнице с применением сухого льда (подробнее см. [4]).

Согласно разработанной модели рассчитанное количество полимерного носителя с инкапсулированным LFX инкубировали в среде Middlebrook 7H9 при 37 °C в течение 66 суток с отбором проб среды с выделившимся LFX в установленные сроки.

Культура МБТ

Исследование проводили на лабораторном чувствительном штамме *M. tuberculosis* H37Rv из коллекции ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза». Во всех экспериментах использовали стандартизированную по КОЕ культуру *M. tuberculosis*, находящуюся в логарифмической фазе роста и представляющую собой суспензию одиночных (неслипшихся) клеток. Для получения суспензии бактериальную массу, выросшую на среде Левенштейна–Йенсена, пассировали при 37 °C на бульоне Дюбо (Difco; США) с 0,5% БСА на протяжении двух циклов по 14 дней. Далее серийные 10-кратные разведения суспензии, профильтрованной через фильтр 5 мкм (Millipore; США), наносили в виде капель (объем капель — 20 мкл) на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco; США). Чашки Петри культивировали при 37 °C, а исходную суспензию хранили при 4 °C. Через 3–4 суток культивирования производили подсчет микроколоний с использованием инвертированного микроскопа Olympus (Olympus; США) ×200. Стандартизированную суспензию микобактерий в объеме 500 мкл засеивали на жидкую среду Middlebrook 7H9 (BD; США) с обогатительной добавкой OADC в пробирки MGIT для последующей автоматической детекции роста микобактерий в системе BACTEC MGIT 960 (BD; США).

Оценка бактериостатической активности на BACTEC MGIT 960

Бактериостатическую активность соединения оценивали по наличию или отсутствию роста в пробирке с определенной концентрацией препарата. Предварительно проведенное исследование в системе BACTEC MGIT960 на культуре с различным числом КОЕ МБТ показало, что снижение КОЕ не менее чем на 75% (75%-я ингибция роста) приводит к задержке начала роста культуры от трех дней, не менее 90% — от восьми дней, 99% — от 16 дней, 99,9% — 21 дня и т. д. [9]. Время проведения эксперимента составляло 42 дня, согласно протоколу производителя. Все выросшие культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к микобактериям туберкулеза). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Ziehl-Neelsen. Если в положительной пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT TBc ID согласно инструкции изготовителя. Для контроля роста в системе BACTEC MGIT 960 неспецифичной микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При появлении роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 ч инкубации при 37 °C делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифичной микрофлорой.

Методы статистического анализа

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику. Все микробиологические эксперименты проводили трехкратно. Для анализа данных использовали Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходя из того что для оценки накопления препарата в среде по динамике роста МБТ была использована система BACTEC MGIT960, от непосредственного размещения полимерного носителя с препаратом в пробирке MGIT, используемой в системе BACTEC MGIT 960, решено было отказаться по ряду причин. Во-первых, полимер мог влиять на светимость флюорофора и искажать результаты эксперимента, а во-вторых, при таком построении эксперимента возможна оценка только по конечной точке высвобождения, а не в динамике от первых часов до нескольких дней.

Поэтому полимерный носитель с инкапсулированным препаратом был помещен в культуральную среду Middlebrook 7H9 (эту же среду использовали в пробирках MGIT). Через определенные промежутки времени отбирали пробы среды с выделившимся препаратом (по 100 мкл среды на точку). Количество инкубируемого в среде инкапсулированного в полимерный носитель левофлоксацина рассчитывали таким образом, чтобы при высвобождении всего LFX в 100 мкл среды достигалась концентрация, достаточная для того, чтобы при добавлении этого объема в пробирку MGIT концентрация препарата в среде была равна минимальной ингибирующей концентрации (МИК) LFX.

При учете особенности включения LFX в полимерный носитель (поверхностное или равномерное включение) исходили из того, что поверхностно расположенный препарат будет легко удален из носителя при интенсивной отмывке. Отмывку полимерного носителя проводили средой Middlebrook 7H9 однократно. Для этого полимерный носитель в центрифужной пробирке заливали стерильной

средой объемом 30 мл, интенсивно встряхивали на вортексе, затем центрифугировали в режиме 3000 g при комнатной температуре 5 мин и полностью отбирали супернатант. Отмытый таким образом полимерный носитель использовали в эксперименте. Учитывая возможность поверхностного расположения препарата в полимере, в опыте с отмывкой носителя брали в 2 раза большее количество препарата, чем в опыте с неотмытым носителем, чтобы оставалась вероятность зарегистрировать бактериостатический эффект даже при элиминации части препарата с поверхности. Так, в опыте без отмывки в 30 мл культуральной среды инкубировали 6,3 мг полимера с включенным LFX (содержание LFX составило 0,63 мг). В опыте с отмывкой в 30 мл культуральной среды инкубировали 12,6 мг полимера с включенным LFX (содержание LFX составило 1,26 мг).

Таким образом, предложенная модель представляет собой два параллельно проводимых опыта с высвобождением препарата в культуральную среду: с нативной и отмытой инкапсулированными формами LFX. Сравнивая результаты двух опытов, можно уточнить кинетику выхода препарата в питательную среду. Например, ситуация быстрого бактериостатического эффекта, достигнутого при использовании среды, где инкубировали нативную инкапсулированную форму LFX, при отсутствии эффекта с аликвотами среды, в которой инкубировали отмытую инкапсулированную форму, будет свидетельствовать о том, что весь препарат (или большее его количество) располагался на поверхности полимера. При отсроченном бактериостатическом эффекте в опыте с отмывкой инкапсулированной формы по сравнению с нативной можно заключить, что определенная доля препарата при синтезе распределилась в полимере равномерно, а часть — поверхностно. В случае отсроченного бактериостатического эффекта в опыте без отмывки по сравнению с опытом с отмывкой носителя можно заключить, что препарат равномерно распределен в полимере и постепенно высвобождается (так как в опыт с отмывкой отбирали в 2 раза больше носителя с препаратом, то и эффект наступает раньше).

Влияние диапазона концентраций LFX на динамику роста *M. tuberculosis* H37Rv

Для определения количества инкапсулированных форм LFX, необходимого для исследования кинетики высвобождения препарата в культуральной среде, было исследовано влияние ряда концентраций LFX на рост лабораторного штамма МБТ. Для этого стандартизированную культуру инкубировали с LFX в концентрации от 0,031 до 0,4 мкг/мл в системе BACTEC MGIT 960. В качестве контроля использовали культуру без добавления препарата (табл. 1). Было показано, что МИК LFX в отношении используемого в эксперименте штамма составила 0,25 мкг/мл. На основании полученных данных была построена зависимость доза-эффект (рисунок), которую использовали в дальнейшем для определения выхода LFX из полимерного носителя в культуральную среду.

Исследование кинетики высвобождения LFX из биорезорбируемых полимеров в культуральной среде по оценке динамики роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv

По описанному выше дизайну были исследованы инкапсулированные формы LFX в трех вариантах

Таблица 1. Рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии левофлоксацина

Концентрация LFX, мкг/мл	Начало роста культуры (дни), Среднее \pm СО	Задержка начала роста культуры по сравнению с контролем, дни	Процент ингибиции роста
0 (контроль без препарата)	6,07 \pm 0,06	–	–
0,03125	6,08 \pm 0,12	нет	–
0,0625	6,20 \pm 0,27	нет	–
0,125	7,69 \pm 0,09	1,62	25
0,15	16,92 \pm 1,14	10,85	90
0,20	24,76 \pm 3,21	18,69	99
0,25	нет роста культуры		100
0,3	нет роста культуры		100
0,4	нет роста культуры		100

полимерных носителей — ПЛГ-матрикса и частиц размером 50 и 100 мкм. В качестве контроля использовали культуру МБТ без добавления препарата и культуру с добавлением проб среды, в которой культивировали интактный ПЛГ-матрикс (без включения LFX). Результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, при использовании в качестве носителя частиц ПЛГ размером 50 и 100 мкм обнаружен немедленный бактериостатический эффект в опыте с нативным носителем и отсроченный — в опыте с отмывкой носителя, из чего можно заключить, что большая часть LFX распределена по поверхности полимера (не менее 60%): уже через 3 ч инкубации неотмытого полимера в культуральную среду высвобождалось количество препарата (0,15–0,20 мкг/мл), достаточное для ингибирования роста более 90% популяции микобактериальных клеток.

В случае с LFX, включенным в ПЛГ-матрикс, наоборот, отсроченный бактериостатический эффект был отмечен в опыте без отмывки носителя (на первый день с отмывкой и на 29-й день — без отмывки), что свидетельствует о том, что LFX достаточно равномерно распределен в матриксе и высвобождается постепенно. Кроме того, результат, полученный в опыте с отмывкой, показывает, что часть препарата была сосредоточена в приповерхностной области: был отмечен выход 25% LFX уже в первые сутки, что выражалось в подавлении роста 25% микобактериальных клеток, далее отмечено равномерное

высвобождение препарата до 50% к 45-м суткам (полное подавление роста культуры вследствие достижения МИК LFX, равного 0,25 мкг/мл).

Рост культуры с аликвотами среды, в которой инкубировали матрикс без препарата, не отличался от роста культуры без добавления препаратов, что говорит об адекватности разработанной модели.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработанная модель и проведенные экспериментальные исследования позволяют оценить кинетику высвобождения противотуберкулезных препаратов в культуральной среде по подавлению роста культуры *M. tuberculosis in vitro*. Ранее испытания антимикобактериальной активности *in vitro* проводили только для липосомных форм инкапсулированных препаратов, использование которых не подразумевало постепенного высвобождения препаратов, а лишь способствовало их доставке к очагу туберкулезной инфекции. При подобных испытаниях применяли классические схемы исследования *in vitro*, нацеленные на оценку эффективности действия инкапсулированных форм препарата по сравнению с чистой субстанцией и оценку непосредственного токсического действия оболочки липосомы на микобактерии [10–12]. Препараты с пролонгированным высвобождением в модели *in vitro* изучали в отношении бактерий, не относящихся к роду

Таблица 2. Ингибирование роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv под действием высвободившегося из полимерного носителя LFX

Время инкубации	Ингибирование роста, %*						Концентрация LFX в среде**, мкг/мл (высвободилось препарата, %)					
	Частицы 50 мкм		Частицы 100 мкм		Матрикс		Частицы 50 мкм		Частицы 100 мкм		Матрикс	
	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм
1 ч	90	0	90	0	0	0	0,15 (60)	–	0,15 (60)	–	–	–
3 ч	90	0	99	0	0	0	0,15 (60)	–	0,20 (80)	–	–	–
1 сутки	99	0	99	0	0	25	0,20 (80)	–	0,20 (80)	–	–	0,125 (25)
3 суток	99	0	99	0	0	25	0,20 (80)	–	0,20 (80)	–	–	0,125 (25)
7 суток	99	0	99	0	0	90	0,20 (80)	–	0,20 (80)	–	–	0,15 (30)
10 суток	99,9	50	99	0	0	90	0,225 (90)	0,135 (67,5**)	0,20 (80)	–	–	0,15 (30)
16 суток	99,9	50	99	0	0	99	0,225 (90)	0,135 (67,5)	0,20 (80)	–	–	0,2 (40)
22 суток	99,9	50	99	0	0	99	0,225 (90)	0,135 (67,5)	0,20 (80)	–	–	0,2 (40)
29 суток	99,99	75	99,99	25	25	99,9	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,125 (50)	0,225 (45)
45 суток	99,99	75	99,99	25	90	100	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,15 (60)	0,25 (50)
66 суток	99,99	75	99,99	25	99	100	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,2 (80)	0,25 (>50)

Примечание: * — рассчитано по задержке начала роста культуры по сравнению с контролем без препарата; ** — определено согласно зависимости доза-эффект (см. рис.); *** — здесь и далее (в опытах с отмывкой матрикса): с учетом отмывки с поверхности препарата (% отмывки препарата = % препарата, вышедшего в среду за 3 ч в опыте без отмывки); б/отм — опыт без отмывки носителя от поверхностно расположенного LFX, отм — опыт с отмывкой носителя; – — количества выделившегося LFX недостаточно для достижения регистрируемого бактериостатического эффекта (меньше 0,125 мкг/мл).

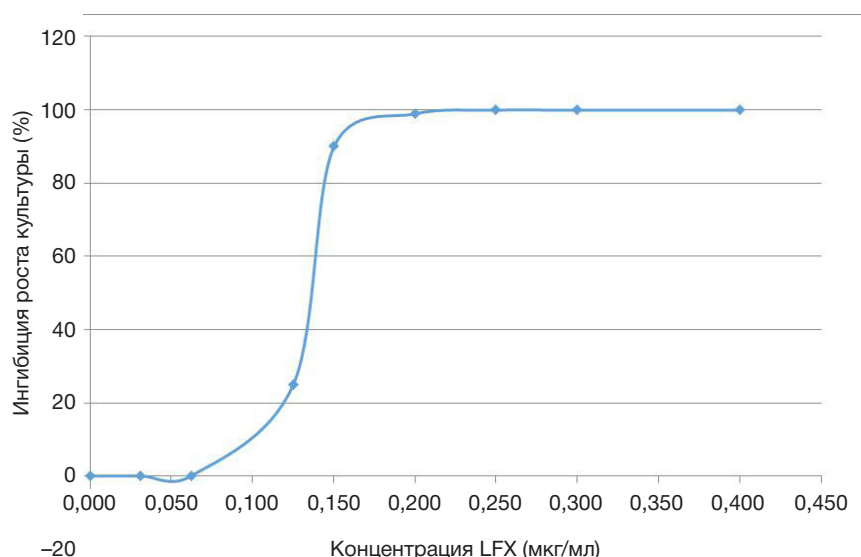


Рис. Зависимость доза–эффект LFX в отношении лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv

Mycobacterium, например, на *Staphylococcus aureus*, с построением графика зависимости время–эффект при культивировании бактерий в присутствии полимерного носителя с инкапсулированным антибиотиком [13].

Антимикробное действие инкапсулированных противотуберкулезных препаратов изучали преимущественно в моделях *in vivo*. При испытании на моделях туберкулеза мыши и кролика микрочастиц на основе ПЛГ с включением рифампицина [14], изониазида [15, 16], этионамида [17], комбинации рифампицина и изониазида [18], рифампицина и циклосерина [19] были показаны их высокая противотуберкулезная активность, пролонгированный эффект и сниженная токсичность по сравнению с традиционными формами препаратов. Использование экспериментальных животных для испытания инкапсулированных препаратов пролонгированного действия, с одной стороны, существенно облегчает практическую составляющую эксперимента и интерпретацию результата, так как здесь используют естественную фармакокинетику высвободившегося из носителя препарата. С другой стороны, модель *in vivo* из-за высоких финансовых затрат на проведение эксперимента (закупка и содержание линейных животных) и по этическим причинам не позволяет проводить скрининговые исследования большого числа носителей и включенных в них препаратов. Разработка моделей, позволяющих оценивать рост культуры *M. tuberculosis* при накоплении препарата в среде и под действием препарата, выделившегося в среду за определенный промежуток времени, весьма перспективна благодаря возможности испытания большого числа комбинаций носитель–препарат для отбора наилучшего варианта и дальнейшего испытания *in vivo*.

Анализ полученных результатов позволяет также ответить на вопрос, требуется ли предварительная подготовка носителя с препаратом перед экспериментом (нужна отмывка от поверхностно расположенного препарата или нет), и определить необходимое количество носителя с препаратом для эксперимента *in vivo* с учетом предварительной подготовки и кинетики высвобождения.

ВЫВОДЫ

Разработана модель *in vitro*, позволяющая проводить скрининг инкапсулированных пролонгированных форм противотуберкулезных препаратов. Применение такого подхода для оценки пролонгированных форм препаратов позволяет отобрать наиболее перспективную композицию (мало поверхностно расположенного препарата, равномерное высвобождение на протяжении всего срока эксперимента). Результаты, полученные для трех инкапсулированных форм LFX в биорезорбируемых полимерных носителях из ПЛГ, показали, что кинетика накопления препарата в среде существенно зависит от вида полимерного носителя и наиболее перспективен матрикс, который хорошо включает в себя LFX и достаточно равномерно высвобождает его при инкубации в среде.

В целом, разработанная модель может быть полезна не только для скрининга антимикобактериальной активности инкапсулированного левофлоксацина, но и для скрининга инкапсулированных форм любых других ПТП. Проведение такого скринингового исследования перед испытаниями *in vivo* позволит существенно снижать материальные затраты и, несомненно, более приемлемо с точки зрения биоэтики.

Литература

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
2. Bogorodskii SE, Krotova LI, Mironov AV, Popov VK. Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices Using Supercritical Carbon Dioxide. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2013; 7 (8): 916–23.
3. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development Adv Drug Del Rev. 2007; 59: 546.
4. Антонов Е. Н., Богородский С. Э., Дунаев А. Г., Кротова Л. И., Марьянац А. О., Сячина М. А., и др. Разработка компонентов антибактериальных лекарственных форм пролонгированного действия с использованием СКФ-технологий. Сверхкритические флюиды: теория и практика. 2020; 15 (1): 124–35.

5. Yehia SA, Elshafeey AH, Elsayed I. A novel injectable in situ forming poly-DL-lactide and DL-lactide/glycolide implant containing lipospheres for controlled drug delivery. *J Liposome Res.* 2012; 22 (2): 128–38.
6. Ahmed T. Review: approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pak J Pharm Sci.* 2015; 28 (2): 657–65.
7. Эргешов А. Э., редактор. Туберкулез органов дыхания. Руководство для врачей. М.: Галлея-Принт, 2017; 524 с.
8. Черноусова Л. Н., Севастьянова Э. В., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Попов С. А. и др. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. Тверь: Триада, 2014; 29 с.
9. Matyugina E, Khandazhinskaya A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Chizhov A, et al. The synthesis and antituberculosis activity of 50-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2012; 20: 6680–86.
10. Bhardwaj A, Kumar L, Narang RK, Murthy RS. Development and characterization of ligand-appended liposomes for multiple drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013; 41 (1): 52–9.
11. Сорокоумова Г. М., Ясин Я. О. Х., Миколович Ю. Л., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Селищева А. А., и др. Создание и изучение свойств липосомальной формы левофлоксацина. Тонкие химические технологии. 2013; 8 (5): 72–6.
12. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Zhogina YA, Smirnova DI, Mikulovich YL, Sorokoumova GM, et al. Effect of exogenous cardiolipin on the growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in vitro. *Dokl Biol Sci.* 2010; 434: 371–4.
13. Qiao Z, Yuan Z, Zhang W, Wei D, Hu N. Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47 (1): 790–8.
14. Quenelle DC, Staas JK, Winchester GA, Barrow EL, Barrow WW. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (5): 1144–51.
15. Kailasam S, Daneluzzi D, Gangadharam PR. Maintenance of therapeutically active levels of isoniazid for prolonged periods in rabbits after a single implant of biodegradable polymer. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75 (5): 361–5.
16. Gangadharam PR, Kailasam S, Srinivasan S, Wise DL. Experimental chemotherapy of tuberculosis using single dose treatment with isoniazid in biodegradable polymers. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33 (2): 265–71.
17. Kumar G, Malhotra S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Sharma S. In vitro physicochemical characterization and short term in vivo tolerability study of ethionamide loaded PLGA nanoparticles: potentially effective agent for multidrug resistant tuberculosis. *J Microencapsul.* 2011; 28 (8): 717–28.
18. Dutt M, Khuller GK. Therapeutic efficacy of Poly(DL-lactide-Co-Glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (1): 363–6.
19. Найденова А. А., Сукоян Г. В., Воронцов Е. А., Кузнецов С. Л., Гукасова Н. В., Рябцева М. С. и др. Разработка наносомальных композиций рифампицина и D-циклосерина на основе полилактидгликолидов и исследование их противотуберкулезной активности. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012; 3 (12): 23–30.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
2. Bogorodskii SE, Krotova LI, Mironov AV, Popov VK. Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices Using Supercritical Carbon Dioxide. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2013; 7 (8): 916–23.
3. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development *Adv Drug Del Rev.* 2007; 59: 546.
4. Antonov EN, Bogorodskiy SE, Dunayev AG, Krotova LI, Mariyanats AO, Syachina MA, i dr. Razrabotka komponentov antibakterial'nykh lekarstvennykh form prolongirovannogo deystviya s ispol'zovaniyem SKF-tekhnologiy. *Sverkhkriticheskiye fluidy: teoriya i praktika.* 2020; 15 (1): 124–35. Russian.
5. Yehia SA, Elshafeey AH, Elsayed I. A novel injectable in situ forming poly-DL-lactide and DL-lactide/glycolide implant containing lipospheres for controlled drug delivery. *J Liposome Res.* 2012; 22 (2): 128–38.
6. Ahmed T. Review: approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pak J Pharm Sci.* 2015; 28 (2): 657–65.
7. Ergeshov AE, editor. Tuberkuлез organov dykhaniya. *Rukovodstvo dlya vrachey.* M.: Galleya-Print, 2017; 524 s. Russian.
8. Chernousova LN, Sevastyanova EV, Larionova EE, Smirnova TG, Andreyevskaya SN, i dr. Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza. *Tver': Triada,* 2014; 29 s.
9. Matyugina E, Khandazhinskaya A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Chizhov A, et al. The synthesis and antituberculosis activity of 50-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2012; 20: 6680–86.
10. Bhardwaj A, Kumar L, Narang RK, Murthy RS. Development and characterization of ligand-appended liposomes for multiple drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013; 41 (1): 52–9.
11. Sorokoumova GM, Yasin YaOH, Mikulovich YuL, Smirnova TG, Andreyevskaya SN, Selishcheva AA, i dr. Sozdaniye i izucheniye svoystv liposomal'noy formy levofloksatsina. *Tonkiye khimicheskiye tekhnologii.* 2013; 8 (5): 72–6. Russian.
12. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Zhogina YA, Smirnova DI, Mikulovich YL, Sorokoumova GM, et al. Effect of exogenous cardiolipin on the growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in vitro. *Dokl Biol Sci.* 2010; 434: 371–4.
13. Qiao Z, Yuan Z, Zhang W, Wei D, Hu N. Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47 (1): 790–8.
14. Quenelle DC, Staas JK, Winchester GA, Barrow EL, Barrow WW. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (5): 1144–51.
15. Kailasam S, Daneluzzi D, Gangadharam PR. Maintenance of therapeutically active levels of isoniazid for prolonged periods in rabbits after a single implant of biodegradable polymer. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75 (5): 361–5.
16. Gangadharam PR, Kailasam S, Srinivasan S, Wise DL. Experimental chemotherapy of tuberculosis using single dose treatment with isoniazid in biodegradable polymers. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33 (2): 265–71.
17. Kumar G, Malhotra S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Sharma S. In vitro physicochemical characterization and short term in vivo tolerability study of ethionamide loaded PLGA nanoparticles: potentially effective agent for multidrug resistant tuberculosis. *J Microencapsul.* 2011; 28 (8): 717–28.
18. Dutt M, Khuller GK. Therapeutic efficacy of Poly(DL-lactide-Co-Glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (1): 363–6.
19. Naydenova AA, Sukoyan GV, Vorontsov EA, Kuznetsov SL, Gukasova NV, Ryabtseva MS, i dr. Razrabotka nanosomal'nykh kompozitsiy rifampitsina i D-tsikloserina na osnove polilaktidglikolidov i issledovaniye ikh protivotuberkuleznoy aktivnosti. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2012; 3 (12): 23–30. Russian.

АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ МОСКВЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Д. А. Каштанова^{1,2}✉, Н. С. Клименко³, И. Д. Стражеско¹, О. Н. Ткачева¹, Е. В. Старикова⁴, О. Е. Глущенко⁴, Д. А. Гудков⁴, Е. Н. Ильина⁴

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

² Центр стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

³ Институт биологии гена, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Старение населения ставит перед медицинским обществом задачу изучения здорового долголетия, предрасполагающих к нему биомаркеров и характерных особенностей. В настоящей работе рассмотрен один из таких факторов — микробиота кишечника. Целью исследования было изучить состав микробиоты кишечника долгожителей и провести сравнительный анализ с группой относительно здоровых более молодых лиц, проживающих на территории г. Москвы. В одномоментное исследование были включены 20 человек в возрасте 97–100 лет, средний возраст 98 ± 1 год, в качестве группы сравнения была выбрана группа из 92 человек 53 ± 13 лет. Для участников исследования обеих групп проводили секвенирование V3–V4 переменных участков гена 16S рПНК микробиоты кишечника. Для первичного анализа, фильтрации ридов и идентификации операционных таксономических единиц использовали QIIME 1.9, для реконструкции метаболических путей — алгоритм PICRUSt. Статистический анализ проводили с использованием языка Python v. 3.2. При межгрупповом сравнении были обнаружены значимые различия в микробиоте долгожителей и относительно здоровых лиц: в составе микробиоты первых были достоверно более представлены *Bifidobacterium* ($p = 0,026$) и *Coprococcus eutactus* ($p = 0,026$), в то время как у относительно здоровых лиц выявлено больше *Bacteroides* ($p = 0,003$) и *Prevotella* ($p = 0,002$). Потенциал синтеза масляной кислоты был выше в группе долгожителей ($p = 0,048$). Состав микробиоты кишечника долгожителей оказался неожиданно благоприятным, с большей представленностью полезных бактерий. Кроме того, можно говорить о возможном наличии у долгожителей более выраженного «противовоспалительного» потенциала микробиоты кишечника ввиду лучшей способности микробиоты синтезировать масляную кислоту.

Ключевые слова: микробиота кишечника, долголетие, масляная кислота, старение, системное вялотекущее воспаление

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 19-34-80033

Вклад авторов: Д. А. Каштанова — дизайн исследования, набор пациентов, интерпретация данных, написание статьи; Н. С. Клименко — биоинформатический анализ, интерпретация данных, написание статьи; И. Д. Стражеско — концептуализация исследования, редактирование статьи; О. Н. Ткачева — концептуализация и дизайн исследования; Е. В. Старикова — анализ микробиоты кишечника, редактирование статьи; О. Е. Глущенко, Д. А. Гудков — анализ микробиоты кишечника; Е. Н. Ильина — финальное редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 2 от 18 марта 2016 г.). Все участники подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Дарья Андреевна Каштанова
ул. 1-я Леонова, д. 16, г. Москва, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

Статья получена: 01.07.2020 Статья принята к печати: 15.07.2020 Опубликовано онлайн: 26.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.044

GUT MICROBIOTA ASSESSMENT IN MOSCOW LONG-LIVERS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Kashtanova DA^{1,2}✉, Klimenko NS³, Strazhesko ID¹, Tkacheva ON¹, Starikova EV⁴, Glushchenko OE⁴, Gudkov DA⁴, Ilina EN⁴

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Center for Strategic Planning of FMBA, Moscow, Russia

³ Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Demographic aging poses a challenge to the medical community, pressing for research into the biological factors promoting longevity and its features. Below, we look at the gut microbiota as one of such factors. The aim of this non-longitudinal study was to profile the gut microbiota of centenarians and to compare it with that of relatively healthy, younger Moscow residents. The study recruited 20 people aged 97–100 years (mean age 98 ± 1 year); the control group consisted of 92 individuals aged 53 ± 13 years. For each stool sample, the variable V3–V4 regions of the microbial 16S rRNA gene were sequenced. Primary analysis, read filtering and taxonomic identification were conducted in the QIIME 1.9 environment; reconstruction of metabolic pathways was aided by PICRUSt. Statistical analysis was performed by means of Python v. 3.2. A few differences were detected between the gut microbiota of centenarians and younger individuals: *Bifidobacterium* ($p = 0.026$) and *Coprococcus eutactus* ($p = 0.026$) were more abundant in centenarians, whereas *Bacteroides* ($p = 0.003$) and *Prevotella* ($p = 0.002$) were better represented in younger participants. The potential for butyric acid synthesis was higher in the group of centenarians ($p = 0.048$). Surprisingly, the gut microbiota of centenarians was more diverse and surprisingly beneficial for advanced age. Besides, the gut microbiota of centenarians might have more pronounced anti-inflammatory potential due to its ability to better synthesize butyric acid.

Keywords: gut microbiota, longevity, butyric acid, aging, systemic low-grade inflammation

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 19-34-80033).

Author contribution: Kashtanova DA — study design, participant recruitment, data interpretation, manuscript preparation; Klimenko NS — bioinformatic analysis, data interpretation, manuscript preparation; Strazhesko ID — study concept, manuscript revision; Tkacheva ON — study concept and design; Starikova EV — gut microbiota profiling, manuscript revision; Glushchenko OE, Gudkov DA — gut microbiota profiling; Ilina EN — final revision of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 2 dated March 18, 2016). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Daria A. Kashtanova
1-ya Leonova, 16, Moscow, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

Received: 01.07.2020 Accepted: 15.07.2020 Published online: 26.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.044

Микробиота кишечника вносит существенный вклад в функционирование организма человека в норме и патологии. Считается, что микробиота участвует и в процессах, ассоциированных со старением: влияет на метаболизм глюкозы [1], на процессы атерогенеза и кардиоваскулярное здоровье [2]. Была обнаружена взаимосвязь микробиоты с неблагоприятными исходами старения, в том числе с синдромом хрупкости и различными гериатрическими патологиями [3]. Предполагают также, что микробиота кишечника «стареет» вместе с человеком: по мере накопления возраст-ассоциированных заболеваний в кишечнике снижается разнообразие микроорганизмов, растет представленность условных патогенов, таких как *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, и уменьшается представленность «положительных» бактерий, таких как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, а также бутиратпродуцентов, играющих важную роль в снижении уровня воспаления [4]. Повышаются уровни эндотоксинов, уменьшается количество масляной кислоты [5]. Таким образом, стареющая микробиота может стимулировать вялотекущее воспаление, лежащее в основе возрастных патологий.

Но есть особая «модель» старения — это долгожители. Они максимально эффективно реализуют свой потенциал, у них значительно отодвинуто во времени развитие возраст-ассоциированных заболеваний. В микробиоте кишечника долгожителей детектируются высокие уровни полезных бактерий, достаточные уровни разнообразия [6, 7]. Несмотря на преклонный возраст доноров, в микробиоте этих людей сохраняется про- и противовоспалительный потенциал. Возможно, это один из антифакторов риска старения, поиском которых озадачена современная наука. На территории России до недавнего времени работ, посвященных изучению состава микробиоты кишечника долгожителей с использованием методов секвенирования нового поколения, не было. Целью настоящей работы стало изучение состава микробиоты кишечника долгожителей и проведение сравнительного анализа с группой более молодых лиц, не имеющих хронических заболеваний, проживающих на территории г. Москвы, а также долгожителей других стран.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В одномоментное исследование были включены 20 человек. Критерии включения: возраст 97–100 лет (средний возраст 98 ± 1 год). Критерий исключения: прием антибактериальных, химиотерапевтических, пробиотических препаратов за три месяца до забора образца стула. Для всех членов этой группы провели физикальный осмотр, комплексную гериатрическую оценку, собрали подробный анамнез. В рамках гериатрической оценки изучали адекватность питания всех участников с помощью краткой шкалы оценки питания (mini nutritional assessment, MNA). В качестве сравнения была выбрана группа из 92 человек 25–76 лет, не имеющих на момент включения в исследование тяжелых соматических патологий; клинические показатели членов этой группы описаны ранее [8].

Для участников исследования в обеих группах было проведено секвенирование V3–V4 вариативных участков гена 16S рНК микробиоты кишечника по соответствующему протоколу на секвенаторе MiSeq Illumina (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Подготовку библиотек проводили согласно протоколу производителя (16S Metagenomic Sequencing Library

Preparation) с использованием Nextera XT Index Kit (Illumina). В анализе применяли платформу Komics-biota [9]. Первичный анализ, фильтрацию ридов и идентификацию операционных таксономических единиц проводили с использованием QIIME 1.9 [10], реконструкцию метаболических путей — с использованием алгоритма PICRUSt [11]. Для статистической обработки применяли язык Python v. 3.2. Все результаты исследования представляли с поправкой на множественное сравнение и пол в группе долгожителей (тест MaAsLin) [12], с поправкой на множественное сравнение, возраст и пол при межгрупповом сравнении. Все вошедшие в анализ образцы ($n = 112$) соответствовали критериям качества по количеству картированных видов $>70\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав микробиоты кишечника у членов группы долгожителей

При изучении микробиоты долгожителей было обнаружено, что наиболее представленными микроорганизмами оказались симбиотические бактерии, многие из которых являются производителями масляной кислоты — семейств *Christensenellaceae*, *Ruminococcaceae*, и рода *Ruminococcus*. Все образцы близки к энтеротипу *Ruminococcus* [13]. Условно их можно разделить на кластеры, но с низкой силуэтной шириной. Фактически все образцы оказались относительно схожими между собой. Среднее значение показателя альфа-разнообразия микробиоты (индекс Шеннона) составило $6,3 \pm 0,59$. При этом интересным представляется распределение бактерий по филумам. В группе долгожителей относительно низким оказалось содержание бактерий филума *Bacteroidetes*, средняя представленность которых составила всего 7,8% при среднем значении *Firmicutes*, равном 78,7% (рис. 1). Клиническая характеристика изучаемой когорты долгожителей представлена в табл. 1.

Сравнение состава микробиоты кишечника долгожителей с таковым у лиц более молодого возраста

Состав микробиоты кишечника в группе относительно здоровых лиц младшего возраста представлял собой нормальный состав микробиоты кишечника здоровых людей. По результатам использования QIIME 1.9, средняя представленность *Bacteroidetes* в группе составила

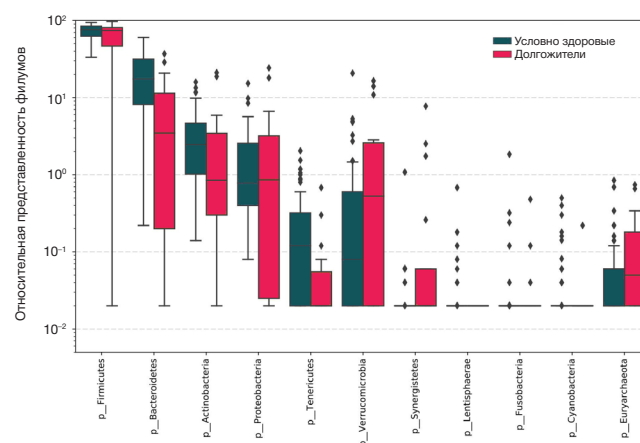


Рис. 1. Распределение микроорганизмов по филумам в группах долгожителей и более молодых условно здоровых участников

Таблица 1. Клинические характеристики группы долгожителей

Фактор	Медиана	МКР
Индекс массы тела, кг/м ²	25,10	5,66
Гериатрическая шкала «Возраст не помеха» (0–7 баллов)	3,00	1,25
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	155,00	32,50
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	78,00	9,00
ЧСС, уд./мин	69,00	9,00
Гериатрическая шкала депрессии	6,00	7,25
IADL	16,00	9,25
MNA	22,75	7,00
ТИМ сонных артерий, мм	1,31	0,25
Гликированный гемоглобин, %	5,79	0,50
вЧСРБ, мг/л	2,06	3,91
Триглицериды, ммоль/л	1,04	0,34
Липопротеины высокой плотности, ммоль/л	1,43	0,48
Липопротеины низкой плотности, ммоль/л	3,55	1,18
Сила сжатия кисти, кг	17,00	6,38
MOCA	11,50	18,00
MMSE	23,00	25,00

Примечание: вЧСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок; ТИМ — толщина интима-медиа; МКР — межквартильный размах; ЧСС — частота сердечных сокращений; IADL — шкала повседневной инструментальной активности (Instrumental activities of daily living); MMSE — краткая шкала оценки психического статуса (Mini-mental state examination); MNA — краткая шкала оценки питания (Mini nutritional assessment); MOCA — монреальская шкала когнитивной оценки (Montreal cognitive assessment).

20,23%, *Firmicutes* — 73,4% (см. рис. 1). При сравнении групп различия в представленности *Bacteroidetes* были значимыми (*adj. p* < 0,002; MaAsLin тест).

Показатель альфа-разнообразия микробиоты группы лиц более молодого возраста был представлен на уровне $7,56 \pm 0,49$, что выше, чем в группе долгожителей, однако значимости различие не достигло (*p* = 0,10).

Примечательными представляются находки, полученные в ходе сравнения микробиоты кишечника двух групп на уровне родов и видов. Уже с помощью PCoA (Principal Coordinate Analysis) можно увидеть, что образцы долгожителей и образцы более молодых условно здоровых участников исследования различаются (рис. 2).

После более подробного анализа были найдены различия микробиоты долгожителей, в составе которой оказалось значительно больше положительных бактерий, таких как *Bifidobacterium* и *Coprococcus* (табл. 2).

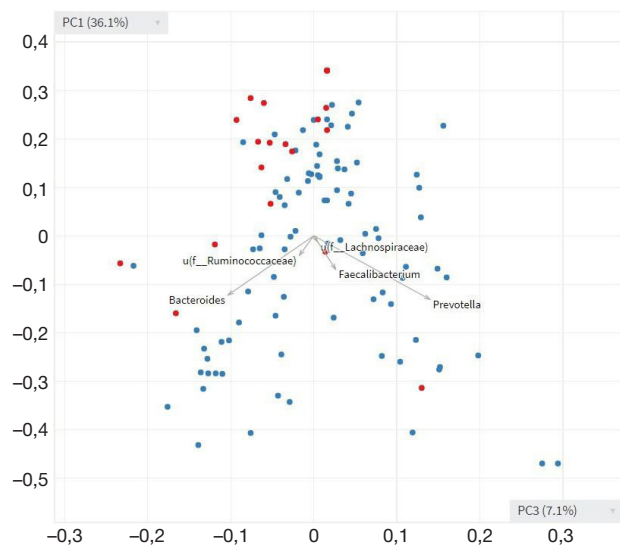


Рис. 2. График многомерного шкалирования образцов микробиоты долгожителей (красные точки) и условно здоровых участников исследования (синие точки)

Различия, видимые на графике многомерного шкалирования, подтвердились в анализе MaAsLin. В микробиоте условно здоровых более молодых участников исследования в большем количестве были представлены бактерии первых двух энтеротипов — *Bacteroides* и *Prevotella* (табл. 3).

Реконструкция метаболических путей в группах

При анализе метаболических путей микробиоты было обнаружено, что один из путей синтеза масляной кислоты через трансформацию ацетилкоэнзима А был выше у долгожителей (*adj. p* = 0,048; *lda* = 3,35), тогда как другие пути синтеза бутирата значимо не различались между группами (рис. 3).

В группе долгожителей была также проанализирована ассоциация состава микробиоты и потенциала синтеза

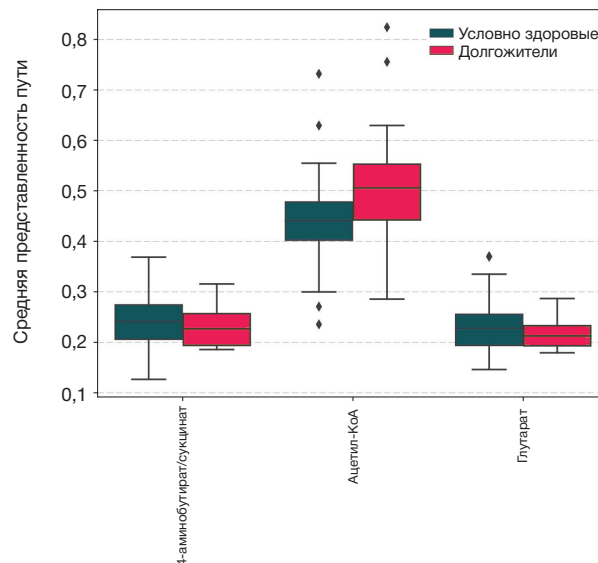


Рис. 3. Сравнение метаболических путей синтеза масляной кислоты в группах (по вертикальной оси показана средняя представленность путей)

Таблица 2. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте долгожителей

	Условно здоровые М, %	Условно здоровые МКР	Долгожители М, %	Долгожители МКР	<i>p</i>	<i>adj. p</i>
<i>Bifidobacterium</i>	1,904	2,598	2,278	4,724	0,013	0,026
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,472	0,887	0,779	2,041	0,021	0,043
<i>Coprococcus eutactus</i>	0,211	0,326	0,610	1,457	0,012	0,026

Таблица 3. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте условно здоровых участников исследования

	Условно здоровые М, %	Условно здоровые МКР	Долгожители М, %	Долгожители МКР	<i>p</i>	<i>adj. p</i>
<i>Bacteroides</i>	9,917	10,418	3,999	6,011	0,001	0,003
<i>Prevotella</i>	6,505	10,129	1,811	6,352	0,001	0,002
<i>Dialister</i>	2,104	3,066	0,129	0,392	< 0,001	0,001

Таблица 4. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте условно здоровых участников исследования

Пути синтеза витаминов	Коэффициент	<i>adj. p</i>	<i>p</i>
B ₁₂	0,002048	0,009	0,001
B ₇	0,000681	0,043	0,015
B ₁	0,000588	0,048	0,024

различных метаболитов с показателем полноценности питания в пожилом возрасте. В результате обнаружена взаимосвязь с представленностью метаболических путей. Балл по краткой шкале оценки питания оказался ассоциирован с потенциальным синтезом некоторых витаминов группы В, особенно витамина В₁₂. Чем выше был балл, тем выше оказалась потенциальная активность ряда метаболических путей согласно тесту MaAsLin (табл. 4).

Таким образом, в работе были обнаружены ряд особенностей состава микробиоты долгожителей, а также способность микробиоты долгожителей более эффективно производить бутират путем трансформации ацетилкоэнзима А.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сегодня никто не станет отрицать, что микроорганизмы играют огромную роль в нашей жизни. Однако мы крайне мало знаем о населяющих нас жителях. Большинство известных микроорганизмов было обнаружено не так давно благодаря развитию секвенирования нового поколения, и возможные пути их влияния на организм человека остаются малоизученными. Исследования с участием людей, как и представленная работа, по-прежнему достаточно немногочисленны, и чаще являются одномерными. Тем не менее обнаружение специфических особенностей микробиоты представителей успешного долголетия может помочь в последующей профилактике состояний, ассоциированных с микробиотой кишечника, в том числе и возрастных изменений. Основным результатом данного исследования стало описание микробиоты кишечника долгожителей, состав которой оказался более чем благополучным для столь преклонного возраста. Так, большинство работ, изучающих старение микробиоты, демонстрируют увеличение с возрастом количества условных патогенов и снижение полезных бактерий в кишечнике пожилых людей [4]. Но эта закономерность не подтверждена в группах благополучного старения.

До настоящего времени подобные исследования проводили за рубежом. Так, в одной из работ был зафиксирован более высокий уровень *Bifidobacterium* в группе долгожителей старше 105 лет по сравнению с людьми среднего возраста, однако этот тренд наблюдали именно в этой группе сверхдолгожителей, но не долгожителей более молодого возраста [6].

Примечательно, что, по данным той же работы, представленность таких полезных для человека бактерий, как *Akkermansia* и *Christensenellaceae*, также была выше у долгожителей. Эти результаты привели авторов к выводу, что сохранение здоровой микробиоты может вносить вклад и в долголетие участников исследования.

В составе микробиоты долгожителей были мало представлены патогены и условные патогены — разницы с более молодой когортой по таким бактериям выявлено не было. Более того, уровень бактерий, чрезмерная представленность которых может иметь негативное влияние, таких как *Bacteroides* и филума *Bacteroidetes*, был достоверно ниже в микробиоте долгожителей. Например, в исследовании японских авторов подобной зависимости обнаружено не было [7], и уровень выше упомянутых бактерий возрастал в группе глубоко пожилых лиц.

Микробиота кишечника изучаемой когорты долгожителей оказалась благополучной не только по своему составу. На доступном сегодня уровне реконструкции метаболизма были зафиксированы возможные механизмы влияния микробиоты на скорость старения изучаемой группы. Научно привлекательным представляется обнаружение более высокого потенциала синтеза бутирата среди долгожителей. Масляная кислота является противовоспалительным агентом [14, 15], и сохранение ее синтеза микробиотой может обуславливать замедленные темпы старения у долгожителей. В недавнем эксперименте введение мышам бутирата сопровождалось повышением плейотропного фактора роста фибробластов 21, что коррелировало с активацией AMPK и SIRT-1 и снижением активности сигнального пути mTOR [16], т. е. имело в некотором роде «омолаживающий эффект». Продолжение экспериментальных работ позволит сделать более конкретные выводы и установить причинно-следственные связи, но и к настоящему времени можно предположить, что в данной находке имеют отражение основные тенденции здорового старения. При этом выявление высокой метаболической активности микробиоты, проявляющейся в синтезе витаминов, у долгожителей, получивших высокие баллы по краткой шкале оценки питания, стоит интерпретировать с осторожностью. Несмотря на то что были обнаружены транспортеры витаминов в толстой кишке [17], все еще не до конца ясно, насколько принципиален для поддержания

уровня витаминов в крови их синтез микробиотой кишечника.

ВЫВОДЫ

Благодаря высокопроизводительному секвенированию мы имеем возможность многое узнать о состоянии «внутреннего мира» человека. По результатам настоящей

работы было показано сохранение нормального профиля микробиоты у долгожителей 97 лет и старше. Поддержание уровней симбиотических бактерий и высокого потенциала синтеза масляной кислоты может вносить вклад в сохранение здоровья долгожителей за счет поддержания нормального соотношения про- и противовоспалительного потенциала микробиоты кишечника.

Литература

1. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014; 63: 1513–21.
2. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017; 120 (7): 1183–96.
3. Gemikonakli G, Mach J, Hilmer SN. Interactions between the aging gut microbiome and common geriatric giants: polypharmacy, frailty and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; Feb 17: glaa047. DOI: 10.1093/gerona/glaa047. Epub ahead of print. PMID: 32064521.
4. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*. 2018; 4 (4): 267–85.
5. Aleman FDD, Valenzano DR. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 25; 15 (7): e1007727.
6. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turroni S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 2016; 26 (11): 1480–5.
7. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 90.
8. Kashtanova DA, Tkacheva ON, Doudinskaya EN, Strazhesko ID, Kotovskaya YV, Popenko AS, et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018; 6 (4): 98.
9. Efimova D, Tyakht A, Popenko A, Vasilyev A, Altukhov I, Dovidchenko N, et al. Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Min*. 2018; 11: 25.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
11. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*. 2013; 31 (9): 814–21.
12. Mallick H, Ma S, Franzosa EA, Vatanen T, Morgan XC, Huttenhower C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biol*. 2017; 18 (1): 228.
13. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.
14. Mishirot T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, et al. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab Invest*. 2013; 93 (7): 834–43.
15. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24 (7): 660–72.
16. Kundu P, Lee HU, Garcia-Perez I, Tay EXY, Kim H, Faylon LE, et al. Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (518): eaau4760.
17. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*. 2011; 437 (3): 357–72.

References

1. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014; 63: 1513–21.
2. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017; 120 (7): 1183–96.
3. Gemikonakli G, Mach J, Hilmer SN. Interactions between the aging gut microbiome and common geriatric giants: polypharmacy, frailty and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; Feb 17: glaa047. DOI: 10.1093/gerona/glaa047. Epub ahead of print. PMID: 32064521.
4. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*. 2018; 4 (4): 267–85.
5. Aleman FDD, Valenzano DR. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 25; 15 (7): e1007727.
6. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turroni S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 2016; 26 (11): 1480–5.
7. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 90.
8. Kashtanova DA, Tkacheva ON, Doudinskaya EN, Strazhesko ID, Kotovskaya YV, Popenko AS, et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018; 6 (4): 98.
9. Efimova D, Tyakht A, Popenko A, Vasilyev A, Altukhov I, Dovidchenko N, et al. Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Min*. 2018; 11: 25.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
11. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*. 2013; 31 (9): 814–21.
12. Mallick H, Ma S, Franzosa EA, Vatanen T, Morgan XC, Huttenhower C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biol*. 2017; 18 (1): 228.
13. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.
14. Mishirot T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, et al. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab Invest*. 2013; 93 (7): 834–43.
15. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24 (7): 660–72.
16. Kundu P, Lee HU, Garcia-Perez I, Tay EXY, Kim H, Faylon LE, et al. Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (518): eaau4760.
17. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*. 2011; 437 (3): 357–72.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВАРИАНТОВ С ЧАСТЫМИ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ КАПСИДНОГО БЕЛКА N В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ SARS-COV-2

С. А. Кирьянов , Т. А. Левина, М. Ю. Кириллов

ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия

SARS-CoV-2 представляет собой РНК-вирус семейства β -коронавирусов, вызвавший пандемию тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19). Предполагают, что эволюционные изменения генома ныне преобладающих исходных клонов могут быть обусловлены географическими особенностями, поэтому для штаммов разного происхождения могут быть характерны различные паттерны мутаций. Целью исследования было провести мутационный и филогенетический анализы геномов SARS-CoV-2 российского происхождения в разные периоды и в разных регионах, а также охарактеризовать мутационные профили изолятов, используя подходы биоинформатики. Проведено сравнение накопления мутаций в 86 полногеномных последовательностях SARS-CoV-2 из России и 220 из Европы и Северной Америки для выявления характерных генных вариаций, возможных паттернов селективного отбора. Помимо известных мутаций в генах структурных белков, типичных для изолятов европейского происхождения, выявлены дополнительные синонимичные мутации российского происхождения, в том числе в гене *M* (C26750T). Двойная мутация R203K и G204R в гене нуклеокапсида, ранее появившаяся в Европе, распространилась и быстро (в течение месяца) стала доминирующим вариантом в России. Полученные результаты свидетельствуют о том, что геном значительной части изолятов SARS-CoV-2 из России эволюционирует с накоплением новых мутаций, способствующих повышению трансмиссивности вируса. Данные о специфических мутационных паттернах генома SARS-CoV-2 могут быть использованы для выявления вируса, отслеживания и контроля его распространенности.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, геном, коронавирус, мутации, российские изоляты

Вклад авторов: авторы внесли равный вклад в написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Альбертович Кирьянов
а/я 181, г. Москва, 117587; kiryanov@dna-technology.ru

Статья получена: 26.06.2020 **Статья принята к печати:** 10.07.2020 **Опубликована онлайн:** 27.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.045

SPREAD OF VARIANTS WITH GENE N HOT SPOT MUTATIONS IN RUSSIAN SARS-COV-2 ISOLATES

Kiryanov SA , Levina TA, Kirillov MYu

"DNA-Technology", Moscow, Russia

SARS-CoV-2 is a RNA coronavirus of the β -CoV family responsible for the pandemic of the severe acute respiratory syndrome (COVID-19). It is hypothesized that the viral genome of the contemporary predominant founder clones is likely to be evolving in geographic-dependent manner. Thus, strains of different origin may be characterized by different mutation patterns. The study was aimed to perform the mutational and phylogenetic analysis of the Russian SARS-CoV-2 genomes at different time periods and in various regions, as well as to characterize the mutational profiles of isolates using the bioinformatics approaches. The mutation accumulation was compared in 86 SARS-CoV-2 whole-genome sequences from Russia and 220 from Europe and North America in order to reveal the characteristic gene variations, the possible positive selection patterns. Along with the known mutation variants in the structural proteins genes, typical for isolates of European origin, several additional mutations including the synonymous mutation in gene *M* (C26750T) characteristic for Russian isolates were revealed. Double mutation R203K and G204R in the nucleocapsid gene which previously emerged in Europe began spreading and rapidly (within a month) became the dominant form in Russia. The results obtained indicate that the viral genome of most Russian isolates evolves with accumulation of new mutations associated with increased viral transmission. Data on the SARS-CoV-2 genome specific mutation patterns might be used for the detection of the virus, as well as for tracking and controlling of its spread.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, genome, coronavirus, mutations, Russian isolates

Author contribution: the authors contributed to the manuscript equally.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergei A. Kiryanov
PO Box 181, Moscow, 117587; kiryanov@dna-technology.ru

Received: 26.06.2020 **Accepted:** 10.07.2020 **Published online:** 27.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.045

Характерной особенностью пандемии COVID-19 является быстрое распространение вируса во многих (более 187) странах мира [1]. Выявлены значительные различия в распространенности, уровне смертности и тяжести заболевания между географическими регионами, странами, а также среди возрастных групп инфицированных [2–4].

Обнаруженные различия можно объяснить тем, что геном SARS-CoV-2 эволюционирует и дифференцируется по географическому признаку (благодаря введению режима изоляции и физического дистанцирования) с образованием нескольких типов от исходного типа из г. Ухань (провинция Хубэй, КНР) [5, 6]. Известно, что РНК-вирусы легко накапливают мутации. В случае возникновения неадаптивных мутаций вирусы элиминируются. При наличии адаптивных мутаций можно ожидать, что вирус получит

селективное преимущество, а это, как правило, проявляется в высокой частоте указанных мутаций и, соответственно, в более высокой трансмиссивности вируса.

Быстрое распространение SARS-CoV-2 в мире вызывает вопрос о том, обусловлена ли его эволюция драйверными адаптивными мутациями и если да, то в каких генах.

Размер генома коронавируса составляет около 29 900 нуклеотидов. Геном SARS-CoV-2 кодирует протяженный полипротеин репликативного комплекса ORF1ab и четыре структурных белка: мембранный (M), поверхностный гликопротеин (S), оболочечный (E) и нуклеокапсидный фосфопротеин (N), как и у других β -коронавирусов [7].

Геном SARS-CoV-2 интенсивно исследуют, как в целях диагностики и анализа патогенности этого вируса, так и в целях отслеживания его эволюции. В настоящее

время в базе данных GISAID находится более 25 000 последовательностей вируса, выделенных в нескольких десятках стран. Ранее эволюционные изменения генома вируса SARS-CoV-2 прослеживали по паттернам мутаций в генах *ORF1ab*, гликопротеина S и неструктурных протеинов *nsp6* и *nsp8* [8–10]. Так, высокая частота мутаций C241T, C3037T и C14408T в гене *ORF1ab*, кодирующем белки репликативного комплекса, и мутации A23403G в гене S, продукты которого взаимодействуют с рецептором ACE2, были обнаружены в изолятах вируса SARS-CoV-2 из стран Западной Европы, где заболевание COVID-19 протекает более тяжело, чем в других географических регионах [11]. В совокупности указанные мутации, определяющие клад 20A (ранее известный как клад G), по-видимому, обуславливают повышенную трансмиссивность вируса и его доминирование в Европе.

Интерпретация данных по эволюции генома SARS-CoV-2 остается неполной, поскольку существующие публикации по-прежнему охватывают преимущественно изоляты, представленные в США, странах Европы, КНР, и некоторых других странах. В частности, недостаточно информации о мутационных профилях геномов изолятов SARS-CoV-2 российского происхождения, изучение которых особенно актуально в связи с контрастирующими друг с другом высоким ростом инфицирования и невысокой смертностью.

Целью исследования было провести мутационный и филогенетический анализы геномов SARS-CoV-2 из России в разные периоды и в разных регионах, а также охарактеризовать мутационные профили изолятов, используя подходы биоинформатики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 1 марта по 29 апреля 2020 г. с использованием баз данных NCBI и GISAID было отобрано 86 нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2 из России и 220 из Европы и США. Критерии включения: длина полноразмерной последовательности 26 000–30 000 п.н., последовательности аннотированы как SARS-CoV-2. Критерии исключения: повторно представленные последовательности, последовательности со слишком большим числом неопределенных нуклеотидов. Для выравнивания множественных последовательностей применяли программы Clustal Omega (EMBL-EBI; Великобритания) и Blast (NCBI; США). В качестве последовательности сравнения для анализа последовательностей, выделенных у пациентов из России, выбрали MT233519, SARS-CoV-2/human/ESP/Valencia5/2020.

Для филогенетического анализа последовательностей SARS-CoV-2, временного датирования предковых узлов, реконструкции дискретных признаков, частоты и датирования появления анкорных специфических мутаций на филогенетических ответвлениях использовали программу <https://nextstrain.org/> [12].

Предсказание В-клеточных эпитопов проводили по результатам анализа и в соответствии с ранее предложенным группой исследователей для SARS-CoV алгоритмом [13]. Для предсказания потенциальных В-клеточных эпитопов в первичной аминокислотной последовательности фосфопротеина N применяли следующие инструменты прогнозирования: для линейных В-клеточных эпитопов программу VeriPred-2.0 (DTU; Дания) [14], для конформационных эпитопов — программу

DiscoTope 2.0 (DTU; Дания) [15], предоставляемые сервером с базой данных эпитопов IEDB Immunobrowser (NIAID; США).

Потенциальные линейные В-клеточные эпитопы были предсказаны с использованием программы VeriPred-2.0 (DTU; Дания) [14] при максимальном пороговом значении 0,75, что соответствовало специфичности выше 0,85 и чувствительности ниже 0,40 (с учетом последовательностей, содержащих более семи аминокислотных остатков). Прогнозирование конформационных эпитопов проводили с использованием программы DiscoTope 2.0 (DTU; Дания) [15], применив ограничение позитивности выше –3,7, что соответствовало специфичности больше или равной 0,75 и чувствительности ниже 0,40.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках исследования было проанализировано 86 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, выделенных у российских пациентов в марте-апреле 2020 г. Из них 38 изолятов (44%) получили в марте и 56 (56%) — до конца апреля 2020 г. Нуклеотидные последовательности генома вируса подвергли выравниванию и сравнили с последовательностями SARS-CoV-2 от 220 европейских и американских пациентов, случайным образом отобранных из базы данных GISAID. Филогенетический анализ выбранных нуклеотидных последовательностей российского и европейского происхождения показал, что все российские изоляты, за исключением одного, принадлежали к кладу 20A, который ранее классифицировали как G (рис. 1). Все остальные последовательности, кроме одного выделенного в марте образца из Кабардино-Балкарии, содержали мутацию A23403G с заменой D614G в гене гликопротеина S, мутацию C14408T с заменой P314L в гене белка ORF1b, а также синонимичные мутации C241T и C3037T. В Европе указанные мутации ранее обнаружили в изоляте из Германии (Germany/BavPat1/2020), а затем в изолятах из Италии, выделенных в феврале. По-видимому, все перечисленные мутации образуют эволюционно стабильный гаплотип, который сейчас доминирует в европейских изолятах, изолятах с восточного побережья США, а также изолятах российского происхождения.

По наличию или отсутствию тройной мутации G28881A, G28882A и G28883C в гене N, вызывающей двойную несинонимичную мутацию R203K и G204R, последовательности геномов SARS-CoV-2 изолятов из России можно разделить на две неравные группы, из 59 и 26 последовательностей соответственно. Филогенетический анализ изолятов из России, Европы и США показал, что двойная мутация R203K и G204R, ранее обнаруженная в изоляте из Валенсии, Испания (MT233522, 2 марта 2020 г.), также образует отдельный субклад 20B (рис. 1). Следует отметить, что в отличие от российских изолятов большинство европейских и американских изолятов образует субклады без тройной мутации G28881A, G28882A и G28883C.

Субклад российских изолятов с двойной характеристической мутацией R203K и G204R делится на три неравные группы. Наиболее многочисленной является группа AP1, содержащая более 40 изолятов, выделенных преимущественно в Санкт-Петербурге и, по-видимому, имеющих итальянское происхождение. Указанная группа дивергировала от предшественника, ее определяет синонимичная мутация C26750T в гене M, специфичная только для рассмотренных российских

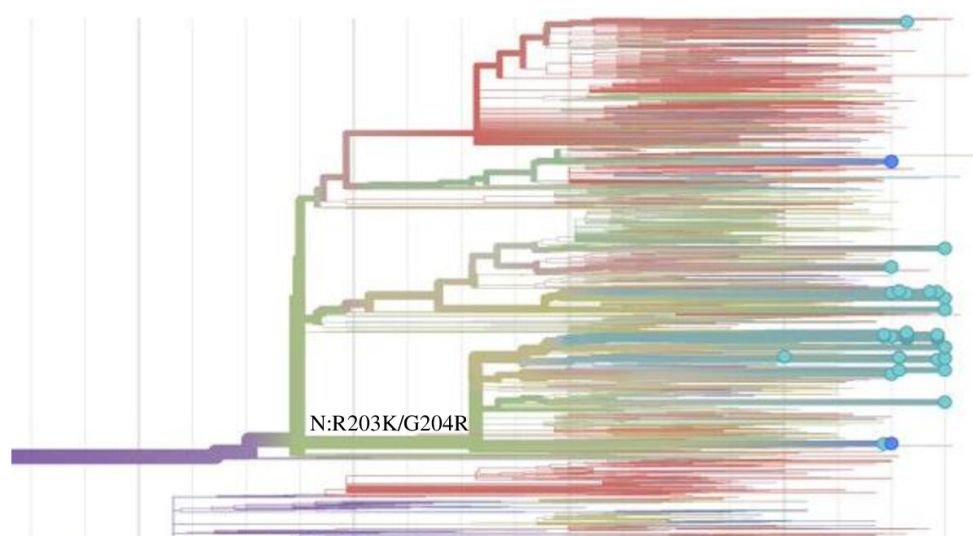


Рис. 1. Филогенетическое дерево геномов российских, европейских и американских изолятов SARS-CoV-2, дифференцированных по наличию или отсутствию двойной мутации R203K и G204R в гене *N*. Голубым цветом выделены российские изоляты, зеленым и темно-зеленым — европейские изоляты, темно-красным — американские изоляты

изолятов. Время появления данной мутации — не позднее начала марта. Для этой группы также характерен эффект микроклональности, определяемый накоплением преимущественно синонимичных мутаций в 5'-области гена *ORF1ab*, которые делят варианты геномов на дополнительные субпопуляции. Сведения о выделенных подгруппах и мутациях представлены в табл. 1.

Группу AP2 (шесть изолятов из Москвы и два из Якутии) определили мутации в гене *ORF1a* (G3278S, T1246I, L3606F) и синонимичная мутация C23731T в гене *S*. Подгруппа из четырех изолятов из Москвы и Якутии впоследствии дивергировала с накоплением мутации A364S и дополнительной мутации M1499I в гене *ORF1ab*. Последняя мутация специфична только для изолятов российского происхождения, она появилась не позднее середины марта.

В еще одной группе изолятов AP3 (шесть изолятов из Москвы, Липецка и Краснодара) итальянского происхождения есть характерная мутация T175M в гене *M*. Изоляты различаются также по дальнейшему мутированию гена *ORF1ab* (мутации P892S, I1887V). В наименее представленной группе из трех изолятов (Москва) присутствует дополнительная мутация A152S в гене *N*, выявленная не позднее середины марта.

В группе из 26 изолятов без двойной мутации R203K и G204R в гене *N* накопление мутаций также происходит в основном в гене *ORF1ab*. Наиболее часто встречающейся дифференцирующей мутацией является синонимичная мутация в позиции A20268G испанского происхождения (обнаружена в 16 изолятах, преимущественно из Санкт-Петербурга). Наличие несинонимичных мутаций в гене *ORF1ab* (T265I, P3395L и др.), а также в генах *ORF3a* (Q57H) и *M* (D3G) позволило выделить несколько подгрупп с незначительным числом изолятов (4–6). Происхождение указанных изолятов и дополнительные мутации представлены в табл. 1. Только в трех изолятах из 26 обнаружили дополнительные несинонимичные мутации в гене *N*: двойную мутацию N140K и T205I, а также N140T и A397V.

Таким образом, независимо от происхождения варианты SARS-CoV-2 с двойной мутацией R203K и G204R в гене *N* доминируют в разных регионах России.

Для определения времени появления и распространения двойной мутации R203K и G204R был проведен анализ

наиболее представленных геномов вируса, полученных у пациентов из Москвы и Санкт-Петербурга в марте-апреле 2020 г., которые классифицировали в соответствии с датами выделения образцов (указанными в базе данных GISAID). Четыре временные подгруппы выделили следующим образом: 10–12 марта 2020 г. (геномы от восьми пациентов), 19–21 марта 2020 г. (геномы от девяти пациентов), 1–3 апреля 2020 г. (геномы от 16 пациентов), 10–12 апреля 2020 г. (геномы от 29 пациентов). Число других накапливаемых мутаций (в основном в гене *ORF1ab*) менялось в течение каждого временного периода: 2, 4 и 4 в группе с двойной мутацией R203K и G204R, и 2, 3 и 3 в группе геномов без такой мутации. При этом в последних присутствовали мутации в гене *N*: двойная мутация N140K и T205I, а также N140T. Дивергенция других генов не влияла на распространение вариантов с двойной мутацией R203K и G204R в гене *N*. В конце марта — начале апреля доля изолятов с двойной мутацией R203K и G204R выросла более чем в два раза и к середине апреля составила более 69,5% (рис. 2).

Были проверены общее распределение и представленность мутаций в гене *N* в нуклеотидных последовательностях изолятов из Европы и США, размещенных в базах данных GISAID и NCBI. Интересно, что в европейских популяциях представленность геномов субклада с двойной мутацией R203K и G204R в гене *N* оказалась существенно ниже, чем в России, и составила 32,6% (1068 геномов против 3241 без этой мутации). В США доля геномов того же субклада еще ниже, она составляет 13,3% (464 генома против 3479). Распределение несинонимичных мутаций в гене *N* оказалось неравномерным: 58,7% мутаций были локализованы на участке гена *N*₁₇₉₋₂₁₇. С помощью алгоритмов предсказания для линейных В-клеточных эпитопов в протеине N предсказали два варианта возможных линейных В-клеточных эпитопов с максимальным пороговым значением > 0,758, в позициях 23–36 и 178–207 соответственно (табл. 2). Конформационные В-клеточные эпитопы в гене *N* с пороговым значением > -0,37 и специфичностью 0,75 были предсказаны с использованием соответствующего алгоритма примерно в тех же позициях (26–36 и 193–207), включая фланкирующие R203, G204 и T205 (данные не представлены). Однако

Таблица 1. Субкластеры и характеристические мутации, выявленные в российских изолятах SARS-CoV-2

Субкластеры — мутации в гене <i>N</i>	*Мутации в <i>ORF1ab</i>	**Мутации в других генах	***Дополнительные мутации	Вероятное происхождение	Время появления	Регион России и число изолятов
AP1 - R203K G204R		M: c26750t	ORF1a: P959S - 7 ORF1a: P309L 8	Италия Италия	02.03.2020 16.04.2020	г. Санкт-Петербург (40) респ. Саха (Якутия) респ. Бурятия (5)
AP2 - R203K G204R	ORF1a: G3278S (g10097a) S: c23731t	ORF1a: A364S	ORF1b: M1499I	Англия	09–16.03.2020	г. Москва (2) респ. Саха (Якутия) (2)
		ORF1a: T1246I L3606F	ORF7a: L5F	Англия	02.03.2020	г. Москва (4)
AP3 - R203K G204R		M: T175M	ORF1a: P892S, ORF1b: I1887V N: A152S	Италия	01–10.03.2020 14.03.2020	г. Липецк (2) г. Краснодар (1) г. Москва (3)
R203 G204	a20268g		N: N140T 8 N: N140K, T205I; ORF8: R101L	Испания	04–08.03.2020	г. Санкт-Петербург (14) г. Псков (1) г. Омск (1)
R203 G204	ORF1a: T265I (c1059t)	ORF3a: Q57H (g25563t)	ORF1a: P3395L S: G261V, ORF1a: L3606F c29200t	Франция Австрия	04–16.03.2020 08–15.03.2020	г. Оренбург (2) о. Сахалин (1) г. Челябинск (1) г. Москва (2)
R203 G204		M: D3G (a26530g)	G4255T ORF1a: L890F; ORF1b: Q348H, M1156I; ORF1b: L1701F, V1615I	Англия	04–05.03.2020 11.03.2020	г. Москва (2) г. Москва (2)

Примечание: * — дифференцирующие мутации в гене *ORF1ab*, определяющие принадлежность изолята к подгруппе; ** — дифференцирующие мутации в других генах, определяющие принадлежность изолята к подгруппе; *** — другие частые мутации, выявленные в изолятах.

с учетом критерия специфичности (0,75) около 25% аминокислотных остатков могут быть предсказаны как часть В-клеточного эпитопа неверно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По имеющимся данным, геном SARS-CoV-2 эволюционирует с образованием нескольких типов, кластеризующихся в отдельные географически обусловленные группы [16]. Мутационный анализ географически обусловленных изолятов позволяет получить представление о наиболее частых адаптивных мутациях, обеспечивающих высокую трансмиссивность вируса. Ранее было обнаружено, что не менее пяти основных мутаций (C241T, C3037T, T28144C, C14408T, A23403G) оказались наиболее представленными в изолятах вируса SARS-CoV-2 из Западной Европы [11]. Указанные комутации, определяющие клад 20A, по-видимому обеспечивают повышенную трансмиссивность вируса и его доминирование в Европе. По результатам

мутационного и филогенетического анализов геномов SARS-CoV-2, обнаруженных в России в марте-апреле 2020 г., наиболее распространенным также оказался клад 20A, что указывает на европейское происхождение российских изолятов. Однако в России, в отличие от Западной Европы, распространился и доминирует субклад 20B с тройной мутацией G28881A, G28882A и G28883C, вызывающей двойную замену R203K и G204R в гене протеина N. Так, в России в конце апреля представленность геномов с двойной мутацией R203K и G204R составила более 69,5%, тогда как в Европе — 32,6%. В США число геномов того же субклада с мутациями R203K и G204R было еще ниже, их доля достигла 13,3%. Предположительно, указанный вариант появился в России в начале-середине марта 2020 г. Его дальнейшее распространение сопровождалось формированием новых подтипов с накоплением характерных мутаций в гене *M* (C26750T) или *ORF1b* (M1499I или G17964T) и последующей дивергенцией за счет новых единичных (в основном синонимичных)

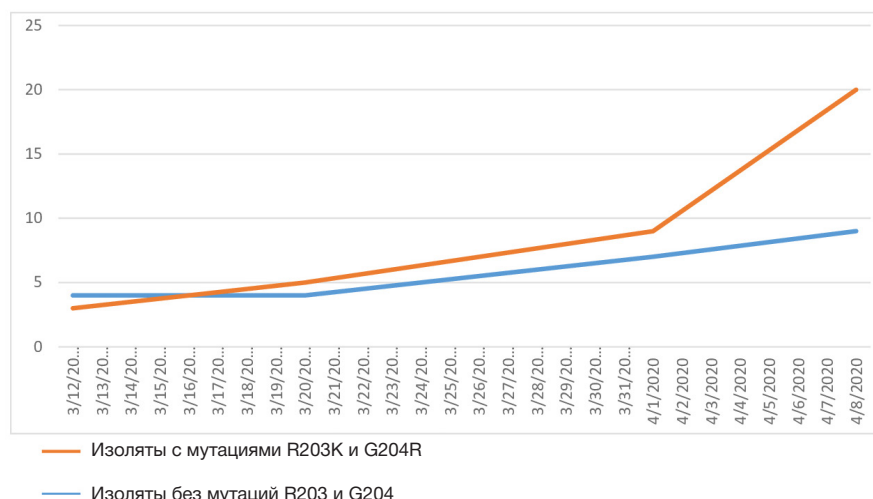


Рис. 2. Динамика представленности изолятов SARS-CoV-2 с мутациями R203K и G204R в гене *N* в России в марте-апреле 2020 г.

Таблица 2. Варианты предсказанных В-клеточных эпитопов в нуклеокапсидном белке N SARS-CoV2

Тип эпитопа	Позиция в белке N	Позиции мутаций	Аминокислотная последовательность эпитопа
В-клеточный	178–207	R203K G204R T205I	GGSQASSRSSSRNSSRNSTPGSSRGTS
В-клеточный	23–36		STGSNQNGERSGAR

мутаций в гене *ORF1ab*. Быстрое мутирование варианта с двойной мутацией R203K и G204R в гене *N*, по-видимому, отражает его способность к адаптации и повышению трансмиссивности, а не модуляции вирулентности.

Пока возможный функциональный эффект внедрения мутантного мотива AAACGA в ген нуклеокапсида неизвестен. Белок N отвечает за образование спирального нуклеокапсида в ходе сборки вириона и играет ключевую роль в его репликации и транскрипции. Он может вызывать иммунный ответ и быть потенциальной мишенью при разработке вакцин [17]. Ранее сообщали о локализации потенциальных В-клеточных и Т-клеточных эпитопов в гликопротеине S, мембранном M и капсидном фосфопротеине N, предсказанных по гомологичным участкам в геноме коронавируса SARS-CoV [18]. Предпринятая нами попытка картирования предсказанного пептида В-клеточного эпитопа N_{179–207} аминокислотной последовательности гена *N* допускает возможность того, что позиции R203 и G204 располагаются в пределах эпитопа. В результате мутаций R203K и G204R возникают два сильных положительно заряженных аминокислотных остатка в близких положениях, в отличие от только одного положительно заряженного остатка в немутантном генотипе, что, возможно, способствует снижению конформационной энтропии по сравнению с исходным генотипом. В настоящий момент биоинформационные подходы в отсутствие экспериментальных данных не позволяют оценить биологическую значимость этих мутаций.

Кроме того, нет оснований связывать распространенность данных мутаций вируса SARS-CoV-2 в России и его патогенность. Дальнейшее изучение эволюции генома вируса SARS-CoV-2 позволит не только реконструировать текущие эпидемиологические процессы, но и оптимизировать существующие ПЦР-РВ-диагностические тест-системы и осуществить поиск новых мишеней для разработки вакцин.

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют о том, что подавляющее большинство российских изолятов SARS-CoV-2 имеет европейское происхождение. Вирусный геном значительной части российских изолятов SARS-CoV-2 эволюционирует с накоплением новых мутаций, способствующих повышению трансмиссивности вируса. Накопление двойной мутации R203K и G204R в гене *N* в изолятах российского происхождения привело к быстрой популяционной экспансии данного варианта и его доминированию в России.

Выявление характерных вариантов геномов вируса SARS-CoV-2 в России дает представление о его дальнейшей адаптивной эволюции. Данные о специфичных мутационных паттернах генома SARS-CoV-2, в том числе в генах структурных белков N и M, могут быть использованы для выявления SARS-CoV-2, отслеживания и контроля его распространенности.

Литература

- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579 (7798): 270–3. PubMed PMID: 32015507.
- Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 669–7. PubMed PMID: 32240634.
- Spychalski P, Błazyńska-Spychalska A, Kobiela J. Estimating case fatality rates of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (7): 774–5. PubMed PMID: 32243815.
- Khafaie MA, Rahim F. Cross-country comparison of case fatality rates of Covid-19/SARS-CoV-2. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2020; 11 (2): 74–80. PubMed PMID: 32257772.
- Phan T. Novel coronavirus: from discovery to clinical diagnostics. *Infect Genet Evol*. 2020; 79: 104211. PubMed PMID: 32007627.
- Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci*. 2020; 117 (17): 9241–3. PubMed PMID: 32269081.
- Boopathi S, Poma A, Kolandaivel P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *J Biomol Struct Dyn*. 2020; 1–10. PubMed PMID: 32306836.
- Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020; 18: 179. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>.
- Benvenuto D, Angeletti S, Giovanetti M, Bianchi M, Pascarella S, Cauda R, et al. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *J Infect*. 2020; 81 (1): 24–7. PubMed PMID: 32283146.
- Stefanelli P, Faggioni G, Lo Presti A, Fiore S, Marchi A, Benedetti E, et al. Whole genome and phylogenetic analysis of two SARSCoV-2 strains isolated in Italy in January and February 2020: additional clues on multiple introductions and further circulation in Europe. *Euro Surveill*. 2020; 25 (13): 1–5. PubMed PMID: 2000305.
- Yin C. 2020 Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. *Genomics*. 2020; 112 (5): 3588–6. PubMed PMID: 32353474.
- Hadfield J, Megill K, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018; 34 (23): 4121–3. PubMed PMID: 29790939.
- Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, Scheuermann RH, Peters B, Sette A. A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (4): 671–80. PubMed PMID: 32183941.
- Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcattili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45 (1): 24–9. PubMed PMID: 28472356.
- Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8 (12): 1–12.

- e1002829: 1–10. PubMed PMID: 23300419.
16. Hahn G, Lee S, Weiss S. and Lange C. Unsupervised cluster analysis of SARS-CoV-2 genomes reflects its geographic progression and identifies distinct genetic subgroups of SARS-CoV-2 virus. *bioRxiv*. Preprint. 2020 Jun 30. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.05.079061v2>
 17. Zhao P, Cao J, Zhao L-J, Qin Z-L, Ke J-S, Pan W, Ren H, et al. Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine. *Virology*. 2005; 331 (1): 128–5. PubMed PMID: 15582659.
 18. Koyama T, Weeraratne D, Snowden J, and Parida L. Emergence of drift variants that may affect COVID-19 vaccine development and antibody treatment. *Pathogens*. 2020; 9 (5): 324. PubMed PMID: 32357545.
- ## References
1. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579 (7798): 270–3. PubMed PMID: 32015507.
 2. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (6): 669–7. PubMed PMID: 32240634.
 3. Spychalski P, Błażyńska-Spychalska A, Kobiela J. Estimating case fatality rates of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (7): 774–5. PubMed PMID: 32243815.
 4. Khafaie MA, Rahim F. Cross-country comparison of case fatality rates of Covid-19/SARS-CoV-2. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2020; 11 (2): 74–80. PubMed PMID: 32257772.
 5. Phan T. Novel coronavirus: from discovery to clinical diagnostics. *Infect Genet Evol*. 2020; 79: 104211. PubMed PMID: 32007627.
 6. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci*. 2020; 117 (17): 9241–3. PubMed PMID: 32269081.
 7. Boopathi S, Poma A, Kolandaivel P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *J Biomol Struct Dyn*. 2020: 1–10. PubMed PMID: 32306836.
 8. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med*. 2020; 18: 179. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>.
 9. Benvenuto D, Angeletti S, Giovanetti M, Bianchi M, Pascarella S, Cauda R, et al. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. *J Infect*. 2020; 81 (1): 24–7. PubMed PMID: 32283146.
 10. Stefanelli P, Faggioni G, Lo Presti A, Fiore S, Marchi A, Benedetti E, et al. Whole genome and phylogenetic analysis of two SARSCoV-2 strains isolated in Italy in January and February 2020: additional clues on multiple introductions and further circulation in Europe. *Euro Surveill*. 2020; 25 (13): 1–5. PubMed PMID: 2000305.
 11. Yin C. 2020 Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. *Genomics*. 2020; 112 (5): 3588–6. PubMed PMID: 32353474.
 12. Hadfield J, Megill K, Bell SM. Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018; 34 (23): 4121–3. PubMed PMID: 29790939.
 13. Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, Scheuermann RH, Peters B, Sette A. A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (4): 671–80. PubMed PMID: 32183941.
 14. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45 (1): 24–9. PubMed PMID: 28472356.
 15. Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8 (12): e1002829: 1–10. PubMed PMID: 23300419.
 16. Hahn G, Lee S, Weiss S. and Lange C. Unsupervised cluster analysis of SARS-CoV-2 genomes reflects its geographic progression and identifies distinct genetic subgroups of SARS-CoV-2 virus. *bioRxiv*. Preprint. 2020 Jun 30. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.05.079061v2>
 17. Zhao P, Cao J, Zhao L-J, Qin Z-L, Ke J-S, Pan W, Ren H, et al. Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine. *Virology*. 2005; 331 (1): 128–5. PubMed PMID: 15582659.
 18. Koyama T, Weeraratne D, Snowden J, and Parida L. Emergence of drift variants that may affect COVID-19 vaccine development and antibody treatment. *Pathogens*. 2020; 9 (5): 324. PubMed PMID: 32357545.

ПРОГНОЗНЫЙ МОНИТОРИНГ ВТОРЫХ ВОЛН ЭПИДЕМИИ COVID-19 В ИРАНЕ, РОССИИ И ДРУГИХ СТРАНАХ

Д. А. Ковригин¹, С. П. Никитенкова² ✉

¹ Нижегородский государственный технический университет имени Р. Е. Алексеева, Нижний Новгород, Россия

² Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

В последней декаде апреля 2020 г. в Иране поднялась вторая волна новой эпидемии коронавирусной инфекции. Новая волна возникла в окрестности пороговой точки, отмеченной примерно 44 000 случаев заражения, где скорость нарастания первой волны эпидемии, появившейся в Иране в середине февраля 2020 г., была максимальной. Вторая волна почти вдвое превысила пик первой, и, в свою очередь, в начале июня, преодолев новый порог, составляющий около 70 000 случаев заражения, породила третью волну, развивающуюся динамично и непредсказуемо. Целью работы было провести для выявления вторых волн обработку официальных статистических данных на основе простейшей динамической системы, представленной дискретным логистическим уравнением. Изучение этой математической модели показало, что вторые волны эпидемии уже можно наблюдать в Швеции, США, Украине, Сербии, Румынии, Чехии, Эквадоре, Португалии, Люксембурге, а также в России и других странах. Несмотря на индивидуальные различия в динамике распространения эпидемии в отдельных странах, закономерность подъема вторых волн остается той же: начало новой волны, если ориентироваться по количеству общих случаев заражения, практически совпадает со временем достижения максимальной скорости роста предыдущей эпидемии. Это означает, что в период перехода через критический порог текущей волны необходима наибольшая ответственность с точки зрения неукоснительного соблюдения правил самоизоляции и иных санитарных норм.

Ключевые слова: COVID-19, пандемия, мониторинг, прогнозирование, вторая волна, логистическая модель

Вклад авторов: Д. А. Ковригин — планирование исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка черновика и финального варианта статьи; С. П. Никитенкова — планирование исследования, интерпретация данных, подготовка черновика и финального варианта статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Павловна Никитенкова
пр. Гагарина, д. 23, г. Нижний Новгород, 603950; snikitenkova@gmail.com

Статья получена: 13.07.2020 **Статья принята к печати:** 02.08.2020 **Опубликована онлайн:** 13.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.046

PREDICTIVE MONITORING OF SECONDARY EPIDEMIC WAVES OF COVID-19 IN IRAN, RUSSIA AND OTHER COUNTRIES

Kovriguine DA¹, Nikitenkova SP² ✉

¹ Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alekseev, Nizhny Novgorod, Russia

² National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

In the last decade of April 2020, the second coronavirus epidemic wave in Iran has bloomed. The new wave has started in the vicinity of the critical point, marked by approximately 44,000 infections, where the rate of increase of the primary epidemic that appeared in Iran in mid-February 2020 was the highest. Today, this secondary wave almost has doubled the peak of the primary, and, passing the epidemic threshold of about 70,000 total cases in early June, generated the new third epidemic wave developing unpredictably and dynamically. The purpose of this work was to call into use a simple dynamical system represented by the discrete logistic equation with unknown parameters to predict secondary waves using the official statistical data. The mathematical modelling reveals the secondary epidemic waves in Sweden, the United States, Ukraine, Serbia, Romania, Czech Republic, Portugal, Luxembourg, Poland, and Ecuador. Also, the second waves appear in Russia and other countries. Despite many individual differences in the epidemic spread in different countries, we have traced regularity in the rise of secondary waves. The beginning of each new wave, if focusing on the number of total cases, practically coincides with the time of the maximum growth rate of the previous early epidemic. Thus, the passing through the threshold of the current wave should be the most responsible for strict observance of the rules of self-isolation and other sanitary standards.

Keywords: COVID-19, pandemic, monitoring, forecasting, second wave, logistic equation

Author contribution: Kovriguine DA — research planning, literature analysis, data analysis and interpretation, manuscript preparation; Nikitenkova SP — research planning, literature analysis, data analysis and interpretation, manuscript preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana P. Nikitenkova
Gagarina, 23, Nizhny Novgorod; 603950; snikitenkova@gmail.com

Received: 13.07.2020 **Accepted:** 02.08.2020 **Published online:** 13.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.046

Эпидемия в Иране привлекала внимание обозревателей и исследователей относительно высоким уровнем общих случаев заражения [1–5]. Обработка официальных статистических данных с целью прогнозирования вторых волн на основе логистической модели показала, что первая волна представляла собой лишь предвестник распространения новой, более высокой волны эпидемии, уже прокатившейся по этой стране и породившей в начале июня третью волну. (Под волной эпидемии здесь следует понимать процесс переноса и распространения инфекции на новую территорию с новым населением либо ее возврат на старую территорию, частично или полностью восстановившуюся после первой эпидемии.)

Недавно вторые волны эпидемии стали отчетливо наблюдать в Швеции, США, Украине, Сербии, Румынии, Чехии, Эквадоре и некоторых других странах. Строгих математических моделей для описания, в частности, критических точек, в которых появляются вторые волны эпидемии, пока нет. (Под строгой теорией здесь следует понимать аксиоматику на основе принципа максимума. Всякая эпидемия естественным образом «стремится» занять всю территорию и охватить все население, которые ей «предоставлены».)

На сегодняшний день в средствах массовой информации все чаще появляются сообщения об ожидании второй волны эпидемии в России. Однако острый вопрос

о том, быть или не быть второй волне эпидемии в России, без строгого анализа входных данных остается открытым.

Целью работы было математически описать вторые волны эпидемии с помощью простейшей динамической системы, параметры которой вычисляли с использованием таблиц с официальными данными (источник данных: <https://covid.ourworldindata.org/>), а также выявить условия, наиболее благоприятные для возникновения вторых волн.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для построения логистической кривой выстраивали табличные автокорреляционные зависимости $N_{i+1} = f_c(N_i)$, где N_i — количество зарегистрированных случаев за один день i в стране с номером s . С помощью метода наименьших квадратов определяли полиномиальные аппроксимации табличных функций f_c , которые обозначали как F_c . Численные эксперименты подтверждают достаточность квадратичной аппроксимации функций f_s от аргумента N_i .

Это означает, что динамическая модель принимает вид точечного аналитического отображения с правой частью $F_c(N_i) = a_0 + a_1 N_i + a_2 N_i^2$. Здесь a_j — параметры, определяемые из таблиц (источник данных: <https://covid.ourworldindata.org/>). Время перехода из состояния N_i в состояние N_{i+1} составляет один день. Данные обрабатываются с помощью несложных критериев отбора с использованием стандартного программного обеспечения Maple (Maplesoft; Canada).

Временную эволюцию каждой отдельной волны эпидемии в странах, обладающих качественной статистикой, адекватно описывают решения логистического уравнения, когда фазовая точка динамической системы переходит из нулевой неустойчивой стационарной точки $N = 0$ в устойчивое состояние равновесия $N = N^*$, где N^* — положительный корень квадратного уравнения $N^* = a_0 + a_1 N^* + a_2 N^{*2}$. Устойчивому состоянию соответствует почти нулевой прирост заболеваний [6]. На момент достижения устойчивого равновесия логистическое уравнение уже не является достаточным для описания эволюции заболевания в развитом человеческом обществе. Дальнейшая судьба инфицированных людей зависит от качества карантинных мер, медицинской помощи и т. д. Нет сомнения в том, что теоретически эпидемия может развиваться во второй и третий раз и т. д. непредсказуемым образом, если пренебречь надлежащими противоэпидемическими мерами.

Нетрудно догадаться, что параметр a_0 теоретически должен быть нулевым, хотя на практике он отличен от нуля. Поэтому, можно интерпретировать относительный показатель a_0/N^* как качество статистических данных, которое тем выше, чем больше N^* . Положительный

параметр a_1 , всегда несколько больший единицы, определяет максимальную скорость распространения эпидемии. Чем выше культура социальной гигиены в обществе, тем ближе этот параметр к единице. Критический параметр, определяющий стабильное устойчивое состояние N^* , — это отрицательное число a_2 . Отметим, что математическая биофизика связывает этот параметр с концепцией внутривидовой конкуренции, но в нашем случае попытка проинтерпретировать его ни к чему существенному не приведет. Остается предположить, что этот параметр является показателем медицинских мероприятий и других эффективных действий по преодолению эпидемии.

Согласно расчетам, вторая волна эпидемии, как правило, поднимается после прохождения пороговой точки, представляющей собой точку перегиба логистической кривой [7–9]. Указанное пороговое значение N можно вычислить из линейного уравнения $a_1 + 2a_2 N = 1$. В случае возникновения второй волны эпидемии для расчетов можно использовать ту же динамическую систему. Однако ее новые параметры a_j рассчитывали по новым входным данным с помощью простого алгоритма. Из старых входных данных вычитали расчетные данные, предоставляемые логистической кривой первой волны. Вычислительный процесс можно продолжать до тех пор, пока входные данные не будут представлены суперпозицией различных отдельных логистических кривых. В случае невозможности указанной декомпозиции входных данных полагается, что описанный выше алгоритм не работает и такие входные данные опускают. Идея такого алгоритма впервые появилась в эконометрике [10]. Имеются примеры успешного его применения в математической биофизике [11]. В контексте нынешней пандемии существенный интерес представляет работа [12], в которой авторы с учетом влияния второй волны осуществили корректировку результатов своей предыдущей статьи [13], встретив прежде ощутимые проблемы с прогнозированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рассмотрим конкретный пример истории эпидемии в одной из стран, не избежавших возникновения второй волны. Пусть это будет наиболее ярко проявившая себя в данном отношении страна — Иран (рис. 1).

Примерно в середине апреля в Иране поднялась вторая волна эпидемии. Процесс ее распространения еще весьма далек от завершения, поскольку с начала июня происходит отчетливый рост третьей волны. Отметим, что еще две-три недели назад вышеизложенный

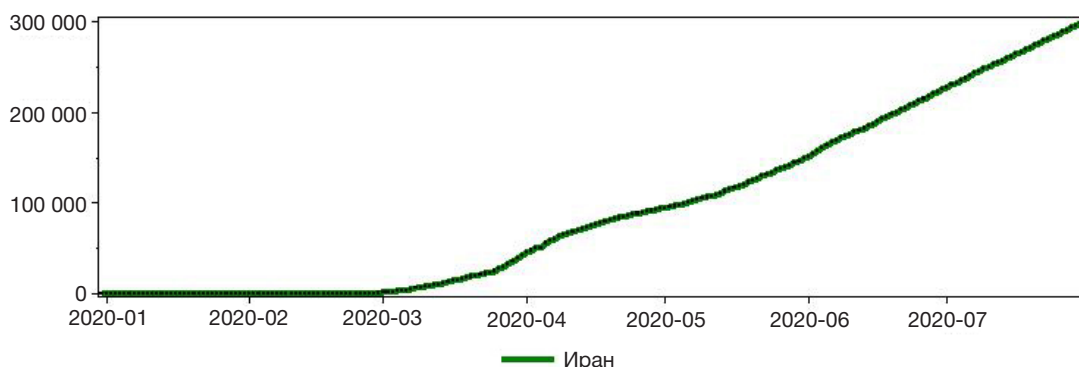


Рис. 1. История эпидемии в Иране. Сплошной линией показано общее число официально зарегистрированных случаев заражения по дням, начиная с начала эпидемии в этой стране

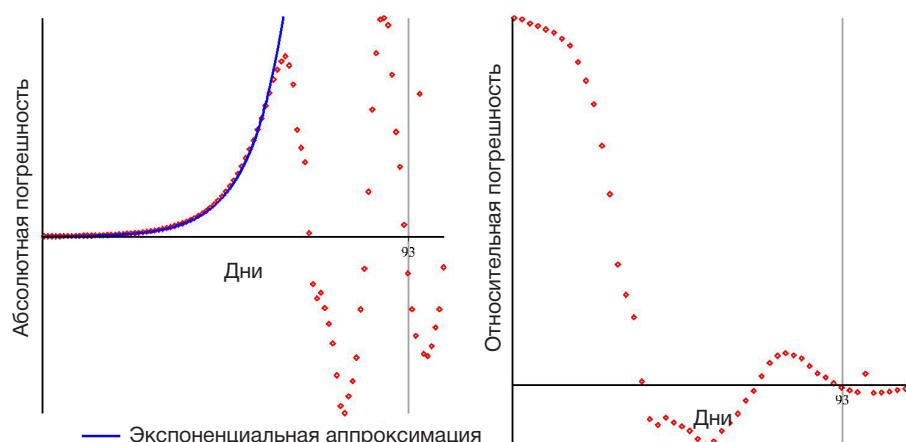


Рис. 2. Абсолютная и относительная ошибки прогнозирования первой волны

алгоритм декомпозиции вторых волн не распознавал третью волну, интерпретируя данные как статистические погрешности.

Попробуем теперь явно выявить первую волну эпидемии в Иране, оценивая абсолютную и относительную погрешности между входными и прогнозными данными, которые описывает логистическая кривая. Квадратичное отклонение абсолютной погрешности минимально, если порог первой волны достигается на 93-й день с начала эпидемии (рис. 2). (Обратите внимание, что при поиске минимума реализуется динамический априорный анализ данных, который не обязан охватывать всю историю эпидемии.)

На рис. 2 слева сплошной линией представлена экспоненциальная аппроксимация расхождения между фактическими и прогнозными данными, демонстрирующая, что абсолютная ошибка велика в течение всей истории эпидемии. Относительная же ошибка становится приемлемой, когда абсолютная ошибка минует свое максимальное значение. Установлено, что выходные данные мониторинга, от начала эпидемии и почти до точки указанного максимума, удовлетворительно описывает экспоненциальная зависимость. Этот факт нельзя назвать откровением: продемонстрированное на графиках поведение реальных данных во времени не является специфичным признаком истории эпидемии только лишь Ирана. Авторы многих работ по проблематике пандемии заметили такую закономерность для множества других территорий, но обычно связывают ее с эффективными противоэпидемическими мероприятиями на ранних стадиях эпидемии. Однако проще полагать, что эта неизбежная регулярная ошибка обусловлена только лишь спецификой мониторинга данных. Оказалось, что аналитическую аппроксимацию входного набора данных можно продолжить и далее, начиная с точки максимума абсолютной ошибки и заканчивая точкой перегиба логистической кривой с помощью степенной функции [14, 15].

На основании вышеописанной информации авторы предприняли специальное исследование на тему регулярной составляющей ошибки мониторинга официально зарегистрированных случаев распространения нынешней пандемии, анализируя историю эпидемии в основном стран Западной Европы, достигших ее пика [16]. Условие достижения пика эпидемии было необходимо для использования апостериорного анализа данных, который приводит к тем же результатам, что реализуются и при динамическом априорном анализе. Регулярную

составляющую ошибки мониторинга удалось выявить аналитически. Эта ошибка объяснила причину неудач априорного математического прогнозирования вероятных событий эпидемии в различных странах мира, которое было предпринято в многочисленных исследованиях. Обработка статистических данных практически всех стран, достигших эпидемического пика, показала, что указанная регулярная ошибка мониторинга подчинена несложной закономерности: чем выше пик эпидемии, тем больше временная задержка мониторинговых данных по сравнению с прогнозом.

Вернемся к задаче идентификации первой эпидемии в Иране, следуя методике априорного анализа. Абсолютная ошибка между мониторинговыми и прогнозными данными минимальна, если первую волну эпидемии адекватно описывать дискретным логистическим уравнением $N_{i+1} = 1,118N_i - 1,344 \times 10^{-6}N_i^2$. Решение этого уравнения показано на рис. 3, где отмечена критическая пороговая точка, составляющая 44 217 случаев инфицирования.

Теперь осуществляем декомпозицию входных данных с учетом того, что ранняя история эпидемии адекватно аппроксимируется логистической кривой, представленной на последнем рисунке. На следующем этапе обработки входных данных идентифицируем вторую волну эпидемии. Вычисления проводим рекурсивно тем же способом, что применяли выше. Вторая волна также адекватно может быть описана дискретным логистическим уравнением, но с иной правой частью: $N_{i+1} = 1,056N_i - 3,202 \times 10^{-7}N_i^2$ (рис. 4).

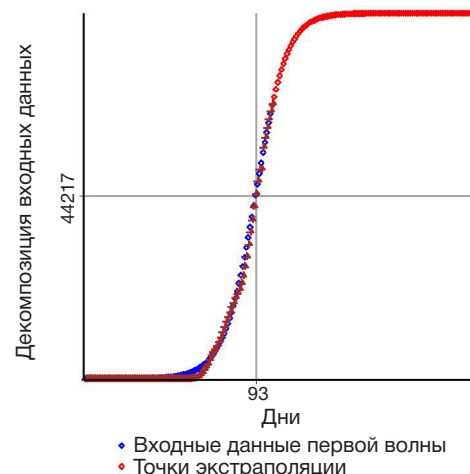


Рис. 3. Профиль первой волны эпидемии в Иране. Сверху показаны точки экстраполяции по достижению пика эпидемии первой волны

Из рис. 4 видно, что оставшаяся часть данных, соответствующая второй и третьей волнам, уже не может быть представлена в виде единственной логистической линии. Это означает, что в Иране характер эпидемии принял форму непрерывного волнового каскада, наиболее неблагоприятного для борьбы с эпидемией. Во всяком случае, Иран уже не сможет избежать третьей волны эпидемии.

Можно повторить изложенные выше рассуждения и вычисления, используя данные по истории эпидемии в других странах, например Швеции. Первая волна эпидемии в этой стране, по сравнению с Ираном, имела сравнительно небольшую высоту с порогом около 15 000 зарегистрированных случаев, достигнутым через 115 дней с начала эпидемии (рис. 5).

Ситуацию, аналогичную обстановке в Швеции, можно наблюдать в Украине (рис. 6). Различие состоит в том, что в этой стране нет никаких признаков приближения к пику второй эпидемии, а напротив, имеется риск возникновения следующей волны.

По сравнению с другими странами вторая эпидемия в США приобретает гигантские масштабы (рис. 7).

На сегодняшний день в средствах массовой информации все чаще появляются сообщения об ожидании второй волны эпидемии в России. Все они, как правило, основаны на спекуляциях и оставляют вопрос о том, быть или не быть второй волне эпидемии в России, открытым.

Средства математики позволяют установить факт: вторая волна эпидемии в России уже поднялась в первой половине мая и полностью сформировалась к настоящему моменту. Высота второй волны достигла примерно половины высоты первой, и, в свою очередь, в конце июня породила третью волну эпидемии. На рис. 8 представлена декомпозиция истории эпидемии в России в виде суперпозиции первой и второй волн.

Несмотря на индивидуальные различия в динамике распространения эпидемии в различных странах, закономерность подъема второй волны остается той же: переход через точку, где скорость нарастания эпидемии текущей волны максимальна, наиболее рискован при несоблюдении правил самоизоляции и иных санитарных норм. Вторые волны эпидемии коварны тем, что они проявляются не сразу, а спустя достаточно длительный промежуток времени. Например, в Иране вторая волна ощутимо проявила себя не менее чем через два месяца.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обычно указывают несколько различных механизмов, каждый из которых может генерировать вторые волны при эпидемии. Первые два механизма обусловлены непосредственной передачей вируса и изменением его поведения, способствующим появлению дополнительных способов распространения инфекции. Третий механизм связан с неоднородностью населения: каждая новая волна либо захватывает иную область, либо вновь прокатывается по прежней территории. Четвертый механизм вызван мутацией вируса, способствующей замедленной восприимчивости к инфекции у людей. Еще один механизм обусловлен ослабевающим иммунитетом. Каждый механизм может быть учтен в сложных математических моделях для прогнозирования вторых волн [17]. По мнению авторов, вторые волны являются не в последнюю очередь следствием нестрогого соблюдения людьми карантина и санитарных правил.

Как показывает опыт многих стран Западной Европы, возможны и досадные случайности, но они маловероятны. Например, в Италии не отказались от строго пограничного контроля, настоятельно порекомендовав гражданам перемещаться только в пределах страны, пусть даже в убыток деловой деятельности, а Чешская республика сняла все ограничения. На сегодняшний день Италия

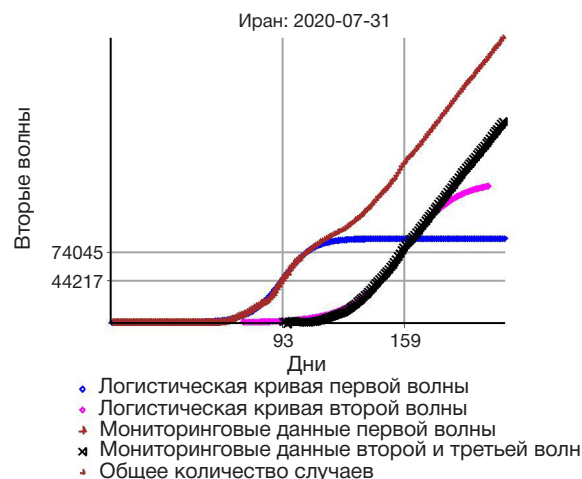


Рис. 4. Декомпозиция истории эпидемии в Иране в виде суперпозиции двух логистических кривых первой и второй волн. Можно проследить начало роста третьей волны

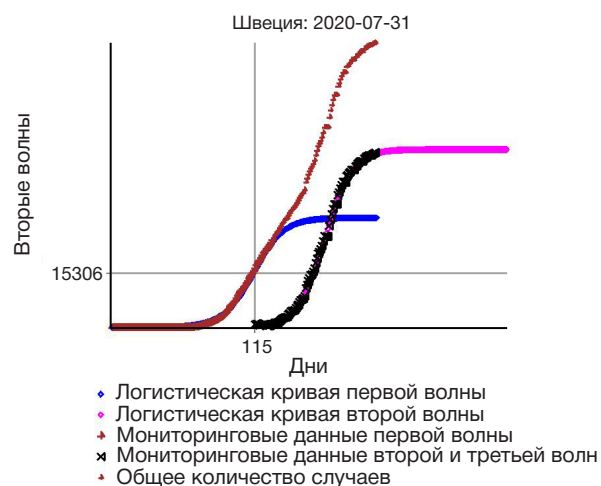


Рис. 5. Декомпозиция полных входных данных по количеству общих случаев в Швеции в виде суперпозиции логистической кривой первой и второй волн

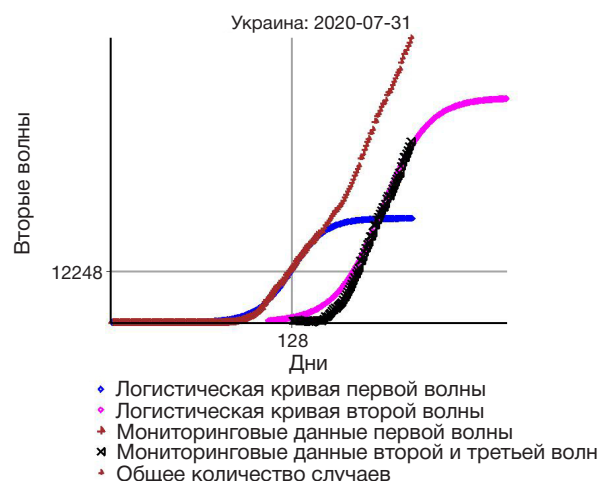


Рис. 6. Декомпозиция полных входных данных по количеству общих случаев в Украине

удовлетворительно справляется с последствиями эпидемии, а в Чехии сформировалась мощная вторая волна. Неизвестно, случайность это или закономерность.

В настоящей работе авторы отказались от многофакторных моделей, которые в идеальной реализации предназначены для изучения влияния, например, пограничного контроля в начале вспышки, прогнозирования сроков самоизоляции, оценки необходимого количества доступных препаратов и др. Дело в том, что практика последних месяцев показала, что наша примитивная двухпараметрическая модель и другие, хорошо апробированные и широко известные математические методы обработки статистических данных, непосредственно применяемые для описания будущих событий распространения пандемии, оказались неэффективными при решении вопиюще важной и неотложной проблемы. Это суждение авторов работы, открытое для аргументированной критики. Между тем не секрет, что агрегированная динамика пандемии весьма проста, — она достаточно полно может быть описана решением известного логистического уравнения, не столь важно какого, дискретного или дифференциального. Делу не помогают ни более развитые версии этой математической модели, основанные на введении новых неизвестных переменных, ни приемы многопараметрической модификации логистического уравнения. В любом случае, моделирование дает удовлетворительный результат лишь на малом горизонте времени, ограниченном одной-двумя неделями [18]. В качестве примера можно привести способ обработки данных статистическим институтом Хопкинса, который резонно ограничивает прогнозные тренды одной неделей. Таким образом, мы имеем дело с прогнозным мониторингом, который при всей своей ценности все же бесполезен для разработки среднесрочных и стратегических планов мероприятий по преодолению пандемии [19].

Другие многообещающие предсказывающие технологии, основанные на теории графов [20], теории перколяции [21] и имитационном моделировании [22], оказались слишком неповоротливыми в прагматическом плане, чтобы выработать четкий и конкретный результат по возникшему актуальному вопросу.

Парадокс состоит в очевидной неэффективности использования известных методик обработки статистических данных для получения адекватного количественного результата, несмотря на то что, казалось бы, все о динамике пандемии качественно спрогнозировано.

Чтобы понять причину неудач прогнозирования, мы обратили свое внимание на статистические данные, которые используют для выработки прогноза, поскольку непосредственно от них этот прогноз зависит. Известно, что по вполне естественным причинам статистические данные необязательно безупречны. Отметим, что, в отличие от экспериментальных данных, с которыми имеют дело, скажем, в физических экспериментах, данные по эпидемической ситуации не могут быть избыточными, они только недостаточны. Сложно представить себе ситуацию, когда в сводке мониторинга о количестве вновь выявленных случаев заражения регулярно появляются избыточные данные. Скорее всего, следует ожидать, что данные будут занижены из-за недостатка информации. Поэтому естественно полагать, что в данных содержится регулярная составляющая ошибки с недостатком. Действительно, исчерпывающие данные по пандемии могут быть получены лишь только апостериорно, но жизнь требует достоверной априорной информации. Нам

удалось обнаружить указанную регулярную составляющую ошибки, которая объясняет причину неудач априорного математического моделирования вероятных событий эпидемии в различных странах мира [16]. Интересно, что за пороговой точкой и вплоть до достижения пика эпидемии прогнозные и реальные данные, как правило, практически совпадают. Объяснить это просто: при переходе через пороговую точку скорость прироста зарегистрированных случаев инфицирования снижается, в то время как к решению задачи мониторинга привлечен максимум усилий персонала.

Осознав сложность задачи прогнозирования, авторы решили ограничиться простейшей логистической моделью, поскольку, с одной стороны, с точки зрения теории колебаний для ее построения требуется минимум информации: начальное количество случаев, заключительное пиковое число, и число дней от начала эпидемии до ее пика. С другой стороны, надежность модели определяют не количеством неизвестных параметров, которые следует найти из статистического анализа входных данных, а качеством этих данных. Косвенно достоверность модели подтверждается консервативностью параметров логистических кривых первых волн, в то время как параметры текущей волны медленно изменяются во времени из-за указанного естественного несовершенства входных данных.

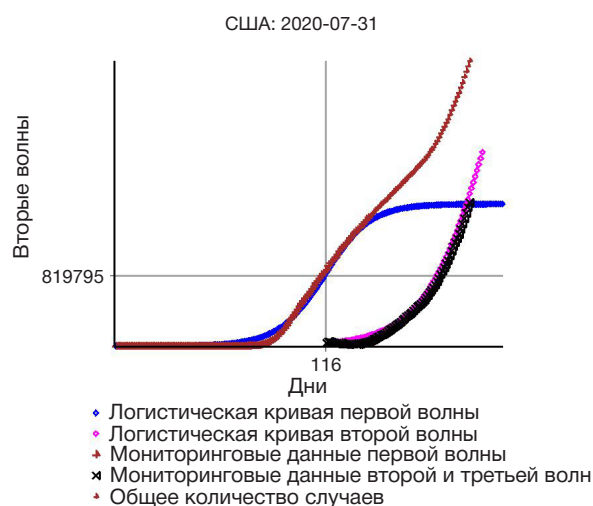


Рис. 7. Вторая волна эпидемии в США

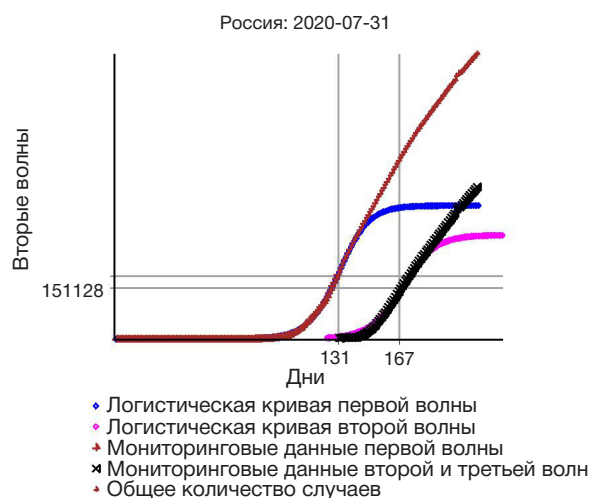


Рис. 8. Сумма двух логистических кривых первой и второй эпидемических волн в России

ВЫВОДЫ

В настоящей работе проведено исследование динамики появления и подъема второй волны эпидемии в Иране, Швеции, США, Украине и России. Анализ входных данных по общему числу случаев заражения показывает, что наиболее благоприятное время для возникновения вторых волн определяют критические точки эпидемии, в которых скорость прироста общего числа случаев максимальна. Это означает, что переход через эти точки наиболее ответствен с точки зрения неукоснительного соблюдения правил самоизоляции и иных санитарных норм.

Ценность моделирования определяется тем, что факт возникновения вторых волн можно установить гораздо раньше, прежде чем он станет очевидным на графиках истории эпидемии. Примером служит не совсем очевидная вторая волна в России, поднявшаяся в начале мая и породившая третью волну эпидемии в конце июня.

Россия и Иран пока еще могут избежать четвертой волны эпидемии, если тому будут выставлены надежные барьеры.

Алгоритм исследования вторых волн представляет собой процедуру рекурсивной декомпозиции входных данных по набору различных логистических кривых, параметры которых неизвестны заранее и определяются в процессе вычисления. На первом шаге можно осуществить проверку возможности адекватной аппроксимации входных данных единственной логистической кривой. Если это не удастся, можно осуществить попытку выделить вторую логистическую волну и т. д. Декомпозиция по логистическим линиям во многом схожа с широко известным методом Фурье или вейвлет-анализом. Однако в нашем случае алгоритм декомпозиции не завершается результатом, если входные данные для этого непригодны, а именно не представляют собой монотонно возрастающую табличную функцию.

Литература

1. Moftakhar L, Mozghan SEIF, Safe MS. Exponentially Increasing Trend of Infected Patients with COVID-19 in Iran: A Comparison of Neural Network and ARIMA Forecasting Models. *Iranian Journal of Public Health*. 2020; 49: 92–100.
2. Tran TT, Pham LT, Ngo QX. Forecasting epidemic spread of SARS-CoV-2 using ARIMA model (Case study: Iran). *Global Journal of Environmental Science and Management*. 2020; 6 (Special Issue (Covid-19)): 1–10.
3. Zareie B, Roshani A, Mansournia MA, Rasouli MA, Moradi G. A model for COVID-19 prediction in Iran based on China parameters. 2020; medRxiv.
4. Ahmadi A, Fadaei Y, Shirani M, Rahmani F. Modeling and forecasting trend of COVID-19 epidemic in Iran until May 13, 2020. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI)*. 2020; 34 (1): 183–95.
5. Li L, Yang Z, Dang Z, Meng C, Huang J, Meng H, Wang D, Chen G, Zhang J, Peng H, Shao Y. Propagation analysis and prediction of the COVID-19. *Infectious Disease Modelling*. 2020; 5: 282–92.
6. Неймарк Ю. И. Математические модели в естествознании и технике. Н. Новгород: Изд-во Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского, 2004; 401 с.
7. Код Maple-18. Доступно по ссылке: <https://kovriguineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Iran.mw>.
8. Код Maple-18. Доступно по ссылке: <https://kovriguineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Russia.mw>.
9. Код Maple-18. Доступно по ссылке: <https://kovriguineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Ukraine.mw>.
10. Meyer P. Bi-logistic growth. *Technological forecasting and social change*. 1994; 47 (1): 89–102.
11. Lavrova AI, Postnikov EB, Manicheva OA, Vishnevsky BI. Bi-logistic model for disease dynamics caused by *Mycobacterium tuberculosis* in Russia. *Royal Society open science*. 2017; 4 (9): 171033.
12. Dattoli G, et al. On the evolution of covid-19 in Italy: a follow up note. Available from: [arXiv preprint arXiv:2003.08684v1](https://arxiv.org/abs/2003.08684v1). 2020; 12667.
13. Dattoli G, Di Palma E, Licciardi S, Sabia E. A Note on the Evolution of Covid-19 in Italy, [arXiv:2003.08684v1 \[q-bio.PE\]](https://arxiv.org/abs/2003.08684v1), 19 Mar 2020.
14. Bhattacharya S, Islam MM, De A. Search for the trend of COVID-19 infection following Farr's law, IDEA model and power law. *medRxiv*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20090233>.
15. Singer HM. The COVID-19 pandemic: growth patterns, power law scaling, and saturation. *medRxiv*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.07.12.20152140>.
16. Nikitenkova SP, Kovriguine DA. It's the very time to learn a pandemic lesson: why have predictive techniques been ineffective when describing long-term events? *medRxiv*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.06.01.20118869>.
17. Mummert A, et al. A perspective on multiple waves of influenza pandemics. *PloS one*. 2013; 8 (4): e60343.
18. Лакман И. А., Агапитов А. А., Садикова Л. Ф., Черненко О. В., Новиков С. В., Попов Д. В. и др. Возможности математического прогнозирования коронавирусной инфекции в Российской Федерации. *Артериальная гипертензия*. 2020; 26 (3): 288–94. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2020-26-3-288-294>.
19. Holmdahl I, Buckee C. Wrong but useful — what covid-19 epidemiologic models can and cannot tell us. *N Engl J Med*. 2020 May 15. DOI: 10.1056/NEJMp2016822.
20. Иванников Ю. Г., Огарков П. И. Опыт математического компьютерного прогнозирования эпидемий гриппа для больших территорий. *Журнал инфектологии*. 2012; 4 (3): 101–06. Available from: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2012-4-3-101-106>.
21. Luo Y, Schaposnik LP. Minimal percolating sets for mutating infectious diseases. *Physical Review Research*. 2020; 2 (2): 023001.
22. de Arruda GF, Petri G, Moreno Y. Social contagion models on hypergraphs. *Physical Review Research*. 2020; 2 (2): 023032.

References

1. Moftakhar L, Mozghan SEIF, Safe MS. Exponentially Increasing Trend of Infected Patients with COVID-19 in Iran: A Comparison of Neural Network and ARIMA Forecasting Models. *Iranian Journal of Public Health*. 2020; 49: 92–100.
2. Tran TT, Pham LT, Ngo QX. Forecasting epidemic spread of SARS-CoV-2 using ARIMA model (Case study: Iran). *Global Journal of Environmental Science and Management*. 2020; 6 (Special Issue (Covid-19)): 1–10.
3. Zareie B, Roshani A, Mansournia MA, Rasouli MA, Moradi G. A model for COVID-19 prediction in Iran based on China parameters. 2020; medRxiv.
4. Ahmadi A, Fadaei Y, Shirani M, Rahmani F. Modeling and forecasting trend of COVID-19 epidemic in Iran until May 13, 2020. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI)*. 2020; 34 (1): 183–95.
5. Li L, Yang Z, Dang Z, Meng C, Huang J, Meng H, Wang D, Chen G, Zhang J, Peng H, Shao Y. Propagation analysis and prediction of the COVID-19. *Infectious Disease Modelling*. 2020; 5: 282–92.
6. Neymark Yul. Matematicheskie modeli v estestvoznanii i tehnike.

- N. Novgorod: Izd-vo Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo. 2004; 401 s. Russian.
7. Source code Maple-18. Available from: <https://kovrigineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Iran.mw>.
 8. Source code Maple-18. Available from: <https://kovrigineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Russia.mw>.
 9. Source code Maple-18. Available from: <https://kovrigineda.ucoz.ru/COVID-19/COVID-19-Ukraine.mw>.
 10. Meyer P. Bi-logistic growth. Technological forecasting and social change. 1994; 47 (1): 89–102.
 11. Lavrova AI, Postnikov EB, Manicheva OA, Vishnevsky BI. Bi-logistic model for disease dynamics caused by Mycobacterium tuberculosis in Russia. Royal Society open science. 2017; 4 (9): 171033.
 12. Dattoli G, et al. On the evolution of covid-19 in Italy: a follow up note. Available from: [arXiv preprint arXiv:2003.12667](https://arxiv.org/abs/2003.12667).
 13. Dattoli G, Di Palma E, Licciardi S, Sabia E. A Note on the Evolution of Covid-19 in Italy, [arXiv:2003.08684v1 \[q-bio.PE\]](https://arxiv.org/abs/2003.08684v1), 19 Mar 2020.
 14. Bhattacharya S, Islam MM, De A. Search for the trend of COVID-19 infection following Farr's law, IDEA model and power law. medRxiv. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20090233>.
 15. Singer HM. The COVID-19 pandemic: growth patterns, power law scaling, and saturation. medRxiv. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.07.12.20152140>.
 16. Nikitenkova SP, Kovriguine DA. It's the very time to learn a pandemic lesson: why have predictive techniques been ineffective when describing long-term events? medRxiv. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.06.01.20118869>.
 17. Mummert A, et al. A perspective on multiple waves of influenza pandemics. PloS one. 2013; 8 (4): e60343.
 18. Lakman IA, Agapitov AA, Sadikova LF, Chernenko OV, Novikov SV, Popov DV, i dr. Vozmozhnosti matematicheskogo prognozirovaniya koronavirusnoj infekcii v Rossijskoj Federacii. Arterial'naja gipertenzija. 2020; 26 (3): 288–94. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2020-26-3-288-294>. Russian.
 19. Holmdahl I, Buckee C. Wrong but useful — what covid-19 epidemiologic models can and cannot tell us. N Engl J Med. 2020 May 15. DOI: 10.1056/NEJMp2016822.
 20. Ivannikov YuG, Ogarkov PI. Opyt matematicheskogo komp'yuternogo prognozirovaniya jepidemij grippa dlja bol'shih territorij. Zhurnal infektologii. 2012; 4 (3): 101–06. Available from: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2012-4-3-101-106>. Russian.
 21. Luo Y, Schaposnik LP. Minimal percolating sets for mutating infectious diseases. Physical Review Research. 2020; 2 (2): 023001.
 22. de Arruda GF, Petri G, Moreno Y. Social contagion models on hypergraphs. Physical Review Research. 2020; 2 (2): 023032.

РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ С ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОСКЕЛЕТА КИСТИ, УПРАВЛЯЕМОГО ИНТЕРФЕЙСОМ «МОЗГ–КОМПЬЮТЕР»

П. Д. Бобров^{1,2}✉, Е. В. Бирюкова^{1,2}, Б. А. Поляев¹, О. А. Лайшева^{1,3}, Е. Л. Усачёва³, А. В. Соколова³, Д. И. Михайлова³, К. Н. Дементьева³, И. Р. Федотова²

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

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия

³ Детская клиническая больница Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Детский церебральный паралич — одно из тяжелых заболеваний центральной нервной системы у детей, сопровождающееся двигательными нарушениями. Целью работы было определить эффективность применения комплекса, объединяющего интерфейс «мозг–компьютер» (ИМК) и экзоскелет кисти, в качестве средства восстановления двигательной функции у пациентов с ДЦП в дополнении к основной терапии. У 14 детей и подростков по шкалам ARAT, Fugl-Meyer, Jebsen–Taylor оценивали изменение двигательной функции в результате терапии, дополненной 7–10 процедурами с комплексом ИМК–экзоскелет, а также исследовали свойства источников μ -ритма ЭЭГ при воображении движений во время управления ИМК. После процедур были выявлены достоверно положительный прирост баллов по шкалам Fugl-Meyer (7 (2; 11) — для активных движений руки; 4,5 (1; 6) — для проксимальных отделов и 2,5 (0; 5) — для кисти), ARAT (7,5 (1; 31) — для общей суммы баллов, 1,5 (0; 12) — для шарового и 1,5 (0; 8) — для цилиндрического захвата) и достоверно отличное от нуля снижение времени выполнения трех из семи задач теста Jebsen–Taylor (–1 (–4,13; 0,25) — для имитации кормления; –1 (–2; 0) — для перестановки легких и тяжелых банок). Средняя вероятность правильного распознавания ИМК составила 0,51 (0,45; 0,54) (max = 0,70). В большинстве записей ЭЭГ были выделены источники μ -ритма, как в сохранном, так и в пораженном полушарии. Показано наличие десинхронизации μ -ритма при воображении движений, от степени которой достоверно зависит точность работы ИМК. Результаты показывают, что применение комплекса ИМК–экзоскелет эффективно дополняет стандартную реабилитацию детей с ДЦП, а также дают основания предполагать, что ее клиническая эффективность в случае ДЦП может быть доказана с привлечением большего числа пациентов.

Ключевые слова: ДЦП, реабилитация, интерфейс «мозг–компьютер», экзоскелет кисти, электроэнцефалограмма

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60519X0184).

Вклад авторов: П. Д. Бобров — обработка и анализ ЭЭГ, оценка точности работы ИМК, написание статьи; Е. В. Бирюкова — статистическая обработка клинических шкал, написание статьи; Б. А. Поляев, О. А. Лайшева, Е. Л. Усачева — дизайн клинического исследования; Е. Л. Усачева — организация клинического исследования; О. А. Лайшева, А. В. Соколова, Д. И. Михайлова, К. Н. Дементьева — разработка методики работы с детьми, сбор клинических данных; Д. И. Михайлова, К. Н. Дементьева — нейропсихологическое обследование, тренинг; И. Р. Федотова — анализ литературы. Все авторы принимали участие в интерпретации результатов и обсуждении текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом (протокол № 184 от 15 апреля 2019 г.), проведено согласно протоколу клинической апробации 2019-63-6, утвержденному экспертным советом Минздрава России. Родители всех пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании, дети старше 14 лет подписывали информированное согласие дополнительно к подписи родителей.

✉ Для корреспонденции: Павел Дмитриевич Бобров
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; p-bobrov@yandex.ru

Статья получена: 31.07.2020 **Статья принята к печати:** 13.08.2020 **Опубликована онлайн:** 20.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.047

REHABILITATION OF PATIENTS WITH CEREBRAL PALSY USING HAND EXOSKELETON CONTROLLED BY BRAIN-COMPUTER INTERFACE

Bobrov PD^{1,2}✉, Biryukova EV^{1,2}, Polyayev BA¹, Lajsheva OA^{1,3}, Usachjova EL³, Sokolova AV³, Mihailova DI³, Dement'eva KN³, Fedotova IR²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

³ Russian Children's Clinical Hospital of Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Cerebral palsy (CP) is one of the most severe central nervous system diseases in childhood associated with motor impairment. The study was aimed to assess the efficiency of the complex comprising brain-computer interface (BCI) and hand exoskeleton as an instrument for the motor function recovery in patients with CP complementing the essential therapy. The Fugl-Meyer Assessment scale, ARAT test and Jebsen–Taylor function test were used in 14 children and adolescents for the motor function improvement assessment after the therapy complemented by 7–10 BCI-exoskeleton based procedures. The EEG μ -rhythm sources properties during the motor imagery BCI control were studied. After the procedures completion, the significant improvement of the Fugl-Meyer Assessment scale score (7 (2; 11) for hand active movements; 4.5 (1; 6) for proximal arm and 2.5 (0; 5) for hand), ARAT test score (7.5 (1; 31) for total score, 1.5 (0; 12) for grasp movement and 1.5 (0; 8) for grip movement), as well as significantly different from the zero execution time reduction in three out of seven Jebsen–Taylor function test items (–1 (–4.13; 0.25) for simulated feeding; –1 (–2; 0) for moving light and heavy cans) were identified. The average BCI detection level was 0.51 (0.45; 0.54) (max = 0.70). In most EEG recordings the μ -rhythm sources were detected, both for intact and affected hemispheres. The μ -rhythm desynchronization associated with motor imagery was observed, significantly affecting the BCI accuracy. The results obtained indicate that the use of BCI-exoskeleton complex effectively complements the standard rehabilitation methods for children with CP, and suggest that its clinical effectiveness in individuals with CP may be proven by enrollment of more patients.

Keywords: cerebral palsy, rehabilitation, brain-computer interface, hand exoskeleton, EEG

Funding: the study received public financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project ID RFMEFI60519X0184).

Author contribution: Bobrov PD — EEG processing and analysis, BCI accuracy estimation, manuscript writing; Biryukova EV — assessment scales scores statistical processing, manuscript writing; Polyayev BA, Lajsheva OA, Usachjova EL — clinical trial design; Usachjova EL — clinical trial management; Lajsheva OA, Sokolova AV, Mihailova DI, Dement'eva KN — development of methods for working with children, clinical data acquisition; Mihailova DI, Dement'eva KN — neuropsychological testing, training; Fedotova IR — literature analysis. All authors contributed to interpretation of the results and discussion.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 184 dated April 15, 2019). The informed consent was submitted by all patients' parents, adolescents aged over 14 submitted the additional informed consent.

✉ Correspondence should be addressed: Pavel D. Bobrov
Ostrovitjanova, 1, Moscow, 117997; p-bobrov@yandex.ru

Received: 31.07.2020 **Accepted:** 13.08.2020 **Published online:** 20.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.047

Детский церебральный паралич (ДЦП) — одно из самых тяжелых заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) у детей, характеризующееся органическим поражением мозга. Распространенность ДЦП в развитых странах составляет 2–3 случая на 1000 рожденных младенцев [1]. ДЦП не только является наиболее распространенной патологией ЦНС у детей, но и занимает одно из ведущих мест среди заболеваний, ведущих к инвалидности с детства.

ДЦП сопровождают двигательные нарушения, которые возникают в разной степени при всех распространенных формах этого заболевания: спастическая диплегия — 69,3%, гемипаретическая форма — 16,3%, атоническо-астатическая форма — 9,2%, гиперкинетическая форма — 3,3%, двойная гемиплегия — 1,9% [2]. Среди методов традиционной физической реабилитации — массаж, лечебная гимнастика, аппаратная кинезиотерапия, а также физиотерапевтические и электрофизиологические процедуры, способствующие снижению спастичности. Однако снижение спастичности — только первый шаг к повышению функциональной активности пациентов. Существует насущная необходимость в применении целенаправленных функциональных методов дальнейшего восстановительного лечения. Перспективными считают те, которые основаны на стимуляции нейропластичности мозговых структур, в частности методы, использующие кинестетическое воображение движений [3]. В их основе лежит идея подкрепления успешных попыток вообразить движение при помощи зрительной и проприоцептивной обратной связи, осуществляемой экзоскелетом, управляемым через интерфейс мозг-компьютер (ИМК). ИМК классифицирует регистрируемую электроэнцефалограмму и в случае, если распознается требуемое воображение движения, включится экзоскелет, который выполняет это движение и обеспечивает проприоцептивно обратную связь. Классификация ЭЭГ возможна за счет наличия паттернов, специфичных для воображения движений, в частности, как было установлено у здоровых испытуемых, десинхронизации μ -ритма в первичных сенсомоторных областях во время представления движения конечности [4]. Метод реабилитации, использующий экзоскелет кисти, управляемый ИМК, относят к числу эффективных методов восстановления двигательной функции (ДФ), зарекомендовавших себя при реабилитации постинсультных больных [5, 6]. Этот метод позволяет реализовать принципы современной нейрореабилитации: активное участие пациента, интенсивность и регулярность тренировок, биологическую обратную связь. Он также опробован в клинической практике рандомизированных исследований восстановления ДФ после инсульта [7–10].

Есть основания надеяться, что реабилитация с помощью комплекса ИМК-экзоскелет будет эффективной и для детей с ДЦП, так как мозговые нарушения, характерные для этого заболевания, возникают в период наибольшей адаптивности и нейропластичности, когда проекции от пораженных областей ЦНС еще не достигли своих конечных целей. Такие нарушения могут препятствовать процессам нейронного созревания [11]. Высокая адаптивность механизмов нейропластичности, свойственная раннему развитию, в норме играет сугубо положительную роль, способствуя формированию двигательных навыков. Однако в случае мозговых нарушений те же механизмы могут приводить к развитию атипичных компенсаторных двигательных синергий, препятствующих нормальному развитию, что часто имеет место у детей с ДЦП [12]. В основе этого явления лежит неадекватная пластичность, например,

когда пластические изменения нейронной активности при акцентированном использовании интактной конечности ведут к уменьшению активации остатков коркового представительства пораженной конечности [13].

Кинестетическое воображение движения активирует механизмы нейропластичности и тем самым обучает ребенка выполнению сгибания кисти, а также облегчает выполнение, пусть и атипичных, но функционально значимых для него движений. В этом и состоит цель реабилитации с помощью комплекса ИМК-экзоскелет в случае ДЦП.

Согласно исследованиям кинестетического воображения у детей с ДЦП, воображение движения активирует те же области мозга, что и у постинсультных больных [14]. Показано также, что способность к воображению движения у здоровых детей развивается с 5 до 12 лет и способствует совершенствованию движений [15]. У детей с ДЦП эта способность устойчива, хотя и снижена по сравнению с нормой [16]. Кроме того, способность к воображению движения не зависит от латерализации поражения [17].

Таким образом, тренировки кинестетического воображения движения имеют высокий потенциал для использования восстановления ДФ у детей с ДЦП [17, 18]. Целью работы было исследовать эффективность комплекса ИМК-экзоскелет для реабилитации больных с ДЦП. Способность к воображению движения оценивали исходя из точности работы ИМК и степени десинхронизации μ -ритма в первичных сенсомоторных областях в полушарии, контралатеральной руке, движение которой воображается.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Российской детской клинической больницы РНИМУ им. Н. И. Пирогова с мая 2019 по февраль 2020 г. Курсы на воображение движений с использованием комплекса ИМК-экзоскелет кисти проходили 14 пациентов (табл. 1).

Критерии включения пациентов в исследование: возраст 7–19 лет; пациенты с центральным парезом верхних конечностей, в том числе с установленным диагнозом детский церебральный паралич, острое нарушение мозгового кровообращения, травма мозга; наличие структурного поражения головного мозга по данным нейровизуализации. Критерии невключения: неспособность выполнять процедуры исследования; отказ пациента или его законного представителя от участия в исследовании; афазия в степени, исключающей понимание инструкций пациентом; грубое нарушение зрения, не позволяющее выполнять визуальные инструкции на экране компьютера; спастичность в кисти 5 баллов по модифицированной шкале Ashworth. Критерии исключения пациентов из исследования: отказ пациента от продолжения участия в исследовании; развитие острого или декомпенсация хронического заболевания с риском потенциального влияния на результаты исследования; назначение системных миорелаксантов (изменение их дозировки после включения в исследование); введение препаратов ботулинического токсина в мышцы паретичной руки после включения пациента в исследование.

При проведении процедур использовали экзоскелетный комплекс «Экзокисть-2», включающий экзоскелеты кистей, управляемые через ИМК. Пациент располагался в медицинском кресле. Его руки помещали в экзоскелеты

Таблица 1. Характеристики пациентов, включенных в исследование

Участник	Пол	Возраст	Диагноз	Латерализация
1	жен.	11	Последствие внутричерепной травмы	Левосторонний гемипарез
2	жен.	16	Спастическая гемиплегия. Спастический гемипарез справа Состояние после костнопластической трепанации, функциональной гемисферотомии слева	Правосторонний гемипарез
3	муж.	17	Спастический церебральный паралич, квадриплегия	Тетрапарез с преимущественным парезом левой руки
4	жен.	17	Детский церебральный паралич неуточненный Спастическая гемиплегия Локализованная (фокальная) (парциальная) симптоматическая эпилепсия и эпилептические синдромы с комплексными парциальными судорожными припадками. Структурная фокальная эпилепсия, клиническая ремиссия	Левосторонний гемипарез
5	муж.	11	Спастическая гемиплегия Другие расстройства психологического (психического) развития Гиперметропия	Левосторонний гемипарез
6	жен.	10	Спастическая гемиплегия Расстройство психологического (психического) развития неуточненное Другие виды генерализованной эпилепсии и эпилептических синдромов. Электрический статус медленного сна	Левосторонний гемипарез
7	муж.	16	Спастический церебральный паралич	Правосторонний гемипарез
8	муж.	12	Детская гемиплегия Структурная фокальная эпилепсия, ремиссия. Состояние после резекции кортикальной дисплазии левой лобно-центрально-теменной области от сентября 2017 г. Фокальная кортикальная дисплазия, тип IIb (LAE) Генетическая эпилепсия. Общая интеллектуальная недостаточность Состояние после операции Колемана слева	Правосторонний гемипарез
9	муж.	10	Последствие внутричерепной травмы	Правосторонний гемипарез
10	жен.	12	Детский церебральный паралич	Спастическая диплегия
11	муж.	12	Детский церебральный паралич Структурная фокальная эпилепсия Региональная корковая дисплазия. Состояние после функциональной гемисферотомии слева Легкое когнитивное расстройство в связи с эпилепсией Атрофия зрительного нерва	Правосторонний гемипарез
12	жен.	16	Спастический церебральный паралич	Левосторонний гемипарез
13	муж.	13	Детский церебральный паралич	Спастическая диплегия
14	жен.	19	Детский церебральный паралич	Спастическая диплегия

кистей, закрепленные на подлокотниках кресла. На расстоянии 1–1,5 м перед пациентом располагали монитор, на котором находился кружок для фиксации взора и подавали зрительные инструкции по выполнению следующих заданий: кинестетически вообразить раскрытие левой или правой кисти либо спокойно сидеть, расслабившись. Консультации нейропсихолога проводили в случаях, если: 1) ребенок недостаточно мотивирован на участие в процедуре; 2) наблюдаются выраженные трудности с пониманием инструкции на представление движения; 3) имеет место выраженный дефицит внимания; 4) у ребенка отмечаются выраженные страхи и/или панические атаки во время проведения процедуры. В этих случаях диагностировали причины возникших трудностей и проводили тренировку кинестетических образов и процессов представления движения.

Для того чтобы облегчить непростую для ребенка задачу кинестетического воображения движения и сделать ее более понятной, использовали подсказки, упрощающие инициацию возникновения образов представления движения (табл. 2). При этом учитывали возраст ребенка,

его интересы, а также уровень сформированности когнитивных функций.

В случае наличия у ребенка когнитивного дефицита рекомендовано использовать метафоры, предложенные для предыдущей возрастной категории. При выраженной тенденции к общей рассеянности внимания, повышенной переключаемости на побочные ассоциации и при нарушении целенаправленности деятельности разъяснения максимально упрощали и сокращали, используя короткие и четкие формулировки.

В процессе выполнения заданий регистрировали электроэнцефалограмму (ЭЭГ), что позволяло классификатору комплекса определять, какую пациент выполняет задачу. Результат классификации предъявляли в виде зрительной и проприоцептивной обратной связи: если распознавалось выполнение той задачи, которая соответствовала предъявленной инструкции, то цвет кружка на экране монитора изменялся с белого на зеленый, а экзоскелет осуществлял раскрытие кисти.

ЭЭГ регистрировали при помощи прибора NVX52 («Медицинские компьютерные системы»; Россия), входящего

в состав комплекса «Экзокисть-2». Использовали 32 отведения, расположенные на позициях F3, Fz, F4, Fc5, Fc3, Fc1, Fcz, Fc2, Fc4, Fc6, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, Cp5, Cp3, Cp1, Cpz, Cp2, Cp4, Cp6, P3, Pz, P4, Po3, Poz, Po4, O1, O2. Сигнал фильтровали при помощи фильтра Баттерворта с полосой пропускания 5–30 Гц, а также режекторного фильтра, подавляющего наводку от электросети в 50 Гц. Для распознавания выполняемой задачи использовался Байесовский классификатор [19], основанный на анализе ковариационных матриц ЭЭГ.

Тренировки на воображение движения проходили в течение 7–10 дней, по 2–3 процедуры ежедневно. Длительность каждой процедуры составляла 6,5 мин, что примерно в 1,5 раза короче сессий, проводимых для взрослых постинсультных пациентов [8]. Перерыв между процедурами составлял 5 мин.

Точность управления ИМК оценивали на основе ответов классификатора системы. Ответы позволяли получить матрицу ошибок G для каждой сессии. Число строк и столбцов каждой матрицы было равно числу распознаваемых задач (трех в данном исследовании). Элемент g_{ij} ($i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3$) служил для оценки вероятности распознавания задачи с номером i , в случае когда предъявляли инструкцию j . Среднее значение диагональных элементов этой матрицы являлось оценкой средней вероятности правильного распознавания, т. е. точности управления ИМК.

Отфильтрованные записи ЭЭГ, полученные во время процедур, дополнительно обрабатывали с целью оценить величину десинхронизации μ -ритма во время воображения движения. Для каждой записи производили анализ независимых компонент при помощи метода AMICA (Adaptive Mixture Independent Component Analysis) [20]. Использовали именно этот метод как наиболее информативный с точки зрения поиска физиологически значимых источников ЭЭГ [21, 22].

При разложении сигнала на независимые компоненты задавали две статистические модели, что позволило автоматически выделить участки записей с артефактами, возникшими при движении ребенка в кресле. Эти участки были исключены из анализа. Для оставшихся участков исследовали топографические карты найденных независимых компонент, чтобы выделить те из них, которые соответствовали источникам μ -ритма в левом и правом полушарии. Степень десинхронизации μ -ритма оценивали по формуле $100\% \cdot (v_{base} - v_{act})/v_{base}$, где v_{act} — это дисперсия активности компоненты во время воображения контралатеральной руки, а v_{base} — дисперсия активности этой компоненты в покое.

В случае, когда источник μ -ритма идентифицировать не удавалось, вместо активности источника брали активность, оцененную при помощи LCMV бимформинга [23] на основе усредненной топографической карты,

полученной для источника μ -ритма соответствующей локализации в других сессиях.

Для оценки состояния ДФ пациентов использовали общепринятые клинические шкалы: Fugl-Meyer, Action Research Arm Test (ARAT) и Jebsen-Taylor. По шкале Fugl-Meyer анализировали суммы баллов, использованных для оценивания ДФ проксимальных отделов руки, кисти, и общую сумму баллов, использованных для оценивания активных движений руки. По шкале ARAT анализировали шаровой, цилиндрический и щипковый захваты, а также крупные движения руки. По шкале Jebsen-Taylor анализировали время выполнения семи двигательных тестов: написание простого предложения, переворачивание карточек, сбор мелких предметов, имитацию процесса кормления, способность поставить шашки друг на друга, переставить легкие банки, переставить тяжелые банки. Все семь тестов шкалы Jebsen-Taylor выполняли как правой, так и левой рукой.

С помощью гониометрической линейки измеряли максимальные значения суставных углов кисти руки при выполнении активных движений в лучезапястном суставе, а также в пястно-фаланговых и межфаланговых суставах всех пальцев. Все клинические тесты пациенты выполняли перед началом процедур и после их проведения.

Статистический анализ данных клинических шкал включал в себя сравнение показателей, полученных до и после процедур, по критерию Уилкоксона, тесту ANOVA, критерию Стьюдента, и в сравнении приращения показателей клинических шкал по критерию знаков с нулевым уровнем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Управление ИМК

Средняя вероятность правильного распознавания воображаемых движений и состояния покоя во время сессий составила 0,51 (0,45; 0,54) ($\max = 0,70$). Источники μ -ритма, в полушарии, контралатеральном сохранной руке, были идентифицированы в 72,0% (61; 84) сессиях, а источники μ -ритма в полушарии, контралатеральном паретичной руке, встречались в 64% (45; 80) сессиях. В случаях би- и тетра-парезов «сохранной» считали руку, для которой были достигнуты лучшие показатели по шкале Jebsen-Taylor. На рис. 1А и 1Б представлены топографические карты источников μ -ритма, усредненные по всем участникам и записям, в которых они выделялись.

Зависимость точности управления ИМК от средней встречаемости источников была достоверной (рис. 1В). Высокая доля сессий, в которых источники μ -ритма удалось идентифицировать, характеризует участников, наиболее эффективно управлявших ИМК.

Таблица 2. Примеры подсказок для облегчения процесса представления движения

Возраст	7–10 лет	10–13 лет	13–18 лет
Пример установок	Представь, что ты тянешься за цветочком и хочешь его сорвать/хочешь взять машинку/хочешь поймать бабочку/взять свою любимую игрушку	Представь, что ты управляешь роботом «силой мысли» /открываешь сундук с сокровищами/ шкатулку с драгоценностями	Представь, что ты тянешься к ручке двери, чтобы ее открыть/протягиваешь руку другу для приветствия/срываешь яблоко с дерева
			Также допустимо использование конкретных кинестетических образов: «Твоя рука сжата в кулак. Постепенно пальцы начинают отрываться от ладони, почувствуй, как они выпрямляются, расслабляются и образуют прямую линию»

Величина десинхронизации μ -ритма для полушария, контрлатерального сохранной руке, составила 12% (7; 23) (max = 51%), а для полушария, контрлатерального паретичной руке, — 11% (6,5; 17) (max = 31%). Соответствующие средние значения были равны 18,6% и 13,4%, разница между ними была достоверна (ANOVA: $p = 0,0018$; t -тест: $p < 10^{-4}$). Таким образом, воображение движения паретичной рукой вызывает более слабую десинхронизацию μ -ритма в контрлатеральном полушарии.

Показана достоверность зависимости точности управления ИМК от степени десинхронизации μ -ритма, как для полушария, контрлатерального сохранной руке (рис. 1Г), так и для полушария, контрлатерального паретичной руке (рис. 1Д). Эта зависимость показывает, что чем больше десинхронизация ритма при воображении движения как сохранной, так и паретичной руки, тем выше точность управления ИМК.

Улучшения двигательной функции

Достоверное приращение параметров по критерию знаков с нулевым уровнем, свидетельствующих об улучшении ДФ после процедур, получено для всех разделов шкалы Fugl-Meyer — проксимального отдела руки, кисти и суммы баллов по всем активным движениям (табл. 3). Для шкалы ARAT достоверное приращение имело место для шарового и цилиндрического захватов, а также для суммы баллов по всем тестам. Для щипкового захвата и крупных движений руки приращение значений параметров после процедур было статистически недостоверным (см. табл. 3).

Выполнение тестов шкалы Jebsen-Taylor паретичной рукой вызывало большие трудности: до процедур время их выполнения превышало 2 мин для всех пациентов. После процедур только двое детей смогли закончить меньше чем за 2 мин один тест из семи и трое — два теста из семи. Все пациенты успешно выполняли тесты сохранной рукой, и после процедур время выполнения уменьшалось для всех тестов, кроме теста «написание простого предложения». Для тестов «перестановка легких банок», «перестановка тяжелых банок» и «имитация процесса кормления» уменьшение времени выполнения после процедур было статистически достоверно отлично от нуля по критерию знаков (табл. 4).

Из рассматриваемых активных движений паретичной рукой амплитуда активных движений увеличилась только для тыльного разгибания с 30° (25° ; $41,25^\circ$) до 40° (40° ; $58,75^\circ$). Приращение амплитуды оказалось достоверно больше нуля ($p = 0,016$ по критерию знаков).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тренировки кинестетического воображения движения считают эффективным способом восстановления ДФ и все чаще используют в клинической практике восстановления движений после инсульта [5, 6]. Работы по исследованию воображения движения у детей, как здоровых, так и страдающих ДЦП, немногочисленны. В них показано, что способность к воображению движений формируется с 5 до 12 лет, и этой способностью обладают дети не только с нормальным развитием [15, 24], но

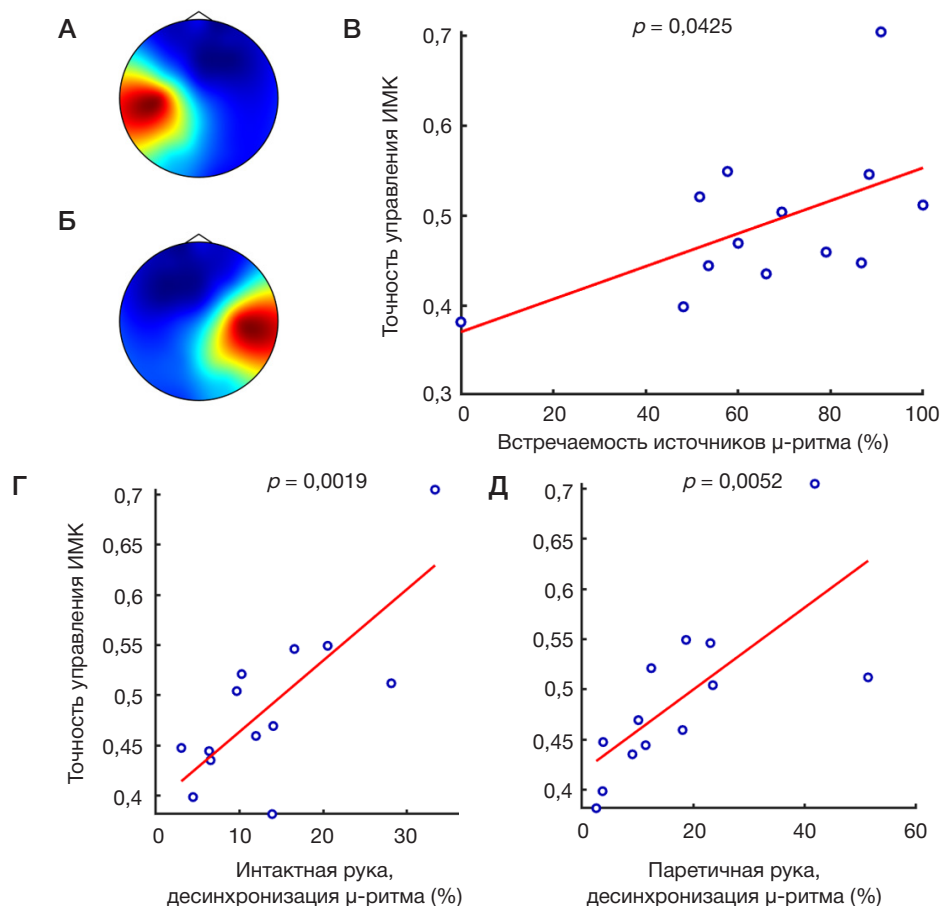


Рис. 1. Топография источников μ -ритма и показатели точности управления ИМК. **А.** Усредненная топография источника μ -ритма в левом полушарии. **Б.** Усредненная топография источника μ -ритма в правом полушарии. **В.** Зависимость точности управления ИМК от встречаемости источников μ -ритма по всем участникам исследования. **Г.** Зависимость точности управления ИМК от степени десинхронизации μ -ритма в полушарии, контрлатеральном сохранной руке. **Д.** Зависимость точности управления ИМК от степени десинхронизации μ -ритма в полушарии, контрлатеральном паретичной руке

Таблица 3. Медианы, квартили и уровень значимости показателей состояния ДФ по шкалам Fugl-Meyer и ARAT до и после процедур

Шкала (двигательные тесты)	До	После	Разность	p_{wilcoxon}	p_{anova}	p_{diff}
Fugl-Meyer (Проксимальные отделы руки)	20,5 (15; 25)	26 (22; 27)	4,5 (1; 6)	0,13	0,27	0,032*
Fugl-Meyer (Кисть)	6 (2; 12)	9,5 (5; 17)	2,5 (0; 5)	0,24	0,28	0,031*
Fugl-Meyer (Сумма по всем активным движениям)	27 (18; 32)	34,5 (26; 43)	7 (2; 11)	0,19	0,25	0,022*
ARAT (Шаровой захват)	11 (3; 24)	13 (3; 36)	1,5 (0; 12)	0,62	0,34	0,008*
ARAT (Цилиндрический захват)	8 (3; 13)	9,5 (6; 21)	1,5 (0; 8)	0,43	0,34	0,018*
ARAT (Щипковый захват)	0,5 (0; 13)	3,5 (0; 18)	0 (0; 3)	0,63	0,56568	0,16
ARAT (Крупные движения руки)	7 (4; 16)	9 (4; 16)	0 (0; 1)	0,63	0,63	0,063
ARAT (Сумма баллов)	31,5 (12; 76)	42 (15; 110)	7,5 (1; 31)	0,33	0,37	< 10⁻³*

Таблица 4. Медианы, квартили (в секундах) и уровень значимости показателей состояния ДФ по шкале Jebsen-Taylor до и после процедур

Двигательный тест	До	После	Разность	p_{wilcoxon}	p_{anova}	p_{diff}
Написание простого предложения	18 (11,25; 29,75)	24 (14,10; 48,25)	0 (-1,50; 3,70)	0,45	0,41	0,36
Переорачивание карточек	6 (4,00; 8,50)	5 (3,00; 7,75)	0 (-1,25; 0,86)	0,44	0,97	0,40
Сбор мелких предметов	9 (6,00; 11,00)	7 (6,50; 13,75)	-0,06 (-2,00; 1,25)	0,88	1,00	0,90
Имитация процесса кормления	11 (8,50; 15,25)	10 (6,50; 13,00)	-1 (-5,66; 0,00)	0,41	0,27	0,0469*
Выставление шашек друг на друга	9 (7,75; 16,25)	9 (6,75; 15,75)	-1 (-4,13; 0,25)	0,57	0,91	0,21
Перестановка легких банок	5 (4,50; 9,25)	4 (3,00; 7,25)	-1 (-2,00; 0,00)	0,38	0,44	0,0039*
Перестановка тяжелых банок	6 (4,00; 9,25)	5 (4,00; 7,50)	-1 (-2,00; 0,00)	0,43	0,45	0,0117*

и с ДЦП [16–18]. Полученные данные подтверждают эти результаты: средняя вероятность распознавания классификатором ЭЭГ предлагаемых в процедуре состояний (раскрытие правой и левой кисти, отдых) составила 0,51, а максимальная — 0,70, что выше 0,33 — уровня случайной вероятности распознавания трех состояний. Однако вероятность распознавания 0,51 меньше средней вероятности распознавания у взрослых — 0,6 по данным, полученным у 37 здоровых испытуемых и 32 постинсультных больных [8].

Возраст пациентов, включенных в исследование воображения движений у детей с ДЦП, находился в том же диапазоне, что и в нашей работе: 11–16 лет [17], 9–14 лет [18] или был еще ниже: 5–9 лет [16]. Критерий же исключения в этих работах был значительно более жестким: исключали пациентов с грубым парезом, с дистонией, с когнитивными нарушениями. Пациенты, включенные в наше исследование, имели серьезные нарушения ДФ (см. табл. 1). Тем не менее все они успешно управляли ИМК: источники μ -ритма в полушарии, контралатеральном сохранной руке, были идентифицированы в большинстве сессий. Эти результаты находятся в соответствии с полученными ранее данными о равно успешном воображении движения у детей с левосторонним и правосторонним ДЦП [17].

Следует отметить, что обнаруженная в нашей работе зависимость точности управления ИМК от степени десинхронизации μ -ритма не является тривиальным результатом, поскольку классификатор системы работает с ковариационными матрицами сигнала и на его ответ могут потенциально влиять различные источники электрической активности, в том числе и артефактной природы [25]. Полученный результат показывает, что тренировки с ИМК действительно вызывают специфичную по отношению к выполняемой задаче активацию первичных сенсомоторных областей, что и является одной из главных целей процедуры.

Существенные нарушения ДФ у детей с ДЦП связаны со слабостью мышц, повышенным мышечным тонусом,

спастичностью, сенсорным дефицитом [26]. Тренировки воображения движения у детей с ДЦП, направленные на стимуляцию процессов нейропластичности, способствуют восстановлению ДФ как самостоятельная терапия [16, 18], так и в сочетании с другими методами реабилитации [17]. Клинические шкалы Fugl-Meyer и ARAT, использованные в нашем исследовании, показали приращение показателей, свидетельствующее об улучшении ДФ. Несмотря на неоднородность группы пациентов по возрасту, диагнозу, латерализации поражения (см. табл. 1), по некоторым двигательным тестам это приращение было статистически достоверным (см. табл. 3). Шкалы Fugl-Meyer и ARAT общеприняты в клинической практике при оценке нарушения ДФ, несмотря на неизбежную субъективность. Надежность их суммарных оценок основана на большом количестве двигательных тестов, которые были разработаны для взрослых пациентов [27]. Наблюдения врачей, проводивших тестирование наших пациентов, подтверждают, что для детей с ДЦП такое тестирование бывает утомительным, а это снижает надежность оценки ДФ.

В отличие от шкал Fugl-Meyer и ARAT, шкала Jebsen-Taylor основана на объективных измерениях времени выполнения двигательных тестов. Тяжелые нарушения ДФ у пациентов, включенных в исследование, не позволили им выполнить тесты этой шкалы до процедур, а после процедур лишь пять пациентов из 14 смогли выполнить некоторые тесты. Однако время выполнения тестов сохранной рукой уменьшилось для всех тестов, кроме одного, и для четырех тестов из семи было статистически достоверно (см. табл. 4). Как известно, моторный дефицит характерен не только для паретичной, но и для сохранной руки [28]. Несмотря на то что расстройство моторики сохранной руки существенно меньше, чем паретичной, оно может значительно ограничивать функциональную активность пациента, особенно в случае тяжелых поражений. В процедурах комплекса ИМК–экзоскелет происходит произвольная активация как сохраненных структур поврежденного полушария,

так и структур сохранного полушария. Такая билатеральная активация, воздействуя на функциональность обеих рук, способствует эффективности процедур.

Для более точной и объективной оценки ДФ применяют биомеханический анализ движений, зарегистрированных до и после восстановительного лечения. Для постинсультных больных такой анализ широко применяют в клинических исследованиях [29]. Для детей с ДЦП возможные протоколы регистрации движений, а также выбор надежных биомеханических параметров оценки ДФ находятся на стадии разработки [30].

ВЫВОДЫ

Процедура ИМК–экзоскелет кисти — эффективное многообещающее средство восстановления ДФ у детей с ДЦП, потенциально пригодное для дополнения основной терапии. Все пациенты, включенные в исследование, успешно справлялись с управлением ИМК, несмотря на различия в возрасте, латерализации и тяжести поражения ДФ. Показано, что управление ИМК вызывает специфичную активацию первичных сенсомоторных областей, в том числе и в пораженном полушарии.

Литература

- Himmelman K, Hagberg G, Uvebrant PAP. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. X. Prevalence and origin in the birth-year period 1999–2002. *Acta Paediatrica*. 2010; 99 (9): 1337–43.
- Семенова К. А. Восстановительное лечение детей с перинатальным поражением нервной системы и детским церебральным параличом. М.: Изд-во «Закон и порядок», 2007; 616 с.
- Frolov AA, Husek D, Biryukova EV, Bobrov PD, Mokienko OA, Alexandrov AV. Principles of motor recovery in post-stroke patients using hand exoskeleton controlled by the brain-computer interface based on motor imagery. *Neural Network World*. 2017; 27 (1): 107–37.
- Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clinical Neurophysiology*. 1999; 110 (11): 1842–57. Epub 1999/11/27. PubMed PMID: 10576479.
- Hétu S, Gregoire M, Sainpont A, Coll M-P, Eugene F, Michon P-E, et al. The neural network of motor imagery: an ALE meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2013; 37 (5): 930–49.
- Monge-Pereira E, Ibañez-Pereda J, Alguacil-Diego I, Serrano J, Spottorno-Rubio M, Molina-Rueda F. Use of Electroencephalography Brain-Computer Interface Systems as a Rehabilitative Approach for Upper Limb Function After a Stroke: A Systematic Review. *PM&R*. 2017; 9 (9): 918–32.
- Ang KK, Chua KSG, Phua KS, Wang C, Chin ZY, Kuah CWK, et al. A randomized controlled trial of EEG-based motor imagery brain-computer interface robotic rehabilitation for stroke. *Clinical EEG and neuroscience*. 2015; 46 (4): 310–20.
- Frolov AA, Mokienko O, Lyukmanov R, Biryukova E, Kotov S, Turbina L, et al. Post-stroke rehabilitation training with a motor-imagery-based brain-computer interface (BCI)-controlled hand exoskeleton: a randomized controlled multicenter trial. *Frontiers in neuroscience*. 2017; 11: 400.
- Ono T, Shindo K, Kawashima K, Ota N, Ito M, Ota T, et al. Brain-computer interface with somatosensory feedback improves functional recovery from severe hemiplegia due to chronic stroke. *Frontiers in neuroengineering*. 2014; 7: 19.
- Ramos-Murguialday A, Broetz D, Rea M, Læer L, Yilmaz Ö, Brasil FL, et al. Brain-machine interface in chronic stroke rehabilitation: a controlled study. *Annals of neurology*. 2013; 74 (1): 100–8.
- Eyre JA. Corticospinal tract development and its plasticity after perinatal injury. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007; 31 (8): 1136–49.
- Thelen E. Developmental 'movement disorders' and problem solving. In: What are 'normal movements' in atypical populations? *Behavioral and Brain Sciences*. 1996; 19 (1): 55–106.
- Allred RP, Jones TA. Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Experimental Neurology*. 2008; 210 (1): 172–81.
- Duarte NAC, Grecco LAC, Zanon N, Galli M, Fregni F, Oliveira CS. Motor cortex plasticity in children with spastic cerebral palsy: a systematic review. *Journal of Motor Behavior*. 2016; 49 (4): 1–10.
- Spruijt S, van der Kamp J, Steenbergen B. The ability of 6- to 8-year-old children to use motor imagery in a goal-directed pointing task. *Journal of Experimental Child Psychology*. 2015; 139: 221–33.
- Lust JM, Wilson PH, Steenbergen B. Motor imagery difficulties in children with cerebral palsy: A specific or general deficit? *Research in Developmental Disabilities*. 2016; 57: 102–11.
- Cabral-Sequeira AS, Coelho DB, Teixeira L. Motor imagery training promotes motor learning in adolescents with cerebral palsy: comparison between left and right hemiparesis. *Experimental Brain Research*. 2016; 234 (6): 1515–24.
- Errante A, Bozzetti F, Sghedoni S, Bressi B, Costi S, Crisi G, et al. Explicit motor imagery for grasping actions in children with spastic unilateral cerebral palsy *Frontiers in neurology*. 2019; 10: 837.
- Бобров П. Д., Коршаков А. В., Рошин В. Ю., Фролов А. А. Байесовский подход к реализации интерфейса мозг–компьютер, основанного на представлении движений. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2012; 62 (1): 89–99.
- Palmer JA, Kreutz-Delgado K, Makeig S. AMICA: An adaptive mixture of independent component analyzers with shared components. *Swartz Center for Computational Neuroscience, University of California San Diego, Tech Rep*. 2012.
- Delorme A, Palmer J, Onton J, Oostenveld R, Makeig S. Independent EEG sources are dipolar. *PloS one*. 2012; 7 (2): e30135.
- Frolov A, Bobrov P, Biryukova E, Isaev M, Kerechanin Y, Bobrov D, et al. Using Multiple Decomposition Methods and Cluster Analysis to Find and Categorize Typical Patterns of EEG Activity in Motor Imagery Brain-Computer Interface Experiments. *Frontiers in Robotics and AI*. 2020; 7 (88). DOI: 10.3389/frobt.2020.00088.
- Van Hoey G, Van de Walle R, Vanrumste B, D'Havse M, Lemahieu I, Boon P. Beamforming techniques applied in EEG source analysis. *Proc ProRISC99*. 1999; 10: 545–9.
- Crognier L, Skoura X, Vinter A, Papaxanthis C. Mental representation of arm motion dynamics in children and adolescents. *PloS one*. 2013; 8: e73042.
- Фролов А., Азиатская Г., Бобров П., Люкманов Р., Федотова И., Гусек Д., и др. Электрофизиологическая активность мозга при управлении интерфейсом мозг–компьютер, основанном на воображении движений. *Физиология человека*. 2017; 43 (5): 17–28.
- Klingels K, Demeyere I, Jaspers E, De Cock P, Molenaers G, Boyd R, et al. Upper limb impairments and their impact on activity measures in children with unilateral cerebral palsy. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2012; 16 (5): 475–84.
- Gladstone DJ, Daniells CJ, Black SE. The Fugl-Meyer assessment of motor recovery after stroke: A critical review of its measurement properties. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2002; 16 (232–240).
- Sunderland A. Recovery of ipsilateral dexterity after stroke. *Stroke*. 2000; 31 (2): 430–3.
- Alt Murphy MA, Häger CK. Kinematic analysis of the upper extremity after stroke — how far have we reached and what have we grasped? *Physical Therapy Reviews*. 2015; 20: 137–55.
- Mailleux L, Simon-Martinez C, Feys H, Jaspers E. Upper extremity movement pathology during functional tasks. In: Müller B, Wolf S, editors. *Handbook of Human Motion*. Cham: Springer International Publishing AG, 2018; p. 1167–1184.

References

- Himmelman K, Hagberg G, Uvebrant PAP. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. X. Prevalence and origin in the birth-year period 1999–2002. *Acta Paediatrica*. 2010; 99 (9): 1337–43.
- Semenova KA. Vosstanovitel'noe lechenie detej s perinatal'nym porazheniem nervnoj sistemy i detskim cerebral'nym paralichom. M.: Izd-vo «Zakon i porjadok», 2007; 616 s. Russian.
- Frolov AA, Husek D, Biryukova EV, Bobrov PD, Mokienko OA, Alexandrov AV. Principles of motor recovery in post-stroke patients using hand exoskeleton controlled by the brain-computer interface based on motor imagery. *Neural Network World*. 2017; 27 (1): 107–37.
- Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clinical Neurophysiology*. 1999; 110 (11): 1842–57. Epub 1999/11/27. PubMed PMID: 10576479.
- Héto S, Gregoire M, Saimpont A, Coll M-P, Eugene F, Michon P-E, et al. The neural network of motor imagery: an ALE meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2013; 37 (5): 930–49.
- Monge-Pereira E, Ibañez-Pereda J, Alguacil-Diego I, Serrano J, Spottorno-Rubio M, Molina-Rueda F. Use of Electroencephalography Brain-Computer Interface Systems as a Rehabilitative Approach for Upper Limb Function After a Stroke: A Systematic Review. *PM&R*. 2017; 9 (9): 918–32.
- Ang KK, Chua KSG, Phua KS, Wang C, Chin ZY, Kuah CWK, et al. A randomized controlled trial of EEG-based motor imagery brain-computer interface robotic rehabilitation for stroke. *Clinical EEG and neuroscience*. 2015; 46 (4): 310–20.
- Frolov AA, Mokienko O, Lyukmanov R, Biryukova E, Kotov S, Turbina L, et al. Post-stroke rehabilitation training with a motor-imagery-based brain-computer interface (BCI)-controlled hand exoskeleton: a randomized controlled multicenter trial. *Frontiers in neuroscience*. 2017; 11: 400.
- Ono T, Shindo K, Kawashima K, Ota N, Ito M, Ota T, et al. Brain-computer interface with somatosensory feedback improves functional recovery from severe hemiplegia due to chronic stroke. *Frontiers in neuroengineering*. 2014; 7: 19.
- Ramos-Murguialday A, Broetz D, Rea M, Lâer L, Yilmaz Ö, Brasil FL, et al. Brain-machine interface in chronic stroke rehabilitation: a controlled study. *Annals of neurology*. 2013; 74 (1): 100–8.
- Eyre JA. Corticospinal tract development and its plasticity after perinatal injury. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007; 31 (8): 1136–49.
- Thelen E. Developmental 'movement disorders' and problem solving. In: What are 'normal movements' in atypical populations? *Behavioral and Brain Sciences*. 1996; 19 (1): 55–106.
- Allred RP, Jones TA. Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Experimental Neurology*. 2008; 210 (1): 172–81.
- Duarte NAC, Grecco LAC, Zanon N, Galli M, Fregni F, Oliveira CS. Motor cortex plasticity in children with spastic cerebral palsy: a systematic review. *Journal of Motor Behavior*. 2016; 49 (4): 1–10.
- Spuijt S, van der Kamp J, Steenbergen B. The ability of 6- to 8-year-old children to use motor imagery in a goal-directed pointing task. *Journal of Experimental Child Psychology*. 2015; 139: 221–33.
- Lust JM, Wilson PH, Steenbergen B. Motor imagery difficulties in children with cerebral palsy: A specific or general deficit? *Research in Developmental Disabilities*. 2016; 57: 102–11.
- Cabral-Sequeira AS, Coelho DB, Teixeira L. Motor imagery training promotes motor learning in adolescents with cerebral palsy: comparison between left and right hemiparesis. *Experimental Brain Research*. 2016; 234 (6): 1515–24.
- Errante A, Bozzetti F, Sghedoni S, Bressi B, Costi S, Crisi G, et al. Explicit motor imagery for grasping actions in children with spastic unilateral cerebral palsy *Frontiers in neurology*. 2019; 10: 837.
- Bobrov PD, Korshakov AV, Roshhin VYu, Frolov AA. Bajesovskij podhod k realizacii interfejsa mozg-komp'juter, osnovannogo na predstavlenii dvizhenij. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti*. 2012; 62 (1): 89–99. Russian.
- Palmer JA, Kreutz-Delgado K, Makeig S. AMICA: An adaptive mixture of independent component analyzers with shared components. Swartz Center for Computational Neuroscience, University of California San Diego, Tech Rep. 2012.
- Delorme A, Palmer J, Onton J, Oostenveld R, Makeig S. Independent EEG sources are dipolar. *PloS one*. 2012; 7 (2): e30135.
- Frolov A, Bobrov P, Biryukova E, Isaev M, Kerechanin Y, Bobrov D, et al. Using Multiple Decomposition Methods and Cluster Analysis to Find and Categorize Typical Patterns of EEG Activity in Motor Imagery Brain-Computer Interface Experiments. *Frontiers in Robotics and AI*. 2020; 7 (88). DOI: 10.3389/frobt.2020.00088.
- Van Hoey G, Van de Walle R, Vanrumste B, D'Havse M, Lemahieu I, Boon P. Beamforming techniques applied in EEG source analysis. *Proc ProRISC99*. 1999; 10: 545–9.
- Crognier L, Skoura X, Vinter A, Papaxanthis C. Mental representation of arm motion dynamics in children and adolescents. *PloS one*. 2013; 8: e73042.
- Frolov A, Aziatskaya G, Bobrov P, Lyukmanov R, Fedotova I, Gusek D, i dr. Jelektrofiziologicheskaja aktivnost' mozga pri upravlenii interfejsom mozg-komp'juter, osnovannym na voobrazhenii dvizhenij. *Fiziologija cheloveka*. 2017; 43 (5): 17–28. Russian.
- Klingels K, Demeyere I, Jaspers E, De Cock P, Molenaers G, Boyd R, et al. Upper limb impairments and their impact on activity measures in children with unilateral cerebral palsy. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2012; 16 (5): 475–84.
- Gladstone DJ, Daniells CJ, Black SE. The Fugl-Meyer assessment of motor recovery after stroke: A critical review of its measurement properties. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2002; 16 (232–240).
- Sunderland A. Recovery of ipsilateral dexterity after stroke. *Stroke*. 2000; 31 (2): 430–3.
- Alt Murphy MA, Häger CK. Kinematic analysis of the upper extremity after stroke — how far have we reached and what have we grasped? *Physical Therapy Reviews*. 2015; 20: 137–55.
- Mailleux L, Simon-Martinez C, Feys H, Jaspers E. Upper extremity movement pathology during functional tasks. In: Müller B, Wolf S, editors. *Handbook of Human Motion*. Cham: Springer International Publishing AG, 2018; p. 1167–1184.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЭГ В ЧАСТОТНОМ ДИАПАЗОНЕ α -РИТМА У ДЕТЕЙ С ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РОБОТИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Н. В. Ларина, М. А. Начарова, Л. Л. Корсунская, С. В. Власенко, В. Б. Павленко ✉

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

Курс нейрореабилитации с применением комплекса «неинвазивный интерфейс мозг–компьютер и экзоскелет кисти» в сочетании с традиционным курортным лечением приводит у детей с ДЦП к значимому улучшению показателей движений, однако характеристики ЭЭГ не были проанализированы. Целью работы было определить особенности реактивности ЭЭГ пациентов в частотном диапазоне α -ритма при прохождении курса из 10 сеансов роботизированной терапии. ЭЭГ регистрировали в 21 отведении в условиях покоя и кинестетического воображения движений разгибания пальцев рук у 32 детей обоего пола в возрасте 10–18 лет, имеющих диагноз «лево- и правосторонний гемипарез». Во время первого сеанса паттерны реактивности α -ритма при воображении движений у групп детей с лево- и правосторонним гемипарезом различались, причем различия достигали статистической значимости в отведении P2 при воображении движений левой кисти ($F_{1,30} = 5,10; p < 0,05$). Паттерн реактивности α -ритма во время десятого сеанса отличался замещением реакций синхронизации в ряде отведений на десинхронизацию, что свидетельствует об увеличении активации неокортекса. Наиболее выраженными были изменения ЭЭГ у детей с левосторонним гемипарезом ($F_{20,300} = 1,84; p < 0,05$). По завершении курса степень различия показателей ЭЭГ у пациентов с лево- и правосторонним гемипарезом уменьшилась. Выявленные перестройки паттерна ЭЭГ в частотной полосе α -ритма можно рассматривать как проявление процессов благоприятной реорганизации нейронных цепей, контролирующих планирование и выполнение сложных движений рук.

Ключевые слова: детский церебральный паралич, ЭЭГ, нейрореабилитация, интерфейс мозг–компьютер, воображение движения

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

Вклад авторов: Ларина Н. В., Корсунская Л. Л., Власенко С. В. — набор данных, написание статьи; Начарова М. А., Павленко В. Б. — обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом КФУ им. В. И. Вернадского (протокол № 53 от 06 декабря 2018 г.). Все пациенты или их законные представители подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Борисович Павленко
пр. Вернадского, 4, г. Симферополь, 295007; vpav55@gmail.com

Статья получена: 16.06.2020 **Статья принята к печати:** 02.07.2020 **Опубликована онлайн:** 16.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.043

CHANGES IN EEG PATTERNS IN THE α -FREQUENCY BAND FOLLOWING BCI-BASED THERAPY IN CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY

Larina NV, Nacharova MA, Korsunskaya LL, Vlasenko SV, Pavlenko VB ✉

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

It was demonstrated previously that neurorehabilitation with the noninvasive BCI-controlled robotic device combined with conventional therapeutic modalities resulted in significant motor improvement in children with cerebral palsy. However, EEG records were not analyzed in the previous study. The aim of this paper was to describe the reactivity patterns of the EEG α -rhythm during a series of 10 BCI-based neurorehabilitation sessions. The study was carried out in 32 boys and girls aged 10 to 18 years with right- or left-side hemiparesis. EEG was recorded from 21 electrodes at rest and during kinesthetic imagery of finger extension. During the first session, patterns of α -rhythm reactivity during motor imagery differed between patients with left- and right-side hemiparesis. The differences were statistically significant at P2 during left hand movement rehearsal ($F_{1,30} = 5.10; p < 0.05$). During the final session, the pattern of α -rhythm reactivity was different: synchronization was taken over by desynchronization at some electrode sites, suggesting increased activity of the neocortex. The most conspicuous EEG changes were observed in children with left-side hemiparesis ($F_{20,300} = 1.84; p < 0.05$). By the end of the rehabilitation course, the differences between patients with left- and right-side hemiparesis became much less pronounced. Rearrangements in the EEG patterns in the α -frequency band can be regarded as signs of beneficial reorganization of neural circuits responsible for planning and executing complex hand movements.

Keywords: cerebral palsy, EEG, neurorehabilitation, brain-computer interface, motor imagery

Funding: the study was part of the state-funded project RFMEFI60519X0186 on the *Development of a BCI-based hand exoskeleton with biological feedback for the rehabilitation of children with cerebral palsy*. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Author contribution: Larina NV, Korsunskaya LL, Vlasenko SV — data acquisition, manuscript preparation; Nacharova MA, Pavlenko VB — data analysis, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Vernadsky Crimean Federal University (Protocol № 53 dated December 06, 2018). Informed consent was obtained from the patients or their legal representatives.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir B. Pavlenko
Pr. Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007; vpav55@gmail.com

Received: 16.06.2020 **Accepted:** 02.07.2020 **Published online:** 16.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.043

В большинстве развитых стран детский церебральный паралич (ДЦП) является наиболее распространенной причиной инвалидности, возникающей в раннем детстве. ДЦП поражает примерно 1 из 500 новорожденных, в

мире им страдает около 17 млн человек [1]. Термин «ДЦП» объединяет группу хронических непрогрессирующих симптомокомплексов двигательных нарушений (спастических параличей, гиперкинетического, церебеллярного

атактического, псевдобульбарного синдромов), основная причина которых в нарушении развития или повреждении головного мозга в антенатальном, интранатальном или неонатальном возрастных периодах. Двигательные дисфункции часто сочетаются с умственной отсталостью, эпилептическими припадками, трудностями восприятия, общения и обучения [2]. В связи с разнообразием клинических проявлений ДЦП существующие медикаментозные и физиотерапевтические методы помощи таким детям не всегда эффективны. Один из перспективных методов коррекции двигательных нарушений — применение комплексов реабилитации, состоящих из неинвазивных интерфейсов мозг–компьютер (ИМК) и роботизированных устройств с биологической обратной связью [3]. Работа комплексов основана на распознавании намерений пациента по изменению паттерна его ЭЭГ при кинестетическом воображении движений и запуске движений экзоскелета. Предполагается [4], что предоставление дополнительной информации с помощью роботизированных ортезов повышает качество лечения: пациент получает обратную связь об успешности представления движения, а усиление тактильной, проприоцептивной и зрительной афферентации дополнительно активирует структуры головного мозга, лишенные или ограниченные в получении сенсорной информации вследствие поражения мозга. Показана эффективность указанной технологии при реабилитации больных, перенесших инсульт [5, 6].

Несмотря на то что ряд авторов [7, 8] указывают на обширные перспективы использования ИМК в реабилитации детей с ДЦП, в настоящее время исследования в этой области единичны. Так, при работе с пациентами, имеющими диагноз ДЦП, показана потенциальная возможность применения ИМК на основе анализа динамики сенсомоторного ритма ЭЭГ [9]. Выполнение больными заданий на кинестетическое представление движений приводило к таким изменениям мощности μ - и β -ритмов ЭЭГ, которые адекватно оценивала программа-классификатор. В другой работе использовали ИМК, выявляющий изменения отношения мощности β - и θ -ритмов при представлении пациентом разгибания кисти и запускающий электростимуляцию мышц разгибателей запястья [10]. После серии таких сеансов у детей с ДЦП было выявлено улучшение параметров движений рук.

Для коррекции двигательных функций верхних конечностей у детей с ДЦП был применен комплекс ИМК-экзоскелет кисти [11]. Авторы работы испытывали комплекс на фоне санаторно-курортного лечения в специализированном санатории. В результате курса нейрореабилитации у большинства детей снизилась спастичность мышц кисти, увеличилась сила мышц и объем движений кисти, вырос репертуар бытовых навыков. У пациентов, получавших только традиционное санаторно-курортное лечение, была обнаружена лишь тенденция к увеличению объема бытовых навыков, но положительные изменения не были статистически значимыми. В указанной публикации динамику ЭЭГ детей в процессе применения роботизированного комплекса не анализировали.

В контексте анализа активности ЦНС в процессе реабилитационных мероприятий у пациентов с двигательными нарушениями особый интерес представляет изучение реактивности α -ритма и его разновидности — μ -ритма. Эти ритмы при выполнении человеком различных видов деятельности демонстрируют связанную с событиями десинхронизацию или синхронизацию. Параметры реактивности α -ритма ЭЭГ используют в качестве индикатора вовлеченности различных областей

неокортекса здоровых испытуемых в процессы переработки разномодальной информации [12], а μ -ритма — в качестве индикатора активации соматосенсорной и моторной зон коры при выполнении и представлении движений [13, 14]. Поскольку указанные ритмы имеют схожий частотный диапазон, а при выполнении задач на представление движений в этот диапазон вносит свой вклад и частично сохраняющийся при открытых глазах затылочный α -ритм, отличающийся высокой реактивностью при выполнении когнитивной деятельности [15], в дальнейшем, употребляя по отношению к результатам нашего исследования термин « α -ритм» или словосочетание «активность в частотном диапазоне α -ритма», мы подразумеваем, что эта активность является результатом генерации и α -, и μ -ритма.

У перенесших инсульт пациентов при представлении движений выявлены изменения указанных ритмов, заключающиеся в их как синхронизации, так и десинхронизации [16]. Паттерн таких реакций менялся после курса реабилитации с использованием ИМК, управляющего экзоскелетом кисти. Авторы указанной публикации высказали предположение, что такие изменения отражают реорганизацию нейронных цепей в процессе нейрореабилитации. Необходимо подчеркнуть, что у детей с ДЦП особенности реактивности α - и μ -ритмов в процессе курса нейрореабилитации изучены недостаточно.

Целью исследования было определить особенности реактивности ЭЭГ в частотном диапазоне α -ритма в процессе реабилитации детей с ДЦП, имеющих нарушение функций верхней конечности, на основе применения комплекса «неинвазивный ИМК-экзоскелет кисти с биологической обратной связью».

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика выборки

Работу проводили на базе специализированного отделения для психоневрологических больных Евпаторийского военного детского клинического санатория имени Е. П. Глинки. В исследовании приняли участие пациенты в возрасте 10–18 лет, проходящие курс санаторно-курортной реабилитации с применением комплекса «неинвазивный ИМК-экзоскелет кисти» («Экзокисть-2») производства консорциума: Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, НПО «Андроидная техника» (Россия). Критерии включения пациентов: наличие установленного синдромного диагноза «ДЦП» в соответствии с критериями МКБ-10; наличие у пациента в структуре неврологических нарушений гемипареза с уровнем двигательной активности не выше III по критериям классификации больших моторных функций (Gross Motor Function Classification System for Cerebral Palsy, GMFCS). Критерии исключения: уровень двигательной активности по критериям GMFCS больше III; наличие пlegии верхней конечности; афатические нарушения; медикаментозно некорректируемая эпилепсия; нарушения зрения, не позволяющие различать инструкцию на экране; умственная отсталость умеренной, тяжелой и глубокой степеней (F71–73 по МКБ-10).

В итоговую выборку вошли 32 пациента, которые были направлены на санаторно-курортный этап восстановительного лечения с установленным диагнозом ДЦП. Больные были разделены на две группы: имеющие диагноз левосторонний гемипарез (16 испытуемых;

10 мужского, 6 женского пола) и правосторонний гемипарез (16 испытуемых: 9 мужского, 7 женского пола). Из них 21 пациент по критериям классификации больших моторных функций (GMFCS) имел II уровень двигательной активности и 11 пациентов — III уровень. Возраст детей составил 10–12 лет (11 человек), 13–15 лет (12 человек) и 16–18 лет (9 человек). Средний возраст испытуемых — $13,6 \pm 2,5$ лет. Достоверных различий по возрасту между группами не было.

Реабилитационные мероприятия, регистрация и анализ ЭЭГ

Работа ИМК основана на анализе паттернов ЭЭГ, возникающих при воображении движений. Для этого применяли классификатор, анализирующий ковариационные матрицы сигналов ЭЭГ с применением метода Байеса [17].

Во время тренировок пациенты сидели в кресле на расстоянии полутора метров от компьютерного монитора, на котором им предъявляли визуальные инструкции. Кисти рук размещали внутри «рукавиц» экзоскелета. В центре экрана находились округлая метка белого цвета, служившая для фиксации взгляда, и три стрелки вокруг нее, менявшие цвет для обозначения инструкций. Пациент выполнял следующие команды: расслабиться (в течение 10 с активировалась верхняя стрелка); кинестетически воображать движение левой или правой руки (в течение 10 с активировалась левая или правая стрелка соответственно). При точном выполнении пациентом задания фиксирующая взор метка окрашивалась в зеленый цвет, экзоскелет выполнял соответствующее движение и кисть руки пассивно разгибалась. Таким образом, генерировался комбинированный зрительный и кинестетический сигнал обратной связи.

Пациенты проходили курс из 10 сеансов (один сеанс через день) по одинаковой схеме: три сессии по 8 мин с перерывом на отдых не менее 5 мин. В течение сеанса ситуацию воображения движений каждой руки повторяли 24 раза. Больные в течение 21 дня получали также комплексное санаторно-курортное лечение по стандартным методикам [11]: лечебную физкультуру, массаж паретичных мышц, пелоидотерапию, гидрокинезиотерапию в термальной воде, электростимуляцию мышц, являющихся антагонистами паретичным.

ЭЭГ регистрировали монополярно с помощью электроэнцефалографа «Нейровизор БММ» («Медицинские Компьютерные Системы»; Россия) в лобных (Fpz, Fp1, Fp2, Fz, F1, F2, F3, F4), центральных (Cz, C1, C2, C3, C4), теменных (Pz, P1, P2, P3, P4) и затылочных (Oz, O1, O2) отведениях, расположенных по неполной международной схеме 10–10. В качестве референтного использовали объединенный ушной электрод. В процессе записи частоты среза фильтров высоких и низких частот составляли 5 и 30 Гц соответственно, частота оцифровки ЭЭГ-сигналов — 500 Гц.

При обработке ЭЭГ из анализа исключали участки записей с амплитудой более 250 мкВ, а также отрезки, содержащие большое количество артефактов, связанных с активацией ЭЭГ мышц лба. Для анализа отбирали безартефактные 10-секундные фрагменты ЭЭГ во время воображения движений правой либо левой рукой и во время расслабленного бодрствования с открытыми глазами («фон»). Для одного сеанса количество таких фрагментов составляло 10–15 для каждой ситуации. Указанные фрагменты ЭЭГ подвергали быстрому преобразованию Фурье с эпохой анализа 2,5 с и взаимным

перекрытием эпох 50%. Применяли сглаживание окном Блэкмана. Для каждого 10-секундного отрезка записи рассчитывали среднюю амплитуду α -ритма в полосе частот 8–13 Гц и индексы реактивности (ИР) в соответствии с формулой: $ИР = 100\% \times [(B - A) / A]$, где B — средняя амплитуда α -ритма во время представления движений в течение 10 с, A — средняя амплитуда α -ритма в фоновой ситуации, предшествующей представлению движений. Для ситуаций воображения движений левой и правой рук, по фрагментам ЭЭГ, зарегистрированным в течение сеанса, средние арифметические значения ИР рассчитывали отдельно.

Положительные значения ИР свидетельствуют об увеличении амплитуды α -ритма во время представления движений по сравнению с фоновым уровнем (синхронизация), а отрицательные — об ее уменьшении (десинхронизация). Для дальнейшего анализа использовали усредненные ИР для первого и десятого сеансов тренинга.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc.; США). Применение критерия Шапиро–Уилка показало, что распределение значений ИР α -ритма в исследуемых отведениях не отличалось от нормального. Это позволило использовать для обработки данных дисперсионный анализ с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). По схеме $2 \times 2 \times 21$ оценивали влияние межсубъектного фактора ГРУППА (принадлежность к группе испытуемых с лево- или правосторонним гемипарезом), а также двух внутрисубъектных факторов: РУКА (представление движений левой и правой руками) и ЛОКУС (21 отведение ЭЭГ). Изменения у пациентов реактивности α -ритма в результате прохождения курса лечения анализировали с помощью ANOVA с внутрисубъектными факторами СЕАНС (первый и десятый), РУКА и ЛОКУС. Для оценки изменений ИР в каждом из локусов ЭЭГ применяли метод априорных контрастов (оценка F-распределения). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$, но в связи с небольшим объемом выборки учитывали и тенденции к наличию различий ($p < 0,10$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами было показано, что в результате проведенного комплексного санаторно-курортного лечения с применением комплекса «неинвазивный ИМК-экзоскелет кисти» у детей с ДЦП значимо улучшились характеристики движений верхних конечностей [11]. У пациентов, получавших только традиционное санаторно-курортное лечение, положительные изменения не были статистически значимыми. ЭЭГ этих пациентов не регистрировали.

Реактивность α -ритма в начале курса реабилитации

Во время первого сеанса роботизированной терапии у пациентов при воображении движений были выявлены разнонаправленные изменения амплитуды α -ритма (рис. 1, 2, красные столбцы). В большинстве отведений обоих полушарий была выявлена его синхронизация. Паттерны изменений α -ритма различались у групп детей с право- и левосторонним гемипарезом. Близкое к статистически значимому влияние оказывало взаимодействие факторов ГРУППА \times РУКА \times ЛОКУС ($F_{20, 600} = 1,45$; $p = 0,09$).

Применение метода априорных контрастов показало, что при воображении разгибания пальцев левой кисти (рис. 1) различия достигали статистической значимости в правом теменном отведении P2 ($F_{1,30} = 5,10$; $p < 0,05$). В этом локусе при представлении движений левой рукой у детей с левосторонним гемипарезом выявлена выраженная синхронизация α -ритма ЭЭГ (рис. 1А), тогда как у испытуемых с правосторонним гемипарезом — лишь незначительные его изменения (рис. 1Б).

Применение метода априорных контрастов показало, что при воображении движений правой рукой у детей с правосторонним гемипарезом выявлена тенденция к большей синхронизации α -ритма в отведении P2 ($F_{1,30} = 2,81$; $p = 0,10$) по сравнению с пациентами, у которых паретичной рукой была левая (рис. 2А, Б).

Реактивность α -ритма при завершении курса реабилитации

Паттерн реактивности α -ритма, выявленный у пациентов во время завершающего десятого сеанса, отличался от такового в начале курса реабилитации.

Для группы детей с левосторонним гемипарезом выявлено значимое влияние взаимодействия факторов СЕАНС \times РУКА \times ЛОКУС ($F_{20,300} = 1,84$; $p < 0,05$). Во время представления движений паретичной рукой реакцию синхронизации α -ритма ЭЭГ, наблюдаемую ранее в отведениях Fp1, Fp2, P2, Oz, к концу тренировок сменила реакция десинхронизации (см. рис. 1А). Различия показателей ИР первого и десятого сеансов достигали уровня статистической значимости в отведениях P2 ($F_{1,15} = 10,02$; $p < 0,01$) и Oz ($F_{1,15} = 7,68$; $p < 0,05$) и приближались к нему в отведении Fp1 ($F_{1,15} = 3,96$; $p = 0,07$). Во время воображения движений правой рукой у детей с левосторонним гемипарезом значимые различия в реактивности α -ритма выявлены в отведении C1 ($F_{1,15} = 6,57$; $p < 0,05$). После проведения тренировок реакция

десинхронизации α -ритма сменилась на синхронизацию (см. рис. 2А).

У испытуемых с правосторонним гемипарезом различия ИР α -ритма при представлении движений правой и левой рукой во время первого и последнего сеансов не достигали уровня статистической значимости (см. рис. 1Б, 2Б), взаимодействие факторов ТРЕНИНГ \times РУКА \times ЛОКУС не оказывало значимого влияния на различия ($F_{20,300} = 0,86$; $p = 0,64$).

После прохождения курса тренировок степень различия показателей реактивности α -ритма при воображении движений рук у детей с левосторонним и правосторонним гемипарезом уменьшилась — влияние взаимодействия факторов ГРУППА \times РУКА \times ЛОКУС стало далеким от значимого ($F_{20,600} = 0,88$; $p = 0,61$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проанализированы изменения ЭЭГ в процессе нейрореабилитации функций пациентов с ДЦП при применении комплекса ИМК. Следует отметить, что степень изменения амплитуды ЭЭГ в частотном диапазоне α -ритма у детей с ДЦП при воображении движений рук оказалась неожиданно невысокой. В большинстве отведений значения ИР не превышали 3%. Одной из причин ограниченного уровня реактивности может быть тот факт, что для больных с ДЦП характерен нетипичный вид модуляции ритмов ЭЭГ. У таких пациентов при выполнении движений отмечено снижение реакций как десинхронизации, так и синхронизации μ -ритма по сравнению с реакциями здоровых детей, четкая локализация реакций отсутствует, изменения ЭЭГ можно наблюдать в самых разных областях неокортекса, включая теменную и затылочную область [18–20]. Кроме того, несмотря на то что от пациентов требовалось воображать движение непрерывно в течение 10 с, изменения амплитуды α -ритма могли быть нестабильными.

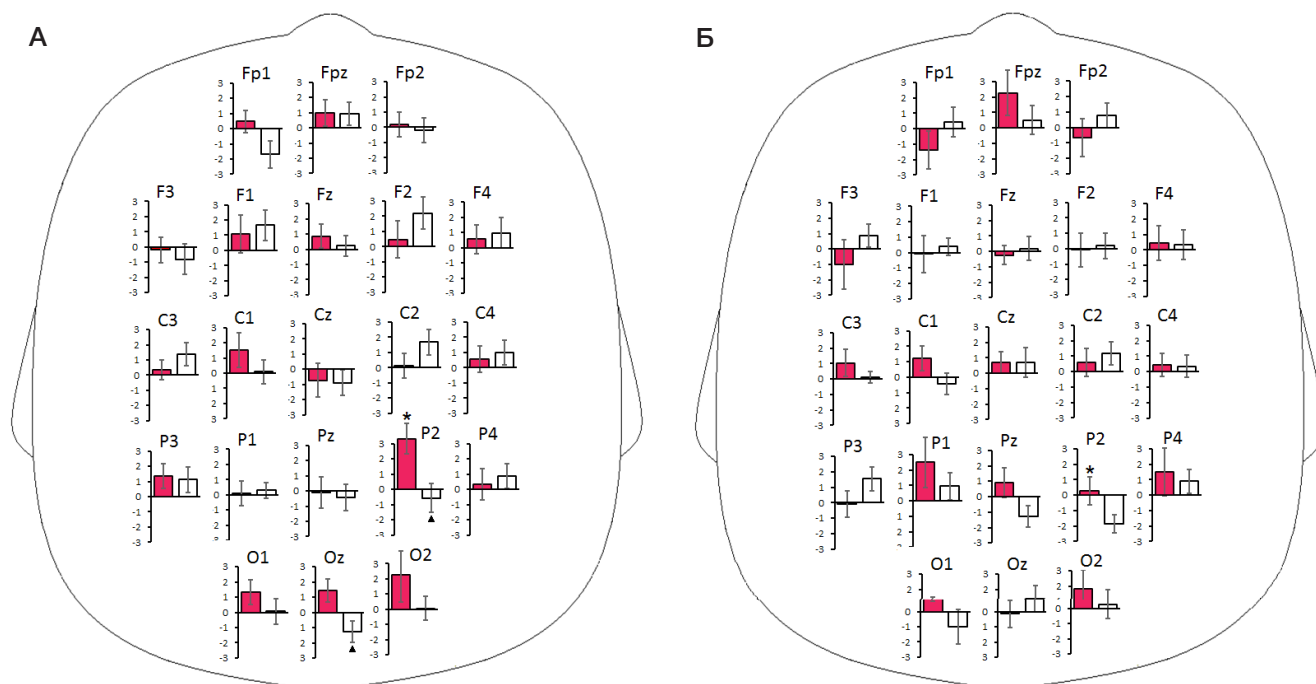


Рис. 1. Индексы реактивности α -ритма ЭЭГ (%) в группах детей с левосторонним (А) и правосторонним (Б) гемипарезом при представлении движений левой рукой во время первого сеанса (красные столбцы) и завершающего, десятого сеанса (белые столбцы) курса реабилитации с использованием роботизированного комплекса. Приведены средние значения и ошибки средних. Различия индексов реактивности у детей двух групп: * — $p < 0,05$; между показателями сеансов: ▲ — $p < 0,05$

У здоровых взрослых испытуемых изменения μ -ритма при воображении движений носили многофазный характер с чередующимися фазами синхронизации и десинхронизации [14]. Смена чередовавшихся эпизодов десинхронизации/синхронизации μ - и α -ритмов отмечена также во время воображения движений у взрослых пациентов, проходящих процедуру реабилитации после инсульта с помощью роботизированной терапии [16]. Нельзя исключить, что поскольку в настоящей работе амплитуду ЭЭГ оценивали за весь период воображения движений, реакции связанной с событиями десинхронизации/синхронизации в значительной мере нивелировались.

Обращает на себя внимание и билатеральный паттерн реакций α -ритма при воображении движений. Рост или падение амплитуды указанного ритма были отмечены не только в контра-, но и в ипсилатеральном, по отношению к руке, полушарию, разгибание пальцев которой представлял испытуемый. Такие нетипичные двусторонние паттерны моторной активации у детей с ДЦП выявлены и другими авторами [21]. Указанная группа исследователей с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии оценивали активацию структур ЦНС при выполнении испытуемыми движений (сжатие пальцами мячика), а также регистрировали ответы мышц руки на транскраниальную магнитную стимуляцию. Результаты работы привели авторов к выводу, что более чем у половины обследованных детей, страдающих ДЦП, паретичную конечность контролирует либо ипсилатеральное, либо оба полушария. Такую необычную мозговую организацию можно расценивать как носящую компенсаторный характер и развивающуюся благодаря пластичности нервной системы после повреждения головного мозга в раннем возрасте.

Особенность настоящего исследования — участие в нем двух групп пациентов: с право- и левосторонним гемипарезом. Она позволило сравнить ЭЭГ-реакции предположительно относительно сохранного и серьезно поврежденного полушария при представлении движений

одной, левой или правой, рукой. В начале курса нейрореабилитации паттерны изменений α -ритма при воображении движений одноименных конечностей различались у детей указанных групп. Различия ИР достигали уровня статистической значимости в теменной области правого полушария (отведение P2). После прохождения тренингов степень различия показателей реактивности α -ритма при воображении движений рук у детей с лево- и правосторонним гемипарезом уменьшилась, что может свидетельствовать об определенных благоприятных перестройках активности ЦНС.

В основе таких изменений лежит прежде всего статистически значимое изменение паттерна реактивности ЭЭГ в частотной полосе α -ритма у пациентов с левосторонним гемипарезом к концу курса тренингов. Если во время первого сеанса при воображении движений паретичной рукой у детей этой группы заметную десинхронизацию (ИР более 0,25%) наблюдали только в одном отведении (Cz), то во время десятого сеанса — в шести отведениях обоих полушарий (см. рис. 1А). Хотя изменение паттерна реактивности ЭЭГ у детей с правосторонним гемипарезом к концу курса реабилитации не достигло уровня статистической значимости, у них также отмечался рост десинхронизации α -ритма. Если во время первого сеанса при воображении движений паретичной рукой десинхронизация отсутствовала во всех отведениях ЭЭГ, то во время завершающего сеанса она проявилась в шести отведениях, главным образом ипсилатерального полушария (см. рис. 2Б). Увеличение доли реакций связанной с событием десинхронизации α -ритма указывает на рост активации неокортекса у пациентов в результате курса нейрореабилитации [12–14]. Особый интерес представляет рост десинхронизации в отведении P2 (см. рис. 1А, Б). Сигнал ЭЭГ в данном отведении отражает активность нейронных сетей предклинья (precuneus) [22]. Предклинье отводит центральную роль в широком спектре высокоинтегрированных задач, включая

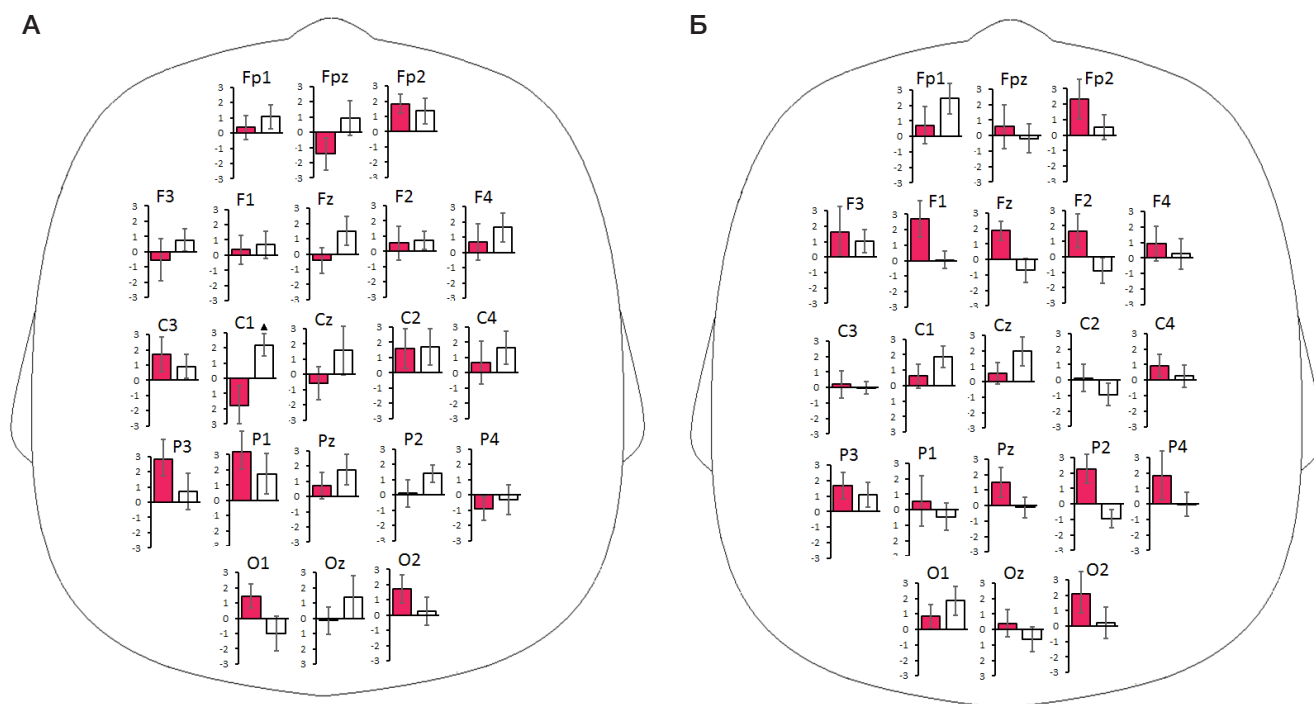


Рис. 2. Индексы реактивности α -ритма ЭЭГ в группе детей с левосторонним (А) и правосторонним (Б) гемипарезом при представлении движений правой рукой во время первого сеанса и завершающего, десятого сеанса курса реабилитации с использованием роботизированного комплекса. Обозначения те же, что для рис. 1

формирование пространственных образов движений и восприятие пространственной перспективы от первого лица [23]. Повышение степени активации данной области в результате курса нейрореабилитации может играть одну из ключевых ролей в оптимизации планирования и выполнения сложных движений руки у пациентов, улучшении бытовых навыков.

Усиление десинхронизации в ряде регионов неокортекса сопровождал рост связанной с событием синхронизации α -ритма в других корковых областях. Так, у детей с левосторонним гемипарезом во время завершающего сеанса заметно значительное увеличение амплитуды α -ритма при воображении разгибания пальцев паретичной руки в области первичной моторной (C2, C4) и премоторной коры (F2, F4). Мы рассматриваем такие изменения в частотной полосе α -ритма в указанных областях как свидетельство процесса активного торможения, направленного на предотвращение чрезмерного вовлечения пораженного контралатерального полушария в контроль двигательной активности ребенка.

Поскольку в результате курса нейрореабилитации у детей с ДЦП значительно улучшились двигательные функции [11], выявленные нами перестройки паттерна ЭЭГ в частотном диапазоне α -ритма можно рассматривать как проявление процессов благоприятной реорганизации нейронных цепей. Данное исследование носит во многом предварительный характер. Мы не можем исключить влияние на паттерн реактивности ЭЭГ факторов традиционного санаторно-курортного лечения. В дальнейшем планируется применить рандомизированный перекрестный дизайн для оценки влияния на реактивность α -ритма не только курса нейрореабилитации, но и указанных факторов, а также проанализировать связь

между показателями изменений ЭЭГ и улучшением у детей двигательных функций. Считаем, что настоящее и планируемые исследования помогут наметить новые подходы к повышению эффективности комплексного санаторно-курортного лечения.

ВЫВОДЫ

Нейрореабилитация детей, страдающих ДЦП, с применением комплекса «неинвазивный интерфейс мозг–компьютер и экзоскелет кисти» приводит не только к значимому улучшению характеристик движений верхних конечностей, но и к перестройке паттерна реактивности α -ритма пациентов при воображении движений рук. В начале курса нейрореабилитации паттерны изменений α -ритма при воображении движений одноименных конечностей у детей с лево- и правосторонним гемипарезом значительно различались. После прохождения тренингов степень различия показателей реактивности α -ритма у детей указанных групп уменьшилась, что может свидетельствовать об определенных благоприятных перестройках активности ЦНС. В основе таких изменений лежит прежде всего статистически значимое изменение паттерна реактивности ЭЭГ у пациентов с левосторонним гемипарезом. В целом у детей с лево- и правосторонним гемипарезом выявлено увеличение доли реакций связанной с событием десинхронизации α -ритма, что указывает на рост активации неокортекса в результате курса нейрореабилитации. Выявленные перестройки паттерна ЭЭГ в частотной полосе α -ритма могут быть рассмотрены как проявление усиления процессов пластичности нейронных цепей, контролирующих планирование и выполнение сложных движений рук у пациентов.

Литература

- Graham HK, Rosenbaum P, Paneth N, Dan B, Lin JP, Damiano DL, et al. Cerebral palsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 15082. DOI: 10.1038/nrdp.2015.82.
- Patel DR, Neelakantan M, Pandher K, Merrick J. Cerebral palsy in children: a clinical overview. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (Suppl 1): 125–35.
- Фролов А. А., Бобров П. Д. Интерфейс мозг–компьютер: нейрофизиологические предпосылки и клиническое применение. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2017; 67 (4): 365–76.
- Chiew M, LaConte S, Graham S. Investigation of fMRI neurofeedback of differential primary motor cortex activity using kinesthetic motor imagery. *NeuroImage*. 2012; 61 (1): 21–31.
- Котов С. В., Турбина Л. Г., Бобров П. Д., Фролов А. А., Павлова О. Г., Курганская М. Е. и др. Реабилитация больных, перенесших инсульт, с помощью биоинженерного комплекса «интерфейс мозг–компьютер + экзоскелет». *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2014; 114 (12–2): 66–72.
- Фролов А. А., Мокиенко О. А., Люкманов Р. Х., Черникова Л. А., Котов С. В., Турбина Л. Г. и др. Предварительные результаты контролируемого исследования эффективности технологии ИМК–экзоскелет при постинсультном парезе руки. *Вестник РГМУ*. 2016; 2: 17–25.
- Ponce P, Molina A, Balderas DC, Grammatikou D. Brain Computer Interfaces for Cerebral Palsy. In: E. Suraka, editor. *Cerebral Palsy challenges for the future*. London: IntechOpen, 2014; p. 245–72. DOI: 10.5772/57084.
- Jochumsen M, Shafique M, Hassan A, Niazi IK. Movement intention detection in adolescents with cerebral palsy from single-trial EEG. *J Neural Eng*. 2018; 15 (6): 066030. DOI: 10.1088/1741-2552/aae4b8.
- Daly I, Billinger M, Laparra-Hernández J, Aloise F, Lloria García M, Faller J, et al. On the control of brain-computer interfaces by users with cerebral palsy. *Clin Neurophysiol*. 2013; 124 (9): 1787–97.
- Kim T-W, Lee B-H. Clinical usefulness of brain-computer interface-controlled functional electrical stimulation for improving brain activity in children with spastic cerebral palsy: a pilot randomized controlled trial. *J Phys Ther Sci*. 2016; 28 (9): 2491–4.
- Ларина Н. В., Корсунская Л. Л., Власенко С. В. Комплекс «Экзокисть-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с использованием неинвазивного интерфейса «мозг–компьютер». *Нервно-мышечные болезни*. 2019; 11 (4): 12–20.
- Bazanov OM, Vernon D. Interpreting EEG alpha activity. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014; 44: 94–110.
- Pfurtscheller G, Brunner C, Schlögl A, Lopes da Silva FH. Mu rhythm (de)synchronization and EEG single-trial classification of different motor imagery tasks. *NeuroImage*. 2006; 31 (1): 153–9.
- Llanos C, Rodríguez M, Rodríguez-Sabate C, Morales I, Sabate M. Mu-rhythm changes during the planning of motor and motor imagery actions. *Neuropsychologia*. 2013; 51 (6): 1019–26.
- Klimesch W. Alpha-band oscillations, attention, and controlled access to stored information. *Trends Cogn Sci*. 2012; 16 (12): 606–17.
- Котов С. В., Романова М. В., Кондур А. А., Бирюкова Е. В., Фролов А. А., Турбина Л. Г. и др. Реорганизация биоэлектрической активности неокортекса после инсульта в результате реабилитации с использованием интерфейса «мозг–компьютер», управляющего экзоскелетом кисти. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*.

- 2020; 70 (2): 217–30.
17. Бобров П. Д., Коршаков А. В., Рошин В. Ю., Фролов А. А. Байесовский подход к реализации интерфейса мозг–компьютер, основанного на представлении движений. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2012; 62 (1): 89–99.
 18. Shin YK, Lee DR, Hwang HJ, You SJ, Im CH. A novel EEG-based brain mapping to determine cortical activation patterns in normal children and children with cerebral palsy during motor imagery tasks. *Neurorehabilitation*. 2012; 31 (4): 349–55.
 19. Inuggi A, Bassolino M, Tacchino C, Pippo V, Bergamaschi V, Campus C, et al. Ipsilesional functional recruitment within lower mu band in children with unilateral cerebral palsy, an event-related desynchronization study. *Exp Brain Res*. 2018; 236 (2): 517–27.
 20. Démas J, Bourguignon M, Pérvier M, De Tiège X, Dinomais M, Van Bogaert P. Mu rhythm: State of the art with special focus on cerebral palsy. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* [Internet]. 2019 June [cited 2019 July 9]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.06.007>.
 21. Weinstein M, Green D, Rudisch J, Benthem M, Zielinski IM, Jongsma MLA, et al. Understanding the relationship between brain and upper limb function in children with unilateral motor impairments: A multimodal approach. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018; 22 (1): 143–54.
 22. Koessler L, Maillard L, Benhadid A, Vignal JP, Felblinger J, Vespignani H, et al. Automated cortical projection of EEG sensors: Anatomical correlation via the international 10–10 system. *NeuroImage*. 2009; 46 (1): 64–72.
 23. Cavanna AE, Trimble MR. The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain*. 2006; 12 (30): 564–83.
- References**
1. Graham HK, Rosenbaum P, Paneth N, Dan B, Lin JP, Damiano DL, et al. Cerebral palsy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 15082. DOI: 10.1038/nrdp.2015.82.
 2. Patel DR, Neelakantan M, Pandher K, Merrick J. Cerebral palsy in children: a clinical overview. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (Suppl 1): 125–35.
 3. Frolov AA, Bobrov PD. Interfejs mozg–komp'juter: neirofiziologicheskie predposylki i klinicheskoe primeneniye. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova*. 2017; 67 (4): 365–76. Russian.
 4. Chiew M, LaConte S, Graham S. Investigation of fMRI neurofeedback of differential primary motor cortex activity using kinesthetic motor imagery. *NeuroImage*. 2012; 61 (1): 21–31.
 5. Kotov SV, Turbina LG, Bobrov PD, Frolov AA, Pavlova OG, Kurganskaja ME i dr. Reabilitacija bol'nyh, perenesshih insul't, s pomosh'h'ju bioizhenernogo kompleksa «interfejs mozg–komp'juter + jezkoskelet». *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. C. C. Korsakova*. 2014; 114 (12–2): 66–72. Russian.
 6. Frolov AA, Mokienko OA, Lyukmanov RKh, Chernikova LA, Kotov SV, Turbina LG et al. Preliminary results of a controlled study of BCI–exoskeleton technology efficacy in patients with poststroke arm paresis. *Bulletin of RSMU*. 2016; 2: 16–23.
 7. Ponce P, Molina A, Balderas DC, Grammatikou D. Brain Computer Interfaces for Cerebral Palsy. In: E. Suraka, editor. *Cerebral Palsy challenges for the future*. London: IntechOpen, 2014; p. 245–72. DOI: 10.5772/57084.
 8. Jochumsen M, Shafique M, Hassan A, Niazi IK. Movement intention detection in adolescents with cerebral palsy from single-trial EEG. *J Neural Eng*. 2018; 15 (6): 066030. DOI: 10.1088/1741-2552/aae4b8.
 9. Daly I, Billinger M, Laparra-Hernández J, Aloise F, Lloria García M, Faller J, et al. On the control of brain-computer interfaces by users with cerebral palsy. *Clin Neurophysiol*. 2013; 124 (9): 1787–97.
 10. Kim T-W, Lee B-H. Clinical usefulness of brain-computer interface-controlled functional electrical stimulation for improving brain activity in children with spastic cerebral palsy: a pilot randomized controlled trial. *J Phys Ther Sci*. 2016; 28 (9): 2491–4.
 11. Larina NV, Korsunskaya LL, Vlasenko SV. The “Exo hand-2” complex in the rehabilitation of the upper limb in cerebral palsy using the non-invasive interface “brain-computer”. *Neuromuscular diseases*. 2019; 11 (4): 12–20. Russian.
 12. Bazanova OM, Vernon D. Interpreting EEG alpha activity. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014; 44: 94–110.
 13. Pfurttscheller G, Brunner C, Schlögl A, Lopes da Silva FH. Mu rhythm (de)synchronization and EEG single-trial classification of different motor imagery tasks. *NeuroImage*. 2006; 31 (1): 153–9.
 14. Llanos C, Rodríguez M, Rodríguez-Sabate C, Morales I, Sabate M. Mu-rhythm changes during the planning of motor and motor imagery actions. *Neuropsychologia*. 2013; 51 (6): 1019–26.
 15. Klimesch W. Alpha-band oscillations, attention, and controlled access to stored information. *Trends Cogn Sci*. 2012; 16 (12): 606–17.
 16. Kotov SV, Romanova MV, Kondur AA, Biryukova EV, Frolov AA, Turbina LG i dr. Reorganizacija bioelektricheskoy aktivnosti neokorteksa posle insul'ta v rezul'tate reabilitacii s ispol'zovaniem interfejsa «mozg–komp'juter», upravljajushhego jezkoskeletom kisti. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova*. 2020; 70 (2): 217–30. Russian.
 17. Bobrov PD, Korshakov AV, Roshhin VYu, Frolov AA. Bajesovskij podhod k realizacii interfejsa mozg–komp'juter, osnovannogo na predstavlenii dvizhenij. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova*. 2012; 62 (1): 89–99. Russian.
 18. Shin YK, Lee DR, Hwang HJ, You SJ, Im CH. A novel EEG-based brain mapping to determine cortical activation patterns in normal children and children with cerebral palsy during motor imagery tasks. *Neurorehabilitation*. 2012; 31 (4): 349–55.
 19. Inuggi A, Bassolino M, Tacchino C, Pippo V, Bergamaschi V, Campus C, et al. Ipsilesional functional recruitment within lower mu band in children with unilateral cerebral palsy, an event-related desynchronization study. *Exp Brain Res*. 2018; 236 (2): 517–27.
 20. Démas J, Bourguignon M, Pérvier M, De Tiège X, Dinomais M, Van Bogaert P. Mu rhythm: State of the art with special focus on cerebral palsy. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* [Internet]. 2019 June [cited 2019 July 9]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.06.007>.
 21. Weinstein M, Green D, Rudisch J, Benthem M, Zielinski IM, Jongsma MLA, et al. Understanding the relationship between brain and upper limb function in children with unilateral motor impairments: A multimodal approach. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018; 22 (1): 143–54.
 22. Koessler L, Maillard L, Benhadid A, Vignal JP, Felblinger J, Vespignani H, et al. Automated cortical projection of EEG sensors: Anatomical correlation via the international 10–10 system. *NeuroImage*. 2009; 46 (1): 64–72.
 23. Cavanna AE, Trimble MR. The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain*. 2006; 12 (30): 564–83.

ТРОМБОГЕННОСТЬ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ НА ФОНЕ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИИ

М. М. Танашян¹, А. А. Шабалина¹ ✉, Е. В. Ройтман¹, Т. В. Вавилова², П. И. Кузнецова¹¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Проблема возникновения и возможные причины тромбогенности у пациентов с ишемическим инсультом (ИИ) на фоне истинной полицитемии (ИП) остается актуальной. Целью исследования было определить комплекс факторов, ассоциированных с формированием высокой тромбогенности у пациентов с ИИ на фоне ИП. Проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 127 пациентов в острейшем периоде ИИ и спустя 16–18 месяцев: 68 пациентов с ИИ на фоне истинной полицитемии ИП (основная группа) и 59 пациентов с ИИ без ИП (группа сравнения). Лабораторное обследование включало определение гемореологических параметров, показателей системы гемостаза, функции эндотелия, активности ангиогенеза, цитокинового и воспалительного ряда, молекулярно-генетическое исследование мутации V617F в гене *JAK2* и анализ вклада их изменений в развитие тромбгеморрагических осложнений. Обнаружено, что неврологическая картина в обеих группах была без значимых различий со средней оценкой по шкале NIHSS 12 и 13 баллов соответственно. Отмечены особенности морфофункциональных характеристик эритроцитов и тромбоцитов, а также гемостазиологического и цитокинового профиля у пациентов с ИИ на фоне ИП по сравнению с группой сравнения. Одним из ключевых элементов в потенцировании тромботических осложнений у пациентов с ИИ и ИП стала величина аллельной нагрузки мутации V617F в гене *JAK2*. Полученные данные свидетельствуют о совокупном действии комплекса факторов, формирующих высокую тромбогенность у перенесших ИИ пациентов с ИП и преодолевающих суммарный эффект антитромботической терапии.

Ключевые слова: ишемический инсульт, истинная полицитемия, тромбоз, гемореология, гемостаз, ангиогенез

Вклад авторов: М. М. Танашян — идеология и дизайн исследования, обсуждение результатов и редактирование рукописи; А. А. Шабалина — литературный обзор, сбор и анализ материала, статистическая обработка данных, обсуждение результатов; Е. В. Ройтман, Т. В. Вавилова — литературный обзор, обсуждение результатов; П. И. Кузнецова — описание клинического материала, обсуждение результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 1–4/18 от 07 февраля 2018 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на проведение обследований.

✉ **Для корреспонденции:** Алла Анатольевна Шабалина
Волоколамское шоссе, д. 80/1, г. Москва, 125367; shabalina@neurology.ru

Статья получена: 11.08.2020 **Статья принята к печати:** 25.08.2020 **Опубликована онлайн:** 31.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.052

THROMBOGENICITY IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE AND PRE-EXISTING POLYCYTHEMIA VERA

Tanashyan MM¹, Shabalina AA¹ ✉, Roitman EV¹, Vavilova TV², Kuznetsova PI¹¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia² Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Thrombogenicity and its causes in patients with ischemic stroke (IS) and pre-existing polycythemia vera (PV) is a significant clinical concern. The aim of this study was to identify the range of factors associated with increased thrombogenicity in patients with IS and pre-existing PV. We performed a physical examination and laboratory tests on 127 patients in the hyperacute stroke stage and 16–18 months after. Of them, 68 patients had PV (the main group) and 59 did not have this condition (the comparison group). Laboratory tests were conducted to evaluate blood rheology, hemostasis, endothelial function, angiogenesis, proinflammatory cytokine levels; we also tested patients for the presence of the V617F mutation in the *JAK2* gene and analyzed the contribution of all studied parameters to the development of thrombotic and hemorrhagic complications. We found that the neurological picture did not differ between the groups: mean NIHSS scores were 12 and 13 points, respectively. Morphological and functional characteristics of red blood cells and platelets, hemostasis and cytokine profiles were compared between patients with IS and pre-existing PV and the comparison group. One of the key elements in potentiating thrombotic complications in patients with IS and PV was *JAK2* V617F allele burden. The obtained data suggest the cumulative effect of the identified factors promoting thrombus formation in post-stroke patients with PV and overpowering the effect of antiplatelet therapy.

Keywords: ischemic stroke, polycythemia vera, thrombosis, blood rheology, hemostasis, angiogenesis

Author contribution: Tanashyan MM — study concept and design; discussion and manuscript preparation; Shabalina AA — literature analysis; data acquisition and statistical analysis; results discussion; Roitman EV, Vavilova TV — literature analysis; results discussion; Kuznetsova PI — patient histories; results discussion.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee (Protocol № 1–4/18 dated February 7, 2018). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alla A. Shabalina
Volokolamskoe shosse, 80/1, Moscow, 125367; shabalina@neurology.ru

Received: 11.08.2020 **Accepted:** 25.08.2020 **Published online:** 31.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.052

Гетерогенность ишемического инсульта (ИИ) объединяет единый механизм — нарушение микро- и макроциркуляции в кровоснабжающих головной мозг сосудах. Развитие тромбоза — многокомпонентный процесс, включающий в себя нарушения гемореологии, снижение антитромботических свойств эндотелия, активацию системного воспалительного ответа и дисрегуляцию параметров системы гемостаза [1, 2]. Нередко нарушения

мозгового кровообращения (НМК) могут протекать на фоне Ph-негативных миелопрлиферативных заболеваний (МПЗ) [3, 4]. Одним из подтипов Ph-негативных МПЗ, приводящих к тяжелым и частым тромбгеморрагическим осложнениям, в том числе и НМК, является истинная полицитемия (ИП) — заболевание крови, возникающее на уровне стволовой кроветворной клетки, характеризующееся усиленной пролиферацией в костном мозге с признаками сохранной

терминальной дифференцировки и сопровождающееся стойким увеличением количества эритроцитов и гемоглобина в периферической крови [5, 6].

При ИП субстратом для опухоли служат зрелые эритроциты, зачастую также имеются признаки пролиферативного процесса гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков костного мозга. Частота эритремии составляет 0,6–2,8 на 100 тыс. населения и в последние годы есть тенденция к ее увеличению. Этиология развития ИП до сих пор остается неясной, основной причиной считают воздействие окружающей среды и других внешних факторов, повреждающих геном нормальной клетки. В 2005 г. открытие мутации V617F в гене *Jak2* существенно расширило представления о патогенезе и биологических особенностях ИП, при которой данная мутация встречается более чем в 98% случаев и входит в диагностические критерии при постановке диагноза. [7–9].

На сегодняшний день ИП — не только заболевание системы крови, но и ангиологическая проблема ввиду возможности развития различных тромботических, геморрагических, в том числе церебральных осложнений. Одним из частых проявлений патологии сосудистой системы у больных ИП является артериальная гипертензия (АГ), встречающаяся в 60–80% случаях и возникающая на любом этапе заболевания, в том числе в период клинико-гематологической ремиссии ИП [10–12].

К наиболее опасным и частым сосудистым осложнениям у пациентов с ИП относят артериальные и венозные тромбозы, локальные и множественные геморрагии и кровотечения, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Клинически они проявляются инсультами, инфарктом миокарда, тромбозами глубоких вен или тромбозом легочной артерии [13]. Пациенты с ИП обладают в среднем в два раза более высоким риском окклюзирования сосудов [14]. Развивающиеся тромбозы вен нижних конечностей сопровождаются явлениями воспаления, отека и гиперемии кожи (по типу тромбоза). Тромбоз в системе воротной вены приводит к развитию синдрома портальной гипертензии с нарастанием спленомегалии, варикозным расширением вен пищевода, асцитом, развитием синдрома Бадда-Киари [15, 16].

В развитие тромбоза при ИП вовлечено несколько факторов: повышение гематокрита, эритроцитоз, тромбоцитоз, нарушение фибринолитической активности, активация лейкоцитов, эндотелиальные повреждения, взаимодействие тромбоцитов и эндотелия, наличие мутации V617F в гене *JAK2*, различные формы терапии и повышение в целом вязкости крови [17]. Последнее рассматривают в качестве ведущего фактора. Имеющиеся публикации о роли гемостазиологических, гемореологических и микроциркуляторных факторов в развитии тромботических осложнений у пациентов с ИП оставляют открытыми вопросы их развития и профилактики среди пациентов с сочетанной коморбидной патологией — ишемическим инсультом и ИП [18–20]. В связи с вышеизложенным целью исследования было изучить комплекс факторов, ассоциированных с формированием высокой тромбогенности у пациентов с ИП на фоне ИП.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовали 127 больных с первичным ИП: 68 пациентов с ИП на фоне ИП (I группа, основная) и 59 пациентов с

ИИ без ИП (II группа, сравнения), статистически не различавшихся по полу и возрасту.

Критерии включения пациентов: 1) возраст 42–75 лет; 2) острый период инсульта и спустя 16–18 месяцев (медиана 17,3 месяца (95%-й ДИ 16,4–18,3)); 3) подтверждение ИИ нейровизуализационными данными, ИП — в соответствии с критериями ВОЗ (по классификации TOAST ИИ соответствовал инсультам «другой уточненной этиологии» [21]); 4) прием пациентами с ИП до наступления ИИ и в ходе наблюдения циторедуктивных препаратов (препараты гидроксимочевины или интерферон альфа в комбинации с антитромботической терапией (ацетилсалициловой кислотой); 5) проведение эритроцитозфереза у всех пациентов с ИП с частотой 2–6 процедур в год.

Среди обследованных пациентов преобладали женщины (I группа — 64%; II группа — 67%). Страдающие сахарным диабетом и курящие пациенты реже встречались в группе исследования, дислипидемия выявлена у 25% пациентов с изолированным ИИ и только у 3% больных основной группы.

Клиническое обследование включало оценку общесоматического и неврологического состояния по шкале NIHSS, индекса Бартел (при поступлении), модифицированную шкалу Рэнкин (через 1,5 года). Лабораторное обследование включало:

1) общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы на гематологическом анализаторе (Nihon Kohden MEK-7222; Япония);

2) исследование реологических свойств эритроцитов (амплитуды агрегации (Amp, у. е.); времени образования монетных столбиков (Tf, с) и трехмерных агрегатов (Ts, с); индекса агрегации (AI, у. е.); скорости полной дезагрегации (Y-dis, у. е.) — показателя силы, необходимой для разрушения эритроцитарных агрегатов и деформирования эритроцитов (Dlmax, у. е.) с помощью лазерного агрегометра эритроцитов (LORRCA, Mechatronics; Нидерланды);

3) исследование параметров гемостаза и функции эндотелия (АДФ-, адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (АДФ-Адр-АТ, %), ристоцитин-кофакторную активность фактора Виллебранда (РКА-VWF, %) с использованием агрегометра («Биола»; Россия) и реагентов РЕНАМ (РЕНАМ; Россия); концентрацию фибриногена (ФГ, г/л), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), протромбиновое время (с) с выражением результатов в виде международного нормализованного соотношения (МНО), содержание D-димера (нг/мл), активности протеинов С (РС, %) и S (ПС, %), фактора Виллебранда (А — VWF, %), плазменных факторов свертывания крови V, VII, VIII, XII (%), антитромбина III (АТ III, %), плазминогена (PLG, %), а2-антиплазмина (PL-IN, %) и фактор Виллебранда антиген (VWF, %) с использованием коагулометра ACL Elite Pro (Instrumentation Laboratory; США), реагентов IL (IL; США) и РЕНАМ (РЕНАМ; Россия);

4) определение цитокинов, маркеров воспаления, функции эндотелия и показателей активности ангиогенеза: сосудистого эндотелиального фактора роста -A (VEGF-A, пг/мл), фактора роста фибробластов β (FGFβ, пг/мл), трансформирующего фактора роста β (TGFβ1, пг/мл), тканевого активатора плазминогена (t-PA, нг/мл), ингибитора тканевого активатора плазминогена (PAI-1, нг/мл), тканевого фактора (TF, пг/мл), металлопротеиназы ADAMTS-13 (мкг/мл), растворимого тромбомодулина (рТМ, нг/мл), молекул межклеточной адгезии sICAM и sVCAM, активируемого тромбином ингибитора фибринолиза

(TAFI, %), фактора некроза опухоли α (TNF α , пг/мл), интерлейкинов IL1 β и IL6 (пг/мл), эндотелина-1 (пг/мл), оксида азота (NO, мкмоль/л) с помощью метода ELISA и наборов реагентов фирм eBioscience Bender MedSystems (Австрия), Technoclonе (Австрия), Cloud Clone Corporation (США, Китай), R&D Systems (США, Китай), Cayman Ataxia (Индия), «Вектор-Бест» (Россия), Sekisui Diagnostics (American Diagnostica; США);

5) количественное молекулярно-генетическое исследование мутации V617F в гене JAK2 с использованием тест-системы («ГеноТехнология»; Россия) на амплификаторе Real-time DT-Lite («ДНК-Технология»; Россия).

Статистический анализ проводили с помощью IBMSPSS 23.0 и R 3.4.3 (IBM Company; США). Описательную статистику для категориальных и порядковых переменных представляли как частоту и долю (%) встречаемости данных категорий. Для нормально распределенных количественных данных статистику представляли как среднее значение (M) и стандартное отклонение. Для ненормального распределения использовали медиану (Md) и значения 25%-го нижнего и 75%-го верхнего квартилей (Q 25%–75%). Для сравнения групп использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующими попарными сравнениями по Манну–Уитни. Для оценки взаимосвязи показателей между собой использовали корреляционный анализ Пирсона. Анализ рисков проводили по критерию хи-квадрат (χ^2) с использованием таблиц сопряженности и расчетом отношения шансов. Факторный анализ проводили методом главных компонент корреляционной матрицы с учетом веса компонента более единицы и векторного влияния переменной в факторном комплексе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Неврологическая картина в обеих обследованных группах при поступлении в стационар была практически одинаковой, средняя оценка по шкале NIHSS составила 12 (5,0; 20,0) и 13 баллов (5,0; 20,0) соответственно.

Тяжелая степень неврологических нарушений при ИИ была выявлена у 16 больных с ИП (24%) и достоверно реже — у 11 (19%) пациентов без ИП, средняя степень тяжести определена у 33 больных с ИП (50%) и достоверно чаще — у 36 больных (61%) без гематологической патологии. У 17 больных с ИП (26%) и у 12 без ИП (20%) течение заболевания трактовали как легкое, оно было представлено негрубыми чувствительными расстройствами. Оценка по индексу Бартел значительно не различалась между группами и составила 70 (59; 76) баллов в I группе и 72 (62; 75) балла во II.

У большинства больных основным неврологическим признаком в картине ИИ был пирамидный синдром: грубые гемипарезы и гемиплегии с чувствительными расстройствами выявлены у 27 и 29% пациентов соответственно в I и II группах.

Нарушения речи в виде различных форм афазий (тотальная, сенсорная, моторная, смешанная) и корковой дизартрии выявлены в обеих группах пациентов практически в равной степени — у 45 (66%) пациентов в основной группе и у 38 (60%) больных в группе сравнения. Достоверных различий между группами пациентов по основным неврологическим симптомам в остром периоде НМК выявлено не было.

Анализ динамики неврологических нарушений от конца острого периода ИИ до повторного обследования через 1,5 года показал, что у пациентов с ИП частота двигательных,

чувствительных и речевых расстройств снизилась на 14, 20 и 25% соответственно, по субъективной симптоматике выявлено отсутствие снижения частоты головной боли и незначительное уменьшение астенического синдрома. Функциональное восстановление через 16–18 месяцев после развития ИИ согласно модифицированной шкале Рэнкин было хорошим (0–1 балл) у 18 пациентов (27%), удовлетворительным (2–3 балла) — у 26 пациентов (38%) и плохим (4–5 баллов) — у 24 пациентов (35%).

Исследование клеточных и реологических профилей крови обследованных пациентов в остром периоде ИИ показало, что у больных с ИП уровни тромбоцитов (613 против $271 \times 10^9/\text{л}$), эритроцитов ($5,8$ против $3,8 \times 10^{12}/\text{л}$), лейкоцитов ($12,6$ против $8,7 \times 10^9/\text{л}$), гемоглобина (174 против 119 г/л) и гематокрита ($49,5$ против $38,7\%$) значительно повышены в сочетании с низкой СОЭ (5 против 23 мм/ч), и ухудшены все исследуемые морфофункциональные характеристики эритроцитов по сравнению с больными ИИ без сопутствующей гематологической патологии, причем такие показатели, как индекс агрегации, амплитуда агрегации ($12,8$ и $9,3$ у. е.; $p = 0,003$) и скорость полной дезагрегации, отражающая плотность эритроцитарных агрегатов (570 и 224 у. е.; $p = 0,000$), были значительно увеличены при сниженной деформируемости эритроцитов ($0,34$ и $0,41$ у. е. соответственно; $p = 0,000$). Выявлено также, что уровни цитокинов, факторов роста FGF β ($735,5$ против $497,1$ пг/мл), VEGF-A ($1257,6$ против $568,4$ пг/мл), TGF β 1 (1824 против 710 пг/мл; $p = 0,000$) и значения показателей, характеризующих активность ангиогенеза, с высокой степенью достоверности были выше у больных с ИП.

Сравнение гемостазиологических картин у обследованных пациентов с ИИ и с ИИ на фоне ИП представлено на рис. 1.

У пациентов с ИП отмечены более высокая концентрация фибриногена, р-тромбомодулина, активность TAFI и TF и активность фактора свертывания VII, снижение количества и активности VWF, ATIII и ADAMTS-13 по сравнению с группой пациентов без ИП. В группе сравнения выявлена более высокая активность фактора свертывания VIII и более высокий уровень D-димеров при сниженной концентрации PLG, tPA и повышенного PAI-1.

С целью анализа влияния аллельной нагрузки мутации V617F в гене JAK2 на тромбогенный потенциал в остром периоде ИИ был проведен факторный анализ со снижением размерности и выводом показателей, имеющих не менее чем средней силы векторное влияние в компоненте (аллельная нагрузка мутации V617F гена JAK2 принята как ведущая переменная с наиболее сильным векторным влиянием). Выявлено 10 лабораторных показателей с наибольшей взаимосвязью с величиной аллельной нагрузки этой мутации (табл. 1).

Показано, что наибольшее влияние высокая аллельная нагрузка мутации V617F гена JAK2 оказывает на снижение деформируемости эритроцитов и увеличение активности фактора свертывания крови VII. Далее в убывающей частоте высокая аллельная нагрузка мутации V617F в гене JAK2 ассоциирована с активацией патологического ангиогенеза через VEGF-A и TGF β , и связана с высоким уровнем тромбоцитов в сочетании с изменением их агрегационных свойств и дисфункцией эндотелия.

При повторном клиническом обследовании пациентов (через 16–18 месяцев) была проведена оценка частоты развития и видов тромбогеморрагических осложнений, произошедших в течение этого срока (табл. 2).

Количество развившихся тромботических, геморрагических и смешанных осложнений в основной

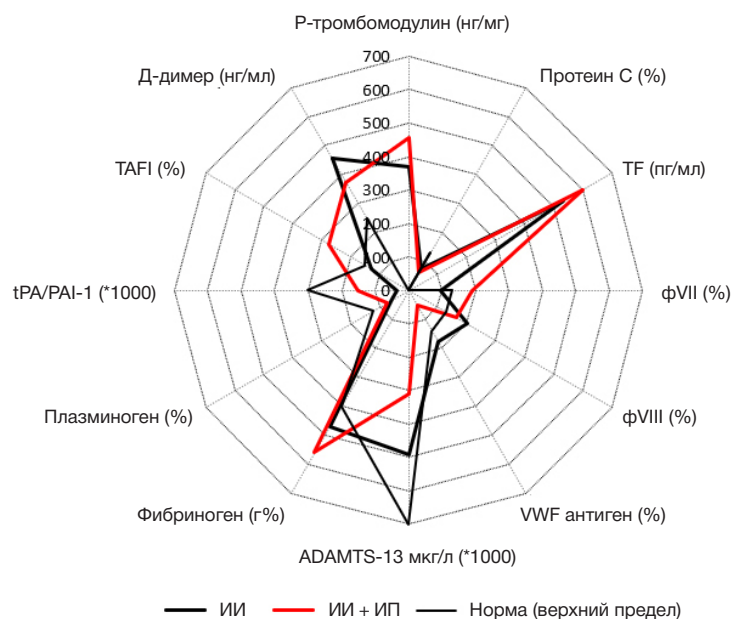


Рис. 1. Гемостазиологические картины обследованных пациентов в остром периоде ИИ. Значения ADAMTS-13, концентрации фибриногена и соотношения tPA/PAI-1 представлены кратно для возможности демонстрации в единой картине с другими показателями

группе явно преобладало, причем одним из ключевых элементов в потенцировании тромботических осложнений у пациентов с ИП (преимущественно в виде повторных НМК) была аллельная нагрузка мутации V617F в гене *JAK2* (табл. 3).

Отношения шансов для прогноза повторных ишемических НМК в отдаленном периоде величины аллельной нагрузки мутации V617F гена *JAK2* в остром периоде с пороговым значением 48% составили 2,9 раза (95% ДИ 2,0–3,3).

Среди гемореологических факторов риска развития повторных тромботических осложнений (в отдаленном периоде инсульта) следует отметить снижение скорости полной дезагрегации эритроцитов (yDis) с 570 до 498 у. е. ($p = 0,017$), повышение концентрации эндотелина-1 с 4,6 до 5,2 пг/мл и молекул адгезии sVCAM-1 ($p = 0,008$) и sICAM-1 ($p = 0,007$). Усиление нарушения на уровне микроциркуляторного русла могло быть одновременно как следствием, так и причиной увеличения воспалительных реакций, отразившихся в нарастании IL6 от $13,5 \pm 0,69$ пг/мл до $15,2 \pm 0,7$ пг/мл ($p = 0,034$).

Было также отмечено практически полное отсутствие различий гемостазиологических картин у данных пациентов в остром и в отдаленном периодах после ИИ (рис. 2).

Таблица 1. Корреляционная матрица факторного анализа влияния аллельной нагрузки мутации V617F гена *JAK2* на лабораторные показатели у пациентов с ИП в остром периоде инсульта

	Лабораторные показатели	Компонента
	Аллельная нагрузка мутации V617F гена <i>JAK2</i>	0,722
1	Деформируемость эритроцитов (Dlmax), у. е.	0,492
2	Фактор VII, %	0,464
3	VEGF-A, пг/мл	0,425
4	ADAMTS-13, мкг/л	0,412
5	TGF- β 1 пг/мл	0,398
6	АДФ-АТ, %	0,367
7	Уровень тромбоцитов (10^9 /л)	0,354
8	Уровень лейкоцитов (10^9 /л)	0,341
9	VWF активность, %	0,323
10	t-PA, нг/мл	0,318

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гемостатический гомеостаз регулируется соотношением тромбогенных и антитромбогенных соединений. При нарушении их баланса в сторону секреции тромбогенных веществ развивается тромбоз. Поэтому важно отследить те или иные причины, условия и наличие факторов тромбогенного риска, при которых чаще всего возникали и повторялись тромбозы у данной категории пациентов. Иначе говоря, у пациентов с ИИ на фоне ИП необходимо выявить состояние предтромбоза или так называемое «состояние тромботической готовности» [21], способное объединить в себе лабораторные маркеры тромбогенности и клинические признаки предтромбоза. Именно реализация этой готовности при сохраняющихся факторах тромбогенного риска и их сочетании с высокой вероятностью способна проявиться повторными НМК и тромбозами различной локализации.

Согласно триаде Вирхова, одной из патогенетических причин тромбоза могут быть изменения характеристик потока крови, способные послужить триггером для развития тромботических осложнений.

Следует отметить, что пациенты с ИП как до наступления ИИ, так и в периоде наблюдения, принимали

Таблица 2. Тромбогеморрагические осложнения у пациентов обследованных групп, выявленные при повторном обследовании через 16–18 месяцев после ИИ

Группы	ИИ + ИП (n = 68)	ИИ (n = 59)
Осложнения		
Тромботические осложнения (n)	28	18
– ишемические НМК	16	10
– тромбоз вен нижних конечностей	12	8
– ТЭЛА	0	0
Геморрагический синдром (n)	20	нд
– кровотечения носовые, десневые, подкожные, геморроидальные	18	нд
– кровотечения ЖКТ	2	1
Сочетание тромбогеморрагических осложнений	7	0

Примечание: нд — нет данных.

специфическую циторедуктивную терапию (препараты гидроксимочевины или IFN α). С одной стороны, это можно рассматривать как дополнительный фактор риска развития ИИ и тромботических осложнений у этой категории пациентов. С другой стороны, тот факт, что пациенты получали циторедуктивную терапию как до ИИ, так и после него, а анализ вероятности различия исследуемых показателей от влияния и особенностей данного вида лечения не выявил статистически значимых различий, позволяет связывать изменения изучаемых лабораторных показателей с течением и последствиями ИИ на фоне ИП.

У пациентов в острейшем периоде ИИ при значительном увеличении числа всех клеток крови выявляются специфические нарушения функциональных и морфологических свойств эритроцитов, связанные с изменением пластичности их мембран и характеризующиеся значительным снижением их деформируемости и увеличением прочности образующихся агрегатов.

В целом, в острейшем периоде ИИ для обеих групп уместно говорить о наличии множественных признаков поражения сосудистой стенки и эндотелиопатии с формированием протромботического фенотипа эндотелия. Это выражается прежде всего в том, что в обеих группах пациентов с ИИ депрессия активности протеина С не была компенсирована тромбомодулином, который, как известно, в норме связан с мембраной эндотелиоцитов и практически отсутствует в циркуляции. В свою очередь, его появление в кровотоке говорит о значительном повреждении эндотелиальных клеток.

Пациенты с ИИ и ИП продемонстрировали большую зависимость формирования тромбогенного потенциала от тканевого фактора и фактора VII, тогда как для пациентов только с ИИ более существенную роль в этом сыграл баланс между vWF, фактором VIII и ADAMTS-13. Тем не менее воспалительную реакцию можно рассматривать как инициатор высокой тромбогенности именно у пациентов коморбидной группы, о чем свидетельствовали меньшая активность антитромбина III, более высокая концентрация фибриногена, а также более высокое содержание исследуемых цитокинов и факторов роста. Кроме

того, можно полагать, что воспалению, несомненно, способствовал присущий миелопролиферативному процессу комплекс факторов — наличие нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), свободной ДНК в кровотоке и др. [22]. Поэтому выявленные у пациентов с ИИ на фоне ИП более высокие значения тканевого фактора и фактора VII следует рассматривать в качестве вторично развившихся признаков эндотелиопатии.

В качестве механизма компенсации подобного состояния традиционно рассматривают фибринолиз, который был очевидно депрессирован у пациентов обеих групп. Прежде всего, это проявилось в снижении резервов плазминогена, дефиците tPA и преобладающей активности ингибиторов фибринолиза. При этом избыточная генерация тромбина вследствие воспаления у пациентов ИИ с ИП также способствовала депрессии фибринолиза за счет отчетливого увеличения активности TAFI.

Существенную роль в развитии тромботических осложнений (преимущественно в виде повторных НМК) играет аллельная нагрузка мутации V617F в гене JAK2, величина которой также ассоциируется со снижением функциональных свойств эритроцитов, с активацией патологического ангиогенеза, с увеличением числа тромбоцитов и изменением их функциональных свойств в сочетании с дисфункцией эндотелия.

Данные результаты свидетельствуют, что у пациентов с ИИ на фоне ИП тромбогенность обусловлена именно гематологическим заболеванием, а факт сохранения такого действующего фактора риска, как миелопролиферативный процесс, оказался достаточным для развития тромботических осложнений, несмотря на проводимую антитромботическую и циторедуктивную терапию. За полтора года наблюдения выраженность эндотелиопатии, степень напряженности гемокоагуляционных реакций, фибринолитический ответ у пациентов с ИП и перенесенным ИИ не претерпели существенных изменений, и ситуация с высокой системной тромбогенностью не улучшилась. Учитывая высокую значимость для жизни пациентов возникновения тромбозов артериального или венозного русла важно не только совершенствование методов диагностики и лечения сосудистой ишемии, но и

Таблица 3. Значения коэффициентов корреляции уровня аллельной нагрузки мутации V617F гена JAK2 с тромботическими осложнениями в отдаленном периоде

	Коэффициент корреляции Пирсона
Все тромботические осложнения, из них	0,236 ($p < 0,05$)
– ишемические НМК	0,241 ($p < 0,05$)
– тромбоз вен нижних конечностей	0,124
– сочетание тромботических и геморрагических осложнений	0,116

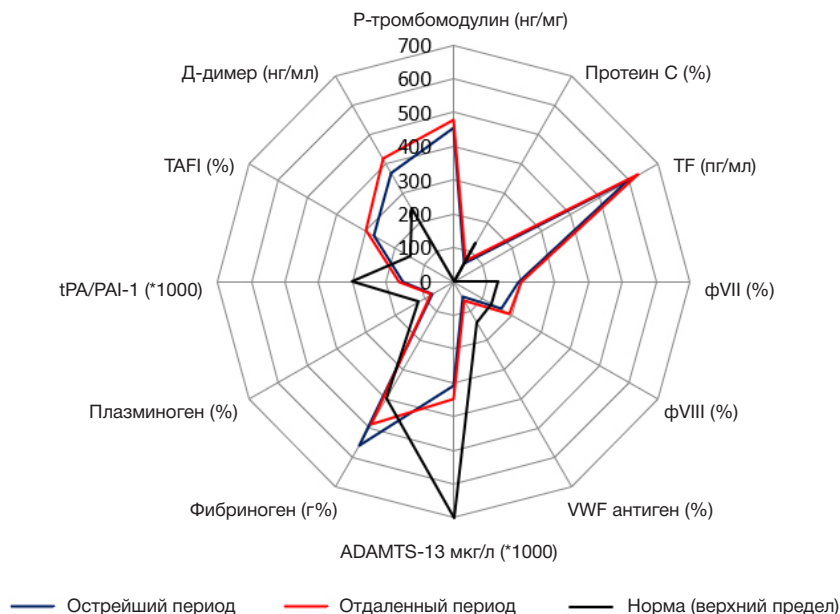


Рис. 2. Гемостазиологическая картина пациентов основной группы в острейшем и в отдаленном периодах после ИИ

предупреждение повторных сосудистых эпизодов. Эти данные дают основание для необходимости: 1) продолжения исследований по изучению патогенеза тромбозности / тромбоза при МПЗ; 2) изменения алгоритмов диагностики и схем стандартной антитромботической профилактики у таких больных в сторону ее персонализации и мониторинга гемостаза.

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют о том, что совокупное действие всего комплекса факторов,

формирующих высокую тромбозность у пациентов с ИИ на фоне ИП, преодолевает суммарный эффект антитромботической терапии. Это происходит вследствие сохранения практически всех протромботических условий, обусловленных воспалением и проявляющихся в виде гемореологических нарушений, эндотелиопатии, тромбинемии и депрессии фибринолиза. Тем самым еще раз подтверждаются постулаты о том, что коморбидность требует индивидуального и патогенетически обоснованного подбора средств длительной антитромботической терапии и профилактики повторных сосудистых эпизодов.

Литература

- Суслина З. А., Танашян М. М., Ионова В. Г. Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия. М.: Медицинская книга, 2005; 248 с.
- Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke. *BMJ*. 2020; 368: i6983. Published 2020 Feb 13. DOI: 10.1136/bmj.i6983.
- Танашян М. М., Меликян А. Л., Кузнецова П. И., Раскуражев А. А., Шабалина А. А., Коновалов Р. Н. Изменения вещества головного мозга при Ph-негативных миелолифериативных заболеваниях. *Терапевтический архив*. 2019; 91 (7): 29–34.
- Asakura H. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *The Japanese Journal of Clinical Hematology*. 2018; 59 (8): 1034–41. DOI: 10.11406/rinketsu.59.1034.
- Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017; 92 (1): 94–108. DOI: 10.1002/ajh.24607.
- Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018; 8 (2): 15. Published 2018 Feb 9. DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y.
- Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol*. 2016; 9: 18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0242-9>.
- Moulard O, Mehta J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of Myelofibrosis (MF), Polycythemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) in the European Union (EU). *Blood*. 2012; 120 (21): 1744. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.1744.1744>.
- Волкова М. А., редактор. Клиническая онкогематология: руководство для врачей. М.: Медицина, 2007; 1144 с.
- Козлова Н. С., Бакшеев М. Г., Давыдкин И. Л. Особенности нарушений микроциркуляции у больных истинной полицитемией в сочетании с артериальной гипертензией. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2015; 17 (2): 319–322.
- Давыдкин И. Л., Щукин Ю. В., редакторы. Поликлиническая терапия: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 688 с.
- Рукавицын О. А., редактор. Гематология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015; 776 с.
- Kwaan HC, Wang J. Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin Thromb Hemost*. 2003; 29 (5): 451–8.
- Fujioka S. Rheological study on vascular occlusion and cellular hyperviscosity syndrome in polycythemia vera. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*. 1989; 52 (4): 688–95.
- Pratesi A, Vella A, Pasini E, Salvi F, Mascalchi M. Parkinsonism in polycythemia vera probably due to manganism. *Mov Disord*. 2008; 23 (16): 2420–1. DOI: 10.1002/mds.22319.
- Cerquozzi S, Barraco D, Lasho T, et al. Risk factors for arterial versus venous thrombosis in polycythemia vera: a single center experience in 587 patients. *Blood Cancer J*. 2017; 7 (12): 662. Published 2017 Dec 27. DOI: 10.1038/s41408-017-0035-6.

17. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Masciulli A, Mennitto MR, Barbui T. The CYTO-PV: A Large-Scale Trial Testing the Intensity of CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera. *Thrombosis*. 2011; 2011 (1): 1–9. DOI: 10.1155/2011/794240.
18. Frederiksen H, Szépligeti S, Bak M, Waleed G, Hasselbalch HC, Christiansen CF. Vascular Diseases In Patients With Chronic Myeloproliferative Neoplasms — Impact Of Comorbidity. *Clinical Epidemiology*. 2019; 11: 955–67. Available from: <https://doi.org/10.2147/CLEP.S216787>, 2019.
19. Танашян М. М., Кузнецова П. И., Суборцева И. Н., Шабалина А. А., Лагода О. В., Меликян А. Л. Хроническая и острая цереброваскулярная патология при рh-негативных миелолипролиферативных заболеваниях. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61 (3): 146–50.
20. Marton I, Pósfai É, Csomor A, Vécsei L, Borbényi Z, Sas K. Cerebrovascular Complications and Polycythemia Vera. *Pathol Oncol Res*. 2019; 25 (1): 439–42. DOI: 10.1007/s12253-017-0329-9.
21. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35.
22. Момот А. П. Проблема тромбофилии в клинической практике. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2015; 1: 37–48.

References

1. Suslina ZA, Tanashjan MM, Ionova VG. Ishemicheskij insul't: krov', sosudistaja stenka, antitromboticheskaja terapija. M.: Medicinskaja kniga, 2005; 248 s. Russian.
2. Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke. *BMJ*. 2020; 368: i6983. Published 2020 Feb 13. DOI: 10.1136/bmj.i6983.
3. Tanashyan MM, Melikyan AL, Kuznetsova PI, Raskurazhev AA, Shabalina AA, Kononov RN. Brain MRI-findings in Ph-negative myeloproliferative disorders. *Terapevticheskii Arkhiv*. 2019; 91 (7): 29–34. Russian.
4. Asakura H. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *The Japanese Journal of Clinical Hematology*. 2018; 59 (8): 1034–41. DOI: 10.11406/rinketsu.59.1034.
5. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017; 92 (1): 94–108. DOI: 10.1002/ajh.24607.
6. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018; 8 (2): 15. Published 2018 Feb 9. DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y.
7. Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol*. 2016; 9: 18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0242-9>.
8. Moulard O, Mehta J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of Myelofibrosis (MF), Polycythemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) in the European Union (EU). *Blood*. 2012; 120 (21): 1744. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.1744.1744>.
9. Volkova MA, redaktor. *Klinicheskaja onkogematologija: rukovodstvo dlja vrachej*. M.: Medicina, 2007; 1144 s. Russian.
10. Kozlova NS, Baksheev MG, Davydkin IL. Osobennosti narushenij mikrocirkuljacii u bol'nyh istinnoj policitemiej v sochetanii s arterial'noj gipertenziej. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN*. 2015; 17 (2): 319–22. Russian.
11. Davydkin IL, Shhukin YuV, redaktory. *Poliklinicheskaja terapija: uchebnik*. M.: GJeOTAR-Media, 2013; 688 s. Russian.
12. Rukavicyan OA, redaktor. *Gematologija: nacional'noe rukovodstvo*. M.: GJeOTAR-Media, 2015; 776 s. Russian.
13. Kwaan HC, Wang J. Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities. *Semin Thromb Hemost*. 2003; 29 (5): 451–8.
14. Fujioka S. Rheological study on vascular occlusion and cellular hyperviscosity syndrome in polycythemia vera. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*. 1989; 52 (4): 688–95.
15. Pratesi A, Vella A, Pasini E, Salvi F, Mascalcchi M. Parkinsonism in polycythemia vera probably due to manganism. *Mov Disord*. 2008; 23 (16): 2420–1. DOI: 10.1002/mds.22319.
16. Cerquozzi S, Barraco D, Lasho T, et al. Risk factors for arterial versus venous thrombosis in polycythemia vera: a single center experience in 587 patients. *Blood Cancer J*. 2017; 7 (12): 662. Published 2017 Dec 27. DOI: 10.1038/s41408-017-0035-6.
17. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Masciulli A, Mennitto MR, Barbui T. The CYTO-PV: A Large-Scale Trial Testing the Intensity of CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera. *Thrombosis*. 2011; 2011 (1): 1–9. DOI: 10.1155/2011/794240.
18. Frederiksen H, Szépligeti S, Bak M, Waleed G, Hasselbalch HC, Christiansen CF. Vascular Diseases In Patients With Chronic Myeloproliferative Neoplasms — Impact Of Comorbidity. *Clinical Epidemiology*. 2019; 11: 955–67. Available from: <https://doi.org/10.2147/CLEP.S216787>, 2019.
19. Tanashjan MM, Kuznecova PI, Suborceva IN, Shabalina AA, Lagoda OV, Melikjan AL. Hronicheskaja i ostraja cerebrovaskuljarnaja patologija pri ph-negativnyh mieloproliferativnyh zabolevanijah. *Gematologija i transfuziologija*. 2016; 61 (3): 146–50. Russian.
20. Marton I, Pósfai É, Csomor A, Vécsei L, Borbényi Z, Sas K. Cerebrovascular Complications and Polycythemia Vera. *Pathol Oncol Res*. 2019; 25 (1): 439–42. DOI: 10.1007/s12253-017-0329-9.
21. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41. DOI: 10.1161/01.str.24.1.35.
22. Momot AP. Problema trombofilii v klinicheskoi praktike. *Rossiiskij zhurnal detskoj gematologii i onkologii*. 2015; 1: 37–48.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФЛУКОНАЗОЛА С АЛАНИНОМ, ЛИЗИНОМ И ТРЕОНИНОМ

В. В. Чаговец ✉, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич

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

Изучение механизмов действия препаратов триазола и понимание молекулярной основы их аффинности и специфичности может быть использовано для рациональной разработки новых лекарственных средств. Целью работы было изучить комплексы представителя класса триазолов флуконазола с аминокислотами с помощью масс-спектрометрии, молекулярной динамики и квантово-химических *ab initio* расчетов. В ходе экспериментального исследования с помощью масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией и tandemной масс-спектрометрии были проанализированы растворы флуконазола, аланина, лизина и треонина. Молекулярно-динамическое моделирование комплексов флуконазола с аминокислотами проводили с использованием силового поля CHARMM. Квантово-химические расчеты структуры и энергетических параметров комплексов проводили на уровне теории функционала плотности с использованием функций B3LYP с базисом 3-21G и 6-311++G**. Масс-спектры показали, что флуконазол образует стабильные комплексы с аминокислотами в стехиометрическом соотношении 1 : 1. По результатам tandemной масс-спектрометрии с варьированием энергии фрагментации ионов-ассоциатов флуконазола с аминокислотами построен следующий ряд: $[Fluc + Ala + H]^+ < [Fluc + Lys + H]^+ < [Fluc + Thr + H]^+$. Получившиеся в результате квантово-химических расчетов энергии взаимодействия между флуконазолом и аминокислотой образуют ряд, аналогичный полученному по экспериментальным данным. Таким образом, на примере комплексов флуконазола с аминокислотами продемонстрирована возможность комбинирования экспериментальных масс-спектрометрических исследований и квантово-химического моделирования для изучения свойств таких комплексов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, молекулярная динамика, квантовая химия, фармакология, противогрибковые препараты

Финансирование: работа выполнена в рамках соглашения № 05.604.21.0241 «Разработка технологии персонализированного лечения матерей и новорожденных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, вызванными мультирезистентными штаммами микроорганизмов, на основании генотипирования возбудителей и терапевтического лекарственного мониторинга антимикробных препаратов» (мероприятие 1,2, очередь 1) Министерства науки и высшего образования РФ. Программа: «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы». Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0241.

Вклад авторов: В. В. Чаговец, В. Е. Франкевич, Н. Л. Стародубцева — концепция и дизайн исследования, обработка материала; В. В. Чаговец — статистическая обработка данных; В. В. Чаговец, Н. Л. Стародубцева — написание текста; В. Е. Франкевич — редактирование.

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:** Виталий Викторович Чаговец
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117198; vvchagovets@gmail.com

Статья получена: 22.07.2020 **Статья принята к печати:** 13.08.2020 **Опубликована онлайн:** 22.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.048

COMPLEXES OF FLUCONAZOLE WITH ALANINE, LYSINE AND THREONINE: MASS SPECTROMETRY AND THEORETICAL MODELING

Chagovets VV ✉, Starodubtseva NL, Frankevich VE

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia

Investigation of the triazole-derived drugs action mechanisms and understanding of their affinity and specificity molecular basis may contribute to the new drugs development. The study was aimed to investigate the triazoles class representative (fluconazole) complexes with amino acids using mass spectrometry, molecular dynamics and *ab initio* quantum chemistry calculations. During the experimental study, the fluconazole, alanine, lysine and threonine solutions were analyzed by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. The molecular dynamics modeling of the fluconazole–amino acid complexes was performed using the CHARMM force field. The quantum chemistry calculations of the complexes structure and energy parameters were carried out using the density-functional theory by B3LYP calculations (3-21G and 6-311++G** basis sets). Mass spectra indicated that fluconazole formed stable complexes with amino acids in the 1 : 1 stoichiometric ratio. In accordance with the tandem mass spectrometry with varying fluconazole–amino acid associates ion fragmentation energy, the following sequence was obtained: $[Fluc + Ala + H]^+ < [Fluc + Lys + H]^+ < [Fluc + Thr + H]^+$. The fluconazole–amino acid interaction energy values resulting from the quantum chemistry calculations formed the sequence similar to that obtained by experiment. Thus, as seen in the case of fluconazole–amino acid complexes, it is possible to combine the experimental mass spectrometry studies with quantum chemical modeling for the complexes properties assessment.

Keywords: mass spectrometry, molecular dynamics, quantum chemistry, pharmacology, antifungal drugs

Funding: the study was carried out as a part of the convention № 05.604.21.0241, Development of a Technology for Personalized Treatment of Mothers and Newborns With Infectious and Inflammatory Diseases Caused by Multi-resistant Strains of Microorganisms, Based on Genotyping of Pathogens and Therapeutic Drug Monitoring of Antimicrobial Drugs (item 1,2, queue 1), of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Programme for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020. Project ID: RFMEFI60419X0241.

Author contribution: Chagovets VV, Frankevich VE, Starodubtseva NL — study concept and design, data processing; Chagovets VV — statistical analysis; Chagovets VV, Starodubtseva NL — manuscript writing; Frankevich VE — editing.

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:** Vitaliy V. Chagovets
Oparina, 4, Moscow, 117198; vvchagovets@gmail.com

Received: 22.07.2020 **Accepted:** 13.08.2020 **Published online:** 22.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.048

Целью триазолов является продукт гена *ERG11* — цитохром-P450-стерол-14 α -деметилаза (CYP51). Фермент CYP51 превращает ланостерол в эргостерол, являясь частью пути биосинтеза основного компонента мембраны клеток грибов [1]. Ингибирование синтеза эргостерола замедляет развитие мицелиальных клеток за счет накопления токсичных стероидов, таких как метилированный стерол [2–4], нарушая целостность мембраны, текучесть и проницаемость [5]. Флуконазол (Fluc) действует как конкурентный ингибитор CYP51 и в настоящее время эффективен для лечения многих патогенных грибов.

Для лечения микозов и устойчивости к противогрибковым лекарственным средствам необходима разработка новых классов соединений. Противомикозные препараты относительно трудно разрабатывать по сравнению с антибактериальными из-за эукариотической природы клеток, к тому же противогрибковые препараты, основанные на триазольных соединениях, такие как флуконазол, постепенно становятся недостаточными для лечения многих инфекций. Необходимость разработки новых лекарственных средств побуждает к изучению молекулярных механизмов ингибирования препаратов триазола, что позволит понять молекулярную основу аффинности и специфичности флуконазола.

Ранее молекулярное моделирование использовали для поиска аналогов пиразола. Их искали, исходя из структуры белка CYP51-Ca [6, 7]. Кроме того, с помощью молекулярного моделирования выяснили особенности и механизмы взаимодействия различных ингибиторов с CYP51 [8] и роль мутаций в стабильности и аффинности связывания ферментов [9, 10]. Молекулярная динамика позволила также исследовать причины наибольшего сродства флуконазола к ферментам грибов по сравнению с микобактериальными и человеческими ортологами [11]. Недавно был опубликован обзор стратегий моделирования, используемых для конструирования лигандов для P450 [12].

На основании анализа баз данных был найден набор консервативных аминокислот (AA) [13, 14]. Из них с помощью молекулярно-динамического моделирования выделили три, играющие решающую роль в связывании белка с ингибитором: треонин (Thr77), аланин (Ala258) и лизин (Lys454) [8].

Хотя исследования молекулярной механики могут предсказать аминокислоты, участвующие в образовании комплекса белок–ингибитор, важно иметь набор экспериментальных методов, позволяющих проверить результаты моделирования. Экспериментальный подход, основанный на масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ЭРИ-МС), может оказаться надежным методом для прогнозирования взаимодействий хозяин–гость и быть комплементарным теоретическим расчетам, в которых использованы модели молекулярной механики.

ЭРИ-МС широко используют для изучения нековалентных взаимодействий белков и других биомолекул [15–17]. Процедура мягкой ионизации позволяет молекулярным комплексам сохранять в газовой фазе информацию об их структуре в растворе [18]. За последние десятилетия резко растущее число статей, посвященных изучению нековалентных взаимодействий с помощью МС, свидетельствует о том, что МС стала важной технологией в этой области благодаря высокой скорости анализа, чувствительности и использованию малых объемов образцов [19]. МС использовали для исследования взаимодействий хозяина и гостя [20–25].

Нековалентные взаимодействия между флуконазолом и аминокислотами как элементарные шаги образования белок-ингибиторных комплексов ранее не исследовали.

Целью данной работы было изучение комплексов флуконазола с аминокислотами в газовой фазе с помощью ЭРИ-МС, а также исследование структурных и энергетических параметров комплексов с помощью молекулярной динамики и квантово-химических *ab initio* расчетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуконазол (Fluc), аланин (Ala), лизин (Lys), треонин (Thr), метиловый спирт (степени очистки для жидкостной хроматографии) были приобретены у Merck (Merck; Германия). Деионизированную воду готовили с помощью установки Milli-Q Reference Water Purification System (Merck; Франция). Исходный раствор каждой аминокислоты и флуконазола готовили в метаноле в концентрации 10 ммоль/мл. Для масс-спектрометрического исследования индивидуальных соединений исходные растворы разбавляли водой до концентрации 1 ммоль/мл. Образцы для исследования комплексов флуконазола с аминокислотами с помощью tandemной масс-спектрометрии готовили путем смешивания исходных растворов флуконазола и одной из аминокислот в объемном отношении 1 : 1. Полученные таким образом растворы разбавляли водой до 1 ммоль/мл каждого компонента и перемешивали в течение 30 с. Образец для сравнения относительных интенсивностей комплексов флуконазола с аминокислотами готовили путем смешивания равных объемов исходных растворов флуконазола, аланина, лизина и треонина. Затем раствор разбавили водой до 1 ммоль/мл каждого компонента и перемешивали в течение 30 с. Все образцы готовили при комнатной температуре.

Экспериментальные исследования проводили на масс-спектрометре MaxisImpact с гибридным квадруполь-времяпролетным анализатором и источником с электрораспылительной ионизацией (BrukerDaltonics; Германия). Масс-спектрометр работал в режиме положительных ионов при следующих условиях: диапазон масс m/z — 50–1000, напряжение на игле — 4,5 кВ, распыляющий газ подавали под давлением 0,6 бар, поток осушающего газа составлял 5,0 л/мин, температура осушающего газа — 200 °С. Эксперименты с tandemной масс-спектрометрией осуществляли с окном изоляции ионов m/z — 3 и вариацией энергии столкновений. Анализ проводили в режиме прямого ввода образца с помощью шприцевого насоса kdScientific (kdScientific; США) с потоком 3 мкл/мин.

Молекулярно-динамическое исследование комплексов Fluc + AA осуществляли с помощью программы NAMD [26]. Силовое поле для моделирования исследуемых комплексов было разработано на основании CHARMM General Force-Field (v3.1) [27, 28]. Типы атомов и частично заряды на атомах флуконазола подбирали по аналогии. Недостающие параметры связей, углов и двугранных углов, а также недостающие заряды на атомах флуконазола были оптимизированы с помощью Force Field Toolkit (ffTK) — плагина программы VMD [26].

Квантово-химические расчеты структуры и энергетических параметров комплексов флуконазола с аминокислотами проводили с использованием программ GAMESS [29]. Полную оптимизацию геометрии комплексов для изучения структурных и энергетических свойств проводили на уровне теории функционала плотности

(DFT) с использованием функций B3LYP с базисом 3-21G и 6-311++G** с диффузными и поляризационными орбиталями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании растворов отдельных аминокислот методом ЭРИ-МС были зарегистрированы пики, соответствующие протонированным аминокислотам, а также их аддуктам с катионом натрия. В ЭРИ-МС экспериментах с растворами, содержащими как аминокислоту, так и флуконазол в воде, выявлены ассоциаты аминокислот с молекулой лекарственного препарата, что свидетельствует о достаточной стабильности таких комплексов в газовой фазе.

На рис. 1 представлен ЭРИ-масс-спектр положительных ионов раствора, содержащего все три аминокислоты и флуконазол в воде в эквимольных концентрациях. О возможности образования ассоциатов свидетельствуют пики $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ (m/z 396), $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ (m/z 453) и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ (m/z 426). С учетом интенсивностей соответствующих пиков можно построить следующий ряд (табл. 1): $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+ < [\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+ < [\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$. Поскольку интенсивность масс-спектрометрического пика пропорциональна количеству соответствующих ионов, достигших детектора, можно предположить, что указанная последовательность справедлива и для энергии взаимодействия в комплексе, однако в интенсивность иона ассоциата, помимо стабильности, вносят вклад его эффективность ионизации, стабильность отдельных компонентов комплекса и др. Для дополнительной экспериментальной оценки стабильности комплексов и энергии взаимодействия были зарегистрированы и проанализированы тандемные масс-спектры, полученные в результате столкновительно-индуцированной диссоциации исследуемых ассоциатов. На рис. 2 представлены масс-спектры фрагментации комплексов $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ (рис. 2А), $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ (рис. 2Б), и $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ (рис. 2С). В масс-спектрах выявлены пики комплексов, а также пики фрагментов комплексов, обусловленные протонированным флуконазолом, в случае фрагментации ассоциатов с аланином и треонином, и протонированным лизином в случае фрагментации его ассоциата с флуконазолом. Таким образом, на этом этапе можно сделать вывод, что фрагментация рассматриваемых комплексов идет по двум направлениям: либо потеря нейтральной аминокислоты, либо нейтрального флуконазола. По всей видимости, это связано с различным сродством данных молекул к протону. Для количественной оценки стабильности исследуемых комплексов проанализировали интенсивности пиков в тандемных масс-спектрах с варьированием энергии столкновений. На рис. 3 представлены зависимости интенсивности иона-предшественника от энергии столкновений. Относительную стабильность ассоциатов флуконазола с различными аминокислотами оценивали путем сравнения энергии, необходимой для снижения интенсивности пика иона-предшественника на 50%. Для рассматриваемых комплексов эти величины составили 23, 25 и 29 эВ в комплексах с аланином, лизином и треонином соответственно (табл. 1).

Таким образом, в масс-спектрах растворов, содержащих флуконазол и аланин, треонин или лизин, были выявлены кластеры $[\text{Fluc} + \text{AA} + \text{H}]^+$. Поскольку удалось экспериментально оценить их стабильность, представляет интерес оценить энергию взаимодействия флуконазола с

каждой из рассматриваемых аминокислот, что и составило предмет описываемых далее молекулярно-динамического моделирования и квантово-химических расчетов.

Выбор начальной структуры играет решающую роль для оптимизации геометрии молекулы методами квантовой химии. Поскольку как аминокислоты, так и флуконазол обладают большим числом степеней свободы и конформационно подвижны, в данной работе выбор начальной структуры для квантово-химических расчетов осуществляли с помощью молекулярной динамики методом симуляции отжига. Выбор того, какая из молекул в комплексе, флуконазол или аминокислота, является акцептором протона, осуществляли на основании тандемных масс-спектров (см. рис. 2). В комплексах $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ протонированным был флуконазол, а в комплексе $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ протон локализовался на лизине. Полученные в результате симуляции отжига структуры оптимизировали методом B3LYP сначала с базисом 3-21G, а затем с базисом 6-311++G**. Полученные в результате оптимизации структуры комплексов представлены на рис. 4. В комплексах $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ оптимизация геометрии привела к смещению протона в сторону флуконазола, а в случае комплекса $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ протон локализован на лизине, что согласуется с предположением, высказанным на основании экспериментальных данных. Причиной такого поведения аминокислот по отношению к протону может быть различное сродство к протону у аминокислот и флуконазола, а также значение pI , которое для лизина составляет 9,74, а для аланина и треонина 6 и 5,6 соответственно. На основании выполненного моделирования были рассчитаны энергии образования комплексов по формуле $IE = E_{AB} - E_A - E_B$, где E_{AB} — энергия комплекса, E_A и E_B — энергии компонентов

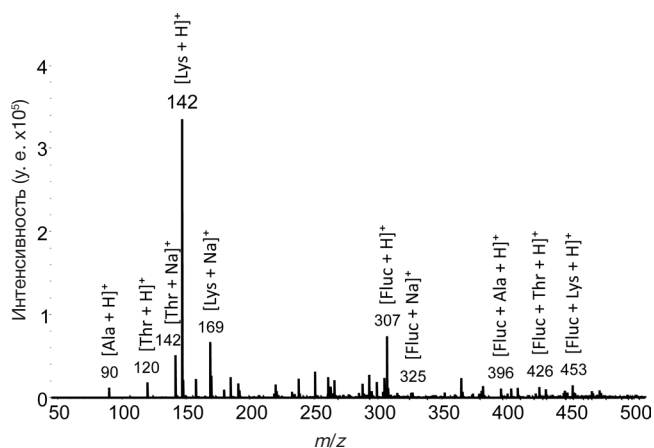


Рис. 1. Масс-спектр положительных ионов образца, содержащего флуконазол, аланин, треонин и лизин

Таблица 1. Параметры, характеризующие комплексы аминокислот с флуконазолом

Аминокислоты в составе комплекса	I, у.е. ¹	CE ₅₀ , эВ ²	B3LYP/6-311++G** IE, кДж/моль ³
Ala	15061	23	-56.8226463
Lys	17540	25	-65.600743
Thr	18325	29	-97.663349

Примечание: ¹ — интенсивность пика комплекса в масс-спектре, измеренная в условных единицах (рис. 1); ² — энергия, необходимая для снижения интенсивности пика предшественника в тандемных масс-спектрах на 50%; ³ — энергия взаимодействия в комплексе, рассчитанная методом квантовой химии B3LYP/6-311++G**.

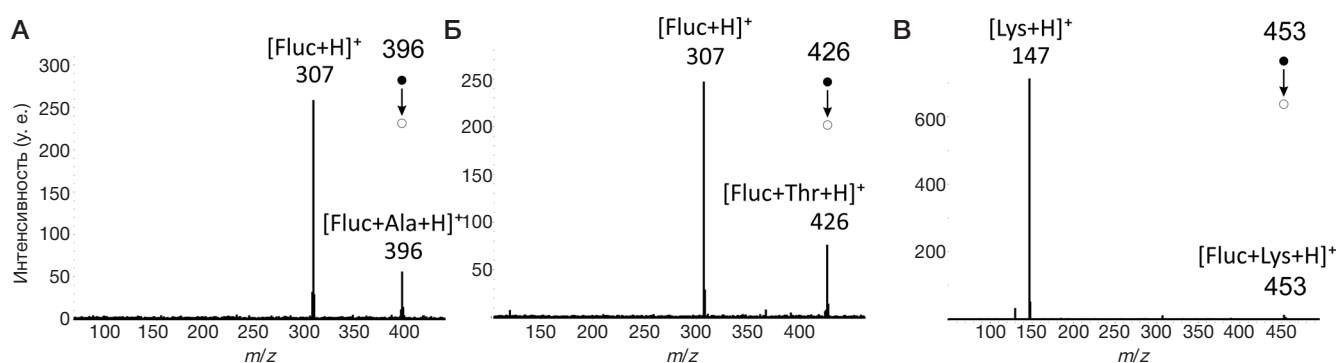


Рис. 2. Тандемные масс-спектры комплексов флуконазола с аланином (А), треонином (Б) и лизином (В), зарегистрированные в режиме положительных ионов

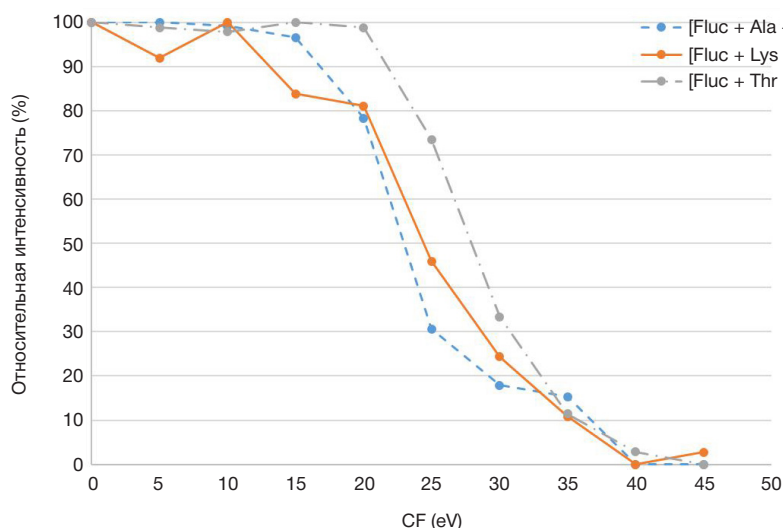


Рис. 3. Зависимость относительной интенсивности пика иона-предшественника комплекса флуконазола с аминокислотой от энергии столкновений (CE)

комплекса. В табл. 2 представлены значения энергии, полученные в результате квантово-химических расчетов методами B3LYP/3-21 и B3LYP/6-311++G^{**}. Значения энергии взаимодействия между компонентами комплекса, посчитанные методом B3LYP/6-311++G^{**}, совпадают с последовательностью, выявленной экспериментально, в то время как при расчете методом B3LYP/3-21 значение энергии взаимодействия флуконазола с лизином оказалось выше, чем с треонином. Этот факт может свидетельствовать о важности использования диффузных и поляризационных орбиталей при моделировании нековалентных комплексов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее была показана важность понимания того, какие аминокислоты участвуют в связывании триазиновых соединений и какого рода взаимодействия определяют стабильность комплексов «белок – лекарственный препарат» [11]. В упомянутой работе сравнивали взаимодействие флуконазола с различными CYP51. Энергия взаимодействия в таких комплексах является результатом конкурентных взаимодействий лиганда с остатками аминокислот в составе белка, с гемом и с молекулами воды. Взаимодействие белок-флуконазол оказалось более эффективным в CYP51 митохондрий из-за полярных взаимодействий с остатком аргинина. Однако в ферментах грибов эти взаимодействия замещает взаимодействие лиганда с гемом, которое компенсирует потерю полярной связи и приводит к более энергетически выгодному связыванию. Следовательно, разработка

лиганда с повышенной специфичностью к ферментам грибов должна быть сосредоточена на повышении полярности лиганда и усилении его взаимодействия с гемом. В то же время было высказано предположение, что более крупные гидрофобные лиганды лучше подходят для воздействия на микобактериальные и человеческие ферменты [11]. Подобные исследования демонстрируют важность понимания и учета взаимодействия лекарственных препаратов с различными компонентами их мишеней. Данная работа демонстрирует подход, который можно применять на ранних этапах проектирования и разработки новых лекарственных препаратов, позволяя оценить стабильность комплексов лекарственного препарата с аминокислотами как с экспериментальной, так и с теоретической точки зрения.

ВЫВОДЫ

ЭРИ-МС и молекулярная динамика были использованы для изучения взаимодействия флуконазола с аминокислотами, которые, согласно литературным данным, играют решающую роль в связывании белка с ингибитором. Нековалентные комплексы оказались стабильными в газовой фазе, что позволило зарегистрировать соответствующие сигналы в масс-спектрах. С помощью тандемной масс-спектрометрии с варьированием энергии столкновений была исследована относительная стабильность зарегистрированных комплексов и построен ряд стабильности: $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ (23 эВ) < $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ (25 эВ) < $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ (29 эВ). Моделирование средствами молекулярной динамики и квантовой

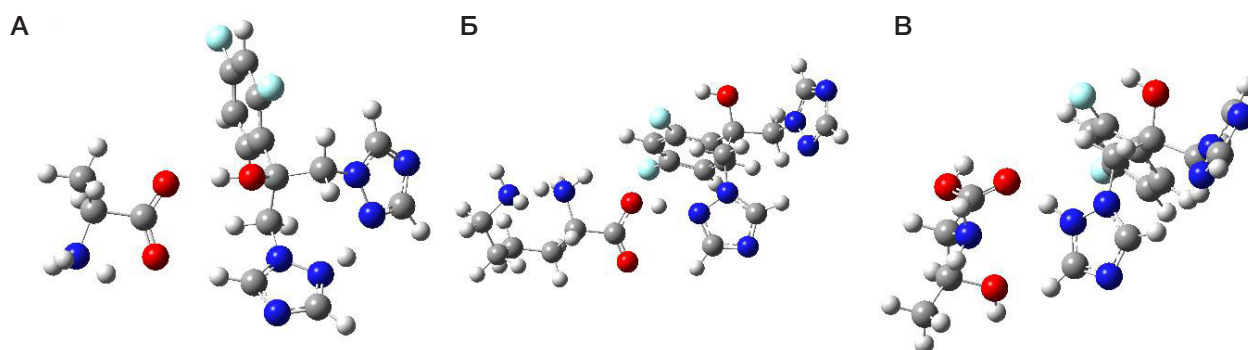


Рис. 4. Структуры комплексов флуконазола с аланином (А), лизинном (Б) и треонином (В), оптимизированные методом B3LYP/6-311++G**

Таблица 2. Значения энергии компонентов комплексов, самих комплексов флуконазола с аминокислотами, а также значения энергии взаимодействия в комплексе, рассчитанные методами квантовой химии B3LYP/3-21 и B3LYP/6-311++G**

Аминокислоты в составе комплекса	$E_{AB}(\text{Fluc} + \text{AA})$, у. е.	$E_A(\text{Fluc})$, у. е.	$E_B(\text{AA})$, у. е.	IE, у. е.	IE, кДж/моль
B3LYP/3-21					
Ala	-1422,2762	-1100,264222	-321,9574674	-0,0544686	-143,007
Lys	-1594,6453	-1100,238944	-494,3018987	-0,1044502	-274,234
Thr	-1536,1547	-1100,238944	-435,8476107	-0,0681227	-178,856
B3LYP/3-311++G**					
Ala	-1430,53104	-1106,65334	-323,85606	-0,02164	-56,82
Lys	-1603,88596	-1106,28645	-497,57453	-0,02499	-65,60
Thr	-1545,09491	-1106,63517	-438,42255	-0,03720	-97,66

химии позволило определить структуру комплексов и энергию взаимодействия в них, причем значения энергии взаимодействия, полученные методом B3LYP/6-311++G**, образуют ряд стабильности ассоциатов, аналогичный полученному с помощью эксперимента.

Такой подход комбинирования экспериментальных масс-спектрометрических исследований и квантово-химического моделирования может быть использован на начальных этапах разработки новых лекарственных препаратов и поиска молекулярных механизмов их действия.

Литература

- Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Maréchal JD, Munro AW, et al. How do azoles inhibit cytochrome P450 enzymes? A density functional study. *J Phys Chem A*. 2008; 112 (50): 12911–8.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 2002; 8 (2): 76–81.
- Marichal P, Gorrens J, Laurijssens L, Vermuyten K, Van Hove C, Le Jeune L, et al. Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43 (11): 2663–70.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (2): 382–402.
- Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75 (2): 213–267.
- Doğan İS, Saraç S, Sari S, Kart D, Eşsiz Gökhan Ş, Vural İ, et al. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. *Eur J Med Chem*. 2017; 130: 124–38.
- Jacob K S, Ganguly S, Kumar P, Poddar R, Kumar A. Homology model, molecular dynamics simulation and novel pyrazole analogs design of *Candida albicans* CYP450 lanosterol 14 α -demethylase, a target enzyme for antifungal therapy. *J Biomol Struct Dyn*. 2017; 35 (7): 1446–63.
- Gao P, Cui YL, Wu RL. Molecular dynamic modeling of CYP51B in complex with azole inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*. 2018; 36 (6): 1511–9.
- Keighobadi M, Emami S, Lagzian M, Fakhar M, Rafiei A, Valadan R. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: In vitro and in silico analysis of a laboratory strain. *Molecules*. 2018; 23 (3). DOI: 10.3390/molecules23030696.
- Vijayakumar S, Das P. Structural, molecular motions, and free-energy landscape of *Leishmania* sterol-14 α -demethylase wild type and drug resistant mutant: a comparative molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn*. 2019; 37 (6): 1477–93.
- Honorato Siqueira T, Martínez L. Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis. *J Biomol Struct Dyn*. 2020; 38 (6): 1659–69.
- Kontoyianni M, Lacy B. Toward Computational Understanding of Molecular Recognition in the Human Metabolizing Cytochrome P450s. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (28): 3353–73.
- Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta — Gen Subj*. 2007; 1770 (3): 467–77.
- Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochim Biophys Acta — Proteins Proteomics*. 2011; 1814 (1): 88–93.
- Loo JA. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 1997; 16 (1): 1–23.
- Pramanik BN, Bartner PL, Mirza UA, Liu YH, Ganguly AK. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *J Mass Spectrom*. 1998; 33 (10): 911–20.
- Loo JA. Electrospray ionization mass spectrometry: A technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int J Mass*

- Spectrom. 2000; 200 (1–3): 175–86.
18. Ray SS, Singh SK, Balaram P. Sulfonate (ANS) Binding to Proteins. *Data Process.* 2001; 0305 (01).
 19. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nano-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 20. Tjernberg A, Carnö S, Oliv F, Benkestock K, Edlund PO, Griffiths WJ, et al. Determination of dissociation constants for protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004; 76 (15): 4325–31.
 21. Benkestock K. Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Noncovalent Interactions in Drug Discovery. 2008.
 22. Bligh SWA, Haley T, Lowe PN. Measurement of dissociation constants of inhibitors binding to Src SH2 domain protein by non-covalent electrospray ionization mass spectrometry. *J Mol Recognit.* 2003; 16 (3): 139–48.
 23. Zhang C, Chen H, Guymon AJ, Wu G, Cooks RG, Ouyang Z. Instrumentation and methods for ion and reaction monitoring using a non-scanning rectilinear ion trap. *Int J Mass Spectrom.* 2006; 255–256 (1–3): 1–10.
 24. Wu RF, Huang YD, Chu YQ, Liu ZP, Ding CF. Investigation of Non-covalent Interactions of 18-Crown-6 with Amino Acids in Gas Phase by Mass Spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 2018; 46 (2): 273–9.
 25. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nano-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 26. Mayne CG, Saam J, Schulten K, Tajkhorshid E, Gumbart JC. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *J Comput Chem.* 2013; 34 (32): 2757–70.
 27. Vanommeslaeghe K, Raman EP, MacKerell AD. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *J Chem Inf Model.* 2012; 52 (12): 3155–68.
 28. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010; 31 (4): 671–90.
 29. Schmidt MW, Baldridge KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J Comput Chem.* 1993; 14 (11): 1347–63.
- References**
1. Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Maréchal JD, Munro AW, et al. How do azoles inhibit cytochrome P450 enzymes? A density functional study. *J Phys Chem A.* 2008; 112 (50): 12911–8.
 2. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* 2002; 8 (2): 76–81.
 3. Marichal P, Gorrens J, Laurijssens L, Vermuyten K, Van Hove C, Le Jeune L, et al. Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (11): 2663–70.
 4. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11 (2): 382–402.
 5. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75 (2): 213–267.
 6. Doğan İS, Saraç S, Sari S, Kart D, Eşsiz Gökhan Ş, Vural İ, et al. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. *Eur J Med Chem.* 2017; 130: 124–38.
 7. Jacob K S, Ganguly S, Kumar P, Poddar R, Kumar A. Homology model, molecular dynamics simulation and novel pyrazole analogs design of *Candida albicans* CYP450 lanosterol 14 α -demethylase, a target enzyme for antifungal therapy. *J Biomol Struct Dyn.* 2017; 35 (7): 1446–63.
 8. Gao P, Cui YL, Wu RL. Molecular dynamic modeling of CYP51B in complex with azole inhibitors. *J Biomol Struct Dyn.* 2018; 36 (6): 1511–9.
 9. Keighobadi M, Emami S, Lagzian M, Fakhar M, Rafiei A, Valadan R. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: In vitro and in silico analysis of a laboratory strain. *Molecules.* 2018; 23 (3). DOI: 10.3390/molecules23030696.
 10. Vijayakumar S, Das P. Structural, molecular motions, and free-energy landscape of *Leishmania* sterol-14 α -demethylase wild type and drug resistant mutant: a comparative molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn.* 2019; 37 (6): 1477–93.
 11. Honorato Siqueira T, Martínez L. Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis. *J Biomol Struct Dyn.* 2020; 38 (6): 1659–69.
 12. Kontoyianni M, Lacy B. Toward Computational Understanding of Molecular Recognition in the Human Metabolizing Cytochrome P450s. *Curr Med Chem.* 2018; 25 (28): 3353–73.
 13. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta — Gen Subj.* 2007; 1770 (3): 467–77.
 14. Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochim Biophys Acta — Proteins Proteomics.* 2011; 1814 (1): 88–93.
 15. Loo JA. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 1997; 16 (1): 1–23.
 16. Pramanik BN, Bartner PL, Mirza UA, Liu YH, Ganguly AK. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *J Mass Spectrom.* 1998; 33 (10): 911–20.
 17. Loo JA. Electrospray ionization mass spectrometry: A technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int J Mass Spectrom.* 2000; 200 (1–3): 175–86.
 18. Ray SS, Singh SK, Balaram P. Sulfonate (ANS) Binding to Proteins. *Data Process.* 2001; 0305 (01).
 19. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nano-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 20. Tjernberg A, Carnö S, Oliv F, Benkestock K, Edlund PO, Griffiths WJ, et al. Determination of dissociation constants for protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004; 76 (15): 4325–31.
 21. Benkestock K. Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Noncovalent Interactions in Drug Discovery. 2008.
 22. Bligh SWA, Haley T, Lowe PN. Measurement of dissociation constants of inhibitors binding to Src SH2 domain protein by non-covalent electrospray ionization mass spectrometry. *J Mol Recognit.* 2003; 16 (3): 139–48.
 23. Zhang C, Chen H, Guymon AJ, Wu G, Cooks RG, Ouyang Z. Instrumentation and methods for ion and reaction monitoring using a non-scanning rectilinear ion trap. *Int J Mass Spectrom.* 2006; 255–256 (1–3): 1–10.
 24. Wu RF, Huang YD, Chu YQ, Liu ZP, Ding CF. Investigation of Non-covalent Interactions of 18-Crown-6 with Amino Acids in Gas Phase by Mass Spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 2018; 46 (2): 273–9.
 25. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nano-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 26. Mayne CG, Saam J, Schulten K, Tajkhorshid E, Gumbart JC. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *J Comput Chem.* 2013; 34 (32): 2757–70.
 27. Vanommeslaeghe K, Raman EP, MacKerell AD. Automation of

- the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *J Chem Inf Model.* 2012; 52 (12): 3155–68.
28. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010; 31 (4): 671–90.
29. Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J Comput Chem.* 1993; 14 (11): 1347–63.

ГИПОКСИЯ УСИЛИВАЕТ ТРАНСЦИТОЗ В ЭНТЕРОЦИТАХ КИШЕЧНИКА

Д. В. Мальцева¹✉, М. Ю. Шкурников^{1,2}, С. А. Нерсисян¹, С. В. Никулин¹, А. А. Курносов¹, М. П. Райгородская³, А. И. Осипьянц^{2,4}, Е. А. Тоневский⁵

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

² Онкологический институт имени П. А. Герцена (филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии), Москва, Россия

³ Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, Россия

⁴ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

⁵ Фонд развития инновационного научно-технологического центра «Долина Менделеева», Москва, Россия

Важнейшее условие нормального функционирования кишечника — сохранение барьерных функций монослоя эпителиальных клеток, выстилающих его поверхность. Воспалительные состояния кишечника, как правило, ассоциированы с дополнительной тканевой гипоксией, что приводит к нарушению целостности эпителия. Однако опасность инфекционных заболеваний может сохраняться и при отсутствии очевидных нарушений монослоя клеток. Возможная причина этого — изменение внутриклеточного транспорта везикул, содержащих бактерии. Целью работы было на модели энтероцитов кишечника человека исследовать влияние гипоксии на процесс транскитоza. Показано, что гипоксия усиливает в 1,8 раза транскитоz модельного белка, растительного лектина ризина. Сравнительное исследование транскриптомов и протеомов выявило достоверное изменение экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный везикулярный транспорт, в том числе падение экспрессии регулятора метаболизма липидов apoB, как на уровне белка (в 6,5 раза), так и на уровне мРНК (в 2,1 раза). Необходимы работы по изучению возможного механизма регуляции экспрессии генов в энтероцитах кишечника в условиях гипоксии.

Ключевые слова: гипоксия, энтероцит, эпителий кишечника, микроРНК, мРНК, протеом, транскриптом, транскитоz, Caco-2

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60519X0184).

Благодарности: авторы благодарят Центр коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ) за возможность использования оборудования.

Вклад авторов: Д. В. Мальцева — молекулярно-биологические исследования, анализ данных, написание статьи; М. Ю. Шкурников — обработка данных транскриптома, секвенирования, статистический анализ; С. А. Нерсисян — обработка данных секвенирования, биоинформатический анализ, функциональный анализ генов; С. В. Никулин — работа с культурой клеток, подготовка образцов для анализа протеома, обработка данных протеома; А. А. Курносов — подготовка образцов для секвенирования микроРНК, анализ данных; М. П. Райгородская — анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ, транскриптомный анализ; А. И. Осипьянц — культуральная работа, подготовка образцов для анализа протеома и транскриптома; Е. А. Тоневский — организация исследования, анализ данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: все образцы для исследования были получены с соблюдением принципов и правил Хельсинской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Диана Васильевна Мальцева
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117321; dmaltseva@gmail.com

Статья получена: 08.08.2020 **Статья принята к печати:** 21.08.2020 **Опубликована онлайн:** 28.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.049

HYPOXIA ENHANCES TRANSCYTOSIS IN INTESTINAL ENTEROCYTES

Maltseva DV¹✉, Shkurnikov MYu^{1,2}, Nersisyan SA¹, Nikulin SV¹, Kurnosov AA¹, Raigorodskaya MP³, Osipyants AI^{2,4}, Tonevitsky EA⁵

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

² Hertsen Moscow Oncology Research Center, Moscow, Russia

³ SRC Bioclinicum, Moscow, Russia

⁴ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

⁵ Fund for Development of Innovative Scientific-Technological Center Mendeleev Valley, Moscow, Russia

The integrity of the intestinal epithelial cell lining is crucial for the normal intestinal function. As a rule, intestinal inflammation is associated with additional tissue hypoxia, leading to the loss of epithelial monolayer integrity. However, in the absence of visible damage to the epithelium, there still might be a risk of infection driven by changes in the intracellular transport of bacteria-containing vesicles. The aim of this study was to investigate the effects of hypoxia on transcytosis using a human intestinal enterocyte model. We found that hypoxia enhances transcytosis of the model protein ricin 1.8-fold. The comparative transcriptome and proteome analyses revealed significant changes in the expression of genes involved in intracellular vesicle transport. Specifically, the expression of apoB (the regulator of lipid metabolism) was changed at both protein (6.5-fold) and mRNA (2.1-fold) levels. Further research is needed into the possible mechanism regulating gene expression in intestinal erythrocytes under hypoxic conditions.

Keywords: hypoxia, enterocyte, intestinal epithelium, microRNA, mRNA, proteome, transcriptome, transcytosis, Caco-2

Funding: the study received public financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project ID RFMEFI60519X0184).

Acknowledgement: the authors thank the Human Proteome Core Facility (Institute of Biomedical Chemistry) for permission to use the Facility's equipment

Author contribution: Maltseva DV — molecular tests, analysis of their results, manuscript preparation; Shkurnikov MYu — analysis of transcriptome and sequencing data, statistical analysis; Nersisyan SA — sequencing data processing, bioinformatic analysis, functional gene analysis; Nikulin SV — cell culture, sample preparation for subsequent proteome analysis, proteomic data analysis; Kurnosov AA — sample preparation for microRNA sequencing, analysis of sequencing data; Raigorodskaya MP — real-time PCR-based analysis of gene expression, transcriptome analysis; Osipyants AI — cell culture, sample preparation for subsequent proteome and transcriptome analyses; Tonevitsky EA — supervision, data analysis, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the samples were obtained following the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Diana V. Maltseva
Vavilova, 7, Moscow, 117321; dmaltseva@gmail.com

Received: 08.08.2020 **Accepted:** 21.08.2020 **Published online:** 28.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.049

Среди основных функций эпителия кишечника — защита организма от инфекций и обеспечение возможности безопасного существования комменсальных бактерий в кишечнике [1, 2]. Бактерии и бактериальные антигены могут непосредственно взаимодействовать с клетками эпителия кишечника, в том числе с энтероцитами [2, 3]. Такое взаимодействие включает следующие основные этапы: связывание с поверхностью клетки, эндоцитоз, экзоцитоз и транцитоз бактерий, их фрагментов и белков [3]. Рецепторами для бактерий на поверхности энтероцитов служат как белки, так и гликолипиды и углеводы [4]. Бактериальную адгезию к тканям кишечного барьера моделируют с помощью различных клеточных линий [5]. Из клеточных линий наиболее часто в качестве модели используют клетки аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2 [6–8]. В просвете здорового кишечника в ходе метаболизма комменсальных бактерий возникают условия гипоксии [5]. Низкий уровень кислорода стабилизирует индуцируемые гипоксией факторы HIF1 α и HIF2 α , которые, в свою очередь, влияют на барьерные функции кишечного эпителия [9]. Многие паталогические состояния кишечника также ассоциированы с развитием гипоксии [10]. Это подтверждает важность исследования всех этапов взаимодействия кишечной микробиоты с эпителием при недостатке кислорода.

Растительные лектины — хорошо описанные белки, которые используют для изучения связывания белковых молекул с поверхностью клетки и процессов внутриклеточного транспорта [11, 12]. Рецепторами таких белков на поверхности клетки служат гликозилированные белки и липиды, что позволяет использовать лектины в качестве моделей при изучении взаимодействия бактерий с клетками. Целью настоящей работы было исследовать влияние гипоксии на процесс транцитоза в клетках эпителия кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линию immortalized клеток аденокарциномы ободочной кишки Caco-2 (Институт цитологии РАН; Санкт-Петербург) культивировали в среде MEM (Gibco; США) с добавлением 20%-й фетальной сыворотки крупного рогатого скота FBS (Gibco; США), 1%-го (v/v) раствора заменимых аминокислот (Gibco; США), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco; США). Клетки Caco-2 культивировали в шестилуночных планшетах (Corning; США) в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену среды производили каждые 2–3 суток. Для индукции гипоксии в среду добавляли CoCl₂ (Sigma-Aldrich; США) до концентрации 300 мМ и инкубировали 24 ч. Затем клетки промывали однократным (1 \times) DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома и протеома, как было описано ранее [13, 14].

Оценку влияния гипоксии на состояние монослоя клеток проводили с помощью импедансной спектроскопии. Для этого перед посевом клеток Caco-2 в 96-луночные планшеты с мембранными вставками (Corning; США) все луночки планшета заполняли средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂. Затем клетки Caco-2 рассевали приблизительно по 5600 клеток на каждую мембранную вставку в объеме 50 мкл и культивировали в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену

среды производили каждые 2–3 суток. Для индукции гипоксии в среду добавляли CoCl₂, как описано выше.

Измерение импедансных спектров проводили в диапазоне частот от 40 до 20 000 Гц при помощи системы импедансной спектроскопии («БиоКлиникум»; Россия) и электрода STX100C96 (World Precision Instruments; США) при комнатной температуре [15]. Для получения средних значений электрических параметров использовали три независимые мембранные вставки с клетками. Обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с графической оболочкой (R-Tools Technology; США).

Растительный лектин рицин выделяли из семян клещевины *Ricinus communis*, как описано ранее [16, 17]. Биотинилирование, анализ связывания с асиалофетином и проверку цитотоксических свойств на клетках-мишенях проводили, как описано ранее [18–20].

Для оценки транцитоза дифференцированные клетки Caco-2 инкубировали со средой, содержащей биотинилированный рицин (1 \times 10⁻⁷ М), в мембранных вставках. Белок добавляли в верхнюю камеру лунки на апикальную мембрану клеток. Для иммуноферментного анализа культуральную среду забирали из нижней камеры лунки через 1 и 6 ч.

Иммуноферментный анализ для определения концентрации лектина в культуральной среде проводили следующим образом. Моноклональные антитела RA999 против каталитической субъединицы рицина (10 мкг/мл в 10 мМ фосфатном буфере (ФБ) pH 7,4 (Sigma-Aldrich; Германия) адсорбировали на 96-луночную плашку (Corning; США) по 100 мкл на лунку. Для отмывания использовали буфер ФБ, содержащий 0,05% Tween-20 (буфер ФБТ). В качестве неспецифического белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) («Диаэм»; Россия). Для блокирования неспецифических мест связывания использовали буфер ФБТ, содержащий 0,1% БСА. Культуральные среды разводили в 100 раз буфером ФБ, содержащим 50 мМ β -лактозы (Sigma-Aldrich; Германия) и наносили по 100 мкл в лунки плашки с иммобилизованными антителами. Все инкубации проводили при +37 °С в термостатической камере. Биотинилированный лектин детектировали конъюгатом стрептоидина с пероксидазой хрена (Intitrogen; Германия). После инкубации с жидким субстратом 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Intitrogen; Германия) реакцию останавливали 1М раствором HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм на планшетном спектрофлуориметре SpectroMax i3x (Molecular devices; США). Моноклональные антитела были любезно предоставлены профессором П. Г. Свешниковым (лаборатория биотехнологии, Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения; Россия).

Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили так же, как описано ранее [14]. В качестве референсных использовали транскрипты генов *ACTB* и *GAPDH*.

Профиль экспрессии мРНК анализировали с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [14]. Значение RIN для всех использованных образцов было выше 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов, гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили так же, как описано ранее [21]. CEL-файлы, полученные при сканировании

микрочипов, обрабатывали с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Неаннотированные пробсы (наборы проб на микрочипе) исключали из анализа. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе выбирали значение 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix.

Профиль экспрессии микроРНК анализировали с помощью секвенирования «нового поколения» (NGS). Библиотеки NGS создавали из фракции малых РНК, полученной с использованием набора CATS small RNA-seq в соответствии с протоколом производителя (Diagenode; Бельгия). После ПЦР-амплификации библиотеки очищали с использованием магнитных шариков AMPure. Концентрации конечных библиотек измеряли с помощью набора Qubit v2.0 DNA High Sensitivity DNA Kit (ThermoFisher Scientific; США). Затем объединенные библиотеки денатурировали и группировали на шести считывающих проточных ячейках Illumina HiSeq2000 V4 (Illumina; США) и секвенировали. Проводили 51 цикл глубокого секвенирования с шестичисловым индексированием ридов. Данные секвенирования HiSeq 2000 экспортировали в виде файла FASTQ, полученные риды подвергали обрезке адаптеров и удалению поли-(A)-хвоста.

Контроль качества FASTQ файлов секвенирования микроРНК осуществляли с помощью программы FastQC версии v0.11.9 (Babraham Bioinformatics; Великобритания). Cutadapt версии 2.8 использовали для обрезки адаптеров [22], риды короче 18 нуклеотидов удаляли. Экспрессию микроРНК оценивали с помощью программы miRDeep2 [23]. Анализ дифференциальной экспрессии проводили на языке R версии 3.6.3 (R-Tools Technology; США) с использованием библиотеки DESeq2 [24].

Статистическую обработку данных микрочипов осуществляли следующим образом. Исходные данные нормировали с использованием пакета oligo для языка программирования R (R-Tools Technology; США). Полученные данные логарифмировали по основанию 2. Анализ дифференциальной экспрессии генов и микроРНК проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Поправку на множественную проверку гипотез делали с помощью метода False Discovery Rate (FDR) и процедуры Бенджамини-Хохберга.

Функциональную аннотацию генов производили с помощью баз данных и алгоритмов DAVID версии 6.8 (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics; США). Валидированные взаимодействия микроРНК и генов-мишеней были экспортированы из базы данных DIANA-TarBase версии 8 (DIANA Lab; Греция) [25]. Предсказание позиций связывания микроРНК на 3'-нетранслируемых областях мРНК-мишеней производили с помощью miRWalk [26]. Для поиска интронных микроРНК и их генов-хозяев использовали базу данных miRIAD.

Подготовку лизатов клеток линии Caco-2, экстракцию тотального белка, гидролитическое расщепление и последующие процедуры для анализа протеомов проводили, как описано ранее [14]. После трипсинолиза надосадочную жидкость анализировали на масс-спектрометре Q-Exactive HF-X в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Fisher Scientific; США) при напряжении на эмиттере 2,1 кВ и температуре капилляра 240 °С. Для оценки дифференциально экспрессированных белков полученные первичные данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant 1.6 (алгоритм iBAQ) (Max-Planck-Institute of Biochemistry;

Германия). Дальнейшую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Perseus и языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1 (R-Tools Technology; США). Для определения статистической достоверности наблюдаемых различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование энтероцитов кишечника в условиях гипоксии стимулирует трансцитоз и ассоциировано с изменением экспрессии генов, вовлеченных в транспорт везикул

Условия культивирования энтероцитов кишечника, имитирующие гипоксию, создавали путем обработки CoCl_2 дифференцированных клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2. На основании измерения импедансных спектров было показано, что обработка CoCl_2 не нарушает целостность монослоя Caco-2. Значение трансэпителиального сопротивления (TEER) сохраняется на уровне 2000 Ом, что свидетельствует об отсутствии выраженной цитотоксичности и гибели клеток.

Анализ профиля мРНК с помощью микрочипов показал, что обработка энтероцитов CoCl_2 приводит к изменению экспрессии в два и более раз ($\text{FDR} < 0,05$) 165 генов, среди которых значимое увеличение было выявлено для генов, вовлеченных в ответ клеток на гипоксию: *DDIT4* в 2,4, *EGLN1* в 2,7, *LDHA* в 2,0, *PFKFB3* в 2,1, *SLC2A1* в 3,1, *SLC2A3* в 3,0, а также *VEGFA* в 1,4. Изменение экспрессии данных генов было подтверждено методом ПРЦ-ПВ ($p < 0,05$). Кроме того, функциональная аннотация дифференциально экспрессированных генов с помощью базы данных DAVID выявила значимое обогащение для сигнального пути HIF-1, опосредующего ответ на гипоксию (данные не представлены). Таким образом, обработка энтероцитов CoCl_2 действительно имитирует условия гипоксии.

Для оценки эффективности трансцитоза через монослой энтероцитов кишечника в стандартных условиях культивирования и в условиях гипоксии дифференцированные клетки Caco-2 в мембранных вставках обрабатывали с апикальной стороны средой, содержащей биотинилированный лектин рицин. В контрольных лунках со стандартными условиями культивирования проводили замену среды с апикальной стороны на свежую без лектина. Через 1 и 6 ч после замены среды в верхней камере среду из нижней камеры полностью отбирали и анализировали в ней содержание лектина с помощью иммуоферментного анализа. Мониторинг параметров импедансной спектроскопии в течение 6 ч обработки клеток лектином свидетельствовал о сохранении целостности монослоя, что согласуется с ранее полученными данными [27]. При этом значение TEER через 6 ч обработки лектином даже возрастало, как в контроле, так и при гипоксии (рис. 1), что указывает на формирование более плотных межклеточных контактов. Таким образом, можно исключить возможность проникновения белковых молекул из верхней камеры мембранных вставок с монослоем энтероцитов в нижнюю путем парацитоза. Следовательно, попадание лектина из верхней камеры в нижнюю происходит только благодаря трансцитозу.

Результаты иммуоферментного анализа показали, что и при нормоксии и при гипоксии лектин действительно

подвергается трансцитозу энтероцитами. При этом в условиях гипоксии через 6 ч обнаружено увеличение в 1,8 раза ($p < 0,05$) количества лектина, подвергнувшегося трансцитозу по сравнению со стандартными условиями культивирования (рис. 2).

Отметим, что проведенный функциональный анализ дифференциально экспрессированных генов позволил идентифицировать 16 генов, вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул (табл. 1).

Для оценки изменения экспрессии генов в энтероцитах кишечника на уровне белка был проведен масс-спектрометрический анализ протеома. Общее число достоверно детектированных белков составило 3361. Содержание 237 белков достоверно различалось в 2 и более раз в энтероцитах, культивируемых при нормоксии и в условиях гипоксии. Из белков, кодируемых генами внутриклеточного транспорта везикул, экспрессия которых изменилась по данным микрочипов, в протеоме были обнаружены только четыре: apoB (ген *APOB*), SorLA-1 (ген *SORL1*), CAM-PRP (ген *PPP3CA*) и CEACAM1. При этом для apoB было показано достоверное снижение экспрессии (в 6,5 раза), что согласуется с данными транскриптомного анализа.

Регуляцию экспрессии генов *APOB*, *SORL1*, *PPP3CA* и *CEACAM1* в энтероцитах кишечника могут осуществлять микроРНК

Для выявления возможного механизма регуляции экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный

транспорт везикул, был проведен анализ профиля экспрессии микроРНК с помощью NGS. Достоверное изменение экспрессии в 1,5 и более раз ($p \leq 0,05$) было обнаружено для 16 микроРНК. Интересно, что семь из них являются регуляторами генов *APOB*, *SORL1*, *PPP3CA* и *CEACAM1* [25]. При этом направление изменения экспрессии данных микроРНК антикоррелировало с направлением изменения экспрессии соответствующих мРНК-мишеней (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Огромное число данных о механизмах внутриклеточного везикулярного транспорта было получено благодаря исследованию проникновения в клетку растительного лектина рицина [11]. Связывание рицина с гликозилированными белками на поверхности клетки индуцирует эндоцитоз и последующий его транспорт в составе везикул внутри клетки к аппарату Гольджи и эндоплазматическому ретикулуму. Благодаря использованию рицина были установлены многие особенности апикального и базолатерального транспорта, а также трансцитоза в поляризованных эпителиальных клетках.

С каждым годом все больше внимания уделяют роли гипоксии и обусловленных гипоксией сигнальных путей в физиологии и патофизиологии кишечника. Кишечный эпителий обычно находится в состоянии физиологической гипоксии, однако дополнительная тканевая гипоксия является признаком активного воспалительного процесса [10]. Важнейшее условие нормального функционирования

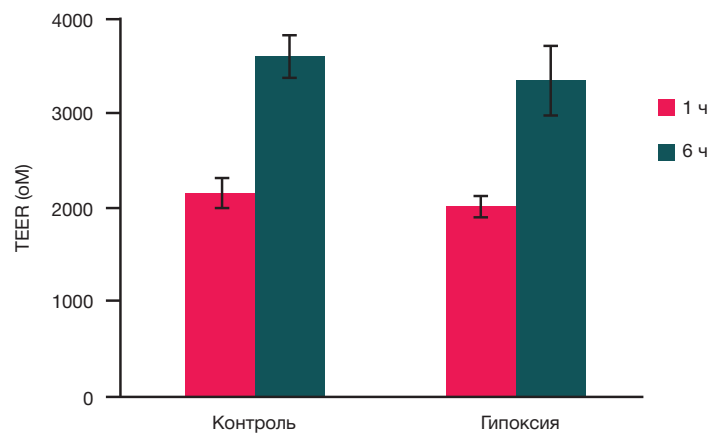


Рис. 1. Зависимость трансэпителиального сопротивления (TEER) от времени при обработке энтероцитов кишечника растительным лектином рицином

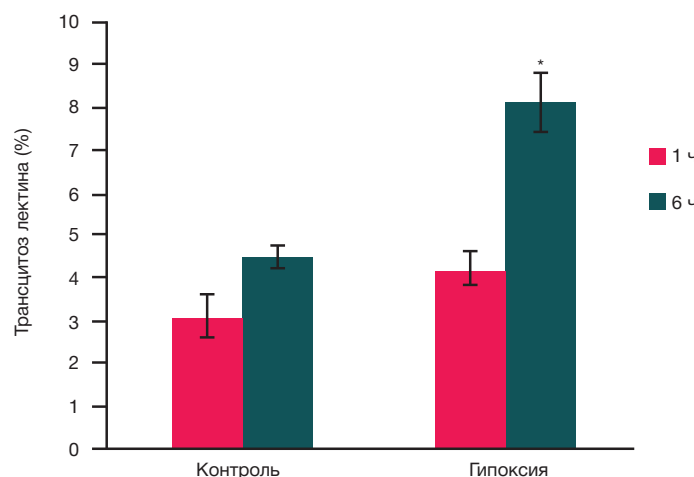


Рис. 2. Оценка количества биотинилированного лектина рицин, подвергнувшегося трансцитозу энтероцитами кишечника в стандартных условиях культивирования (контроль) и в условиях гипоксии; * — доля лектина, подвергнувшегося трансцитозу через 6 ч в условиях гипоксии достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$)

кишечника — сохранение барьерных функций монослоя эпителиальных клеток, выстилающих его поверхность [2]. Однако опасность инфекционных заболеваний может сохраняться и при отсутствии очевидных нарушений монослоя клеток, причиной тому может быть изменение внутриклеточного транспорта везикул, содержащих бактерии, а именно транцитоза [7, 28]. В нашей работе было показано, что в условиях гипоксии при сохранении целостности монослоя энтероцитов происходит значимое стимулирование транцитоза лектина. Сравнительный анализ транскриптомов выявил изменение экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул, в клетках, культивируемых в условиях гипоксии. Значительное снижение *APOB*, одного из этих генов, было подтверждено и при анализе протеома. Интересно, что белок *apoB* является одним из ключевых регуляторов метаболизма липидов и холестерина энтероцитами [29, 30]. Локализуясь преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, *apoB* способствует упаковке адсорбированных с апикальной стороны липидов и холестерина в пре-хиломикроны, *apoB*-содержащие частицы. Эти частицы в процессе транспорта в мембранных везикулах к аппарату Гольджи созревают до хиломикрон и секретируются с базолатеральной стороны энтероцитов посредством экзоцитоза. В здоровых энтероцитах кишечника образование *apoB*-содержащих частиц и их секреция происходят

постоянно [29]. Возможно, что значительное снижение экспрессии *apoB* может активировать компенсаторные механизмы секреции адсорбируемых и накапливающихся липидов и холестерина, например транцитоза. Отметим также, что накапливаемые в клетках липиды и холестерин служат основным строительным материалом для формирования мембран, что в свою очередь тоже может изменять мембранный транспорт в энтероцитах.

Для выяснения механизма регуляции наблюдаемых изменений был проанализирован профиль экспрессии микроРНК. Интересно, что семь из 16 микроРНК, обнаруженных дифференциально экспрессированными в ответ на гипоксию, оказались регуляторами дифференциально экспрессированных генов внутриклеточного транспорта везикул. Кроме того, направление изменения экспрессии микроРНК антикоррелировало с направлением изменения экспрессии соответствующих мРНК-мишеней. Полученные данные указывают на то, что возможным механизмом регуляции свойств энтероцитов в условиях гипоксии может быть микроРНК-зависимый механизм.

ВЫВОДЫ

На модели энтероцитов кишечника человека показано, что гипоксия стимулирует процесс транцитоза. Это сопровождается изменением экспрессии генов,

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные гены, вовлеченные во внутриклеточный транспорт везикул

Ген	Изменение экспрессии, разы*	p-value	FDR
<i>OLR1</i>	-2,4	0,0003	0,004
<i>ADM</i>	2,1	0,0007	0,006
<i>LRP4</i>	1,5	0,0014	0,008
<i>SORL1</i>	1,9	0,0044	0,019
<i>LDLR</i>	1,9	0,0068	0,019
<i>ABCA1</i>	-2,1	0,0056	0,019
<i>SDCBP</i>	1,7	0,0097	0,024
<i>PPP3CA</i>	-1,6	0,0219	0,029
<i>APOB</i>	-2,1	0,0208	0,029
<i>CEACAM1</i>	1,8	0,0243	0,030
<i>ENPP1</i>	-1,8	0,0142	0,030
<i>ITGA2</i>	3,2	0,0203	0,031
<i>RAB27B</i>	-1,9	0,0201	0,034
<i>FCHSD2</i>	-1,6	0,0193	0,037
<i>SLC9B2</i>	-1,5	0,0381	0,043
<i>KIAA1107</i>	-1,7	0,0434	0,046

Примечание: * — представлено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) при гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью микрочипов. Отрицательное число означает, что экспрессия данного гена уменьшилась в соответствующее число раз

Таблица 2. Дифференциально экспрессированные микроРНК, регулирующие экспрессию белков внутриклеточного транспорта везикул

микроРНК	Изменение экспрессии, разы*	мРНК-мишень
<i>hsa-miR-27a-5p</i>	1,5	<i>APOB</i>
<i>hsa-miR-1303</i>	-2,1	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-100-5p</i>	-1,8	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-4521</i>	-1,6	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-21-3p</i>	1,7	<i>PPP3CA</i>
<i>hsa-miR-32-3p</i>	-1,6	<i>CEACAM1</i>
<i>hsa-miR-148a-5p</i>	-1,5	<i>CEACAM1</i>

Примечание: * — представлено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) при гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью NGS. Отрицательное число означает, что экспрессия данной микроРНК уменьшилась в соответствующее число раз

вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул. Обнаружено, что гипоксия ассоциирована с падением экспрессии ароВ, важнейшего регулятора метаболизма липидов, как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Механизм регуляции изменения свойств клеток может

включать регуляцию экспрессии генов посредством микроРНК. Дальнейшее изучение взаимосвязи метаболизма липидов и процесса транцитоза позволит разработать препараты для снижения вероятности инфицирования тканей кишечника при воспалительных процессах.

Литература

- Chang C-S, Kao C-Y. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci.* 2019; 26 (1): 59.
- Solis AG, Klapholz M, Zhao J, Levy M. The bidirectional nature of microbiome-epithelial cell interactions. *Curr Opin Microbiol.* Elsevier Current Trends. 2020; 56: 45–51.
- Hu L, Tall BD, Curtis SK, Kopecko DJ. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun.* American Society for Microbiology Journals. 2008; 76 (11): 5294–304.
- Blanco LP, DiRita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. *Cell Microbiol.* 2006; 8 (6): 982–98.
- Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol Academic Press.* 2016; 420 (2): 262–70.
- Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol BioMed Central.* 2019; 13 (S1): 19.
- Panigrahi P, Bamford P, Horvath K, Morris JG, Gewolb IH. *Escherichia coli* transcytosis in a Caco-2 cell model: implications in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res Nature Publishing Group.* 1996; 40 (3): 415–21.
- Rubio APD, Martínez J, Palavecino M, Fuentes F, López CMS, Marcilla A, et al. Transcytosis of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model. *Sci Rep Nature Publishing Group.* 2020; 10 (1): 3120.
- Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe.* 2015; 17 (5): 662–71.
- Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* 2017; 19 (3): 210–21.
- Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen T-G. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd., 2010; 584 (12): 2626–34.
- Moisenovich M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe H, Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol.* 2002; 81 (10): 529–38.
- Khaustova NA, Maltseva DV, Oliveira-Ferrer L, Stürken C, Milde-Langosch K, Makarova JA, et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie.* 2017; 142: 197–206.
- Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgodina V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the $\alpha 5$ laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie.* 2020; 174: 107–16.
- Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 7: 474.
- Tonevitsky AG, Agapov II, Shamshiev AT, Temyakov DE, Pohl P, Kirpichnikov MP. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.* 1996; 392 (2): 166–8.
- Moisenovich M, Tonevitsky A, Maljuchenko N, Kozlovskaya N, Agapov I, Volkmandt W, et al. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol.* 2004; 121 (6): 429–39.
- Agapov II, Tonevitsky AG, Moysenovich MM, Maluchenko NV, Weyhenmeyer R, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett.* 1999; 452 (3): 211–4.
- Agapov II, Tonevitsky AG, Maluchenko NV, Moisenovich MM, Bulah YS, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Lett.* 1999; 464 (1–2): 63–6.
- Pohl P, Antonenko YN, Evtodienko VY, Pohl EE, Saparov SM, Agapov II, et al. Membrane fusion mediated by ricin and viscumin. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1371 (1): 11–6.
- Kudrieva A, Galatenko V, Maltseva D, Khaustova N, Kuzina E, Tonevitsky A, et al. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-Gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules.* 2017; 22 (5): 808.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011; 17 (1): 10.
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (1): 37–52.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15 (12): 550.
- Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46 (D1): D239–45.
- Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One.* 2018; 13 (10): e0206239.
- Flora AD, Teel LD, Smith MA, Sinclair JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Ricin crosses polarized human intestinal cells and intestines of ricin-gavaged mice without evident damage and then disseminates to mouse kidneys. *PLoS One.* 2013; 8 (7): e69706.
- Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect.* 2008; 10 (4): 424–31.
- Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020; 17 (3): 169–83.
- Lo CC, Coschigano KT. ApoB48 as an efficient regulator of intestinal lipid transport. *Front Physiol.* 2020; 11: 796.

References

- Chang C-S, Kao C-Y. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci.* 2019; 26 (1): 59.
- Solis AG, Klapholz M, Zhao J, Levy M. The bidirectional nature of microbiome-epithelial cell interactions. *Curr Opin Microbiol.* Elsevier Current Trends. 2020; 56: 45–51.
- Hu L, Tall BD, Curtis SK, Kopecko DJ. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human

- intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun. American Society for Microbiology Journals*. 2008; 76 (11): 5294–304.
4. Blanco LP, DiRita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. *Cell Microbiol*. 2006; 8 (6): 982–98.
 5. Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol Academic Press*. 2016; 420 (2): 262–70.
 6. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol BioMed Central*. 2019; 13 (S1): 19.
 7. Panigrahi P, Bamford P, Horvath K, Morris JG, Gewolb IH. *Escherichia coli* transcytosis in a Caco-2 cell model: implications in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res Nature Publishing Group*. 1996; 40 (3): 415–21.
 8. Rubio APD, Martínez J, Palavecino M, Fuentes F, López CMS, Marcilla A, et al. Transcytosis of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model. *Sci Rep Nature Publishing Group*. 2020; 10 (1): 3120.
 9. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe*. 2015; 17 (5): 662–71.
 10. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*. 2017; 19 (3): 210–21.
 11. Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen T-G. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett. John Wiley & Sons, Ltd*. 2010; 584 (12): 2626–34.
 12. Moisenovich M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe H, Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol*. 2002; 81 (10): 529–38.
 13. Khaustova NA, Maltseva DV, Oliveira-Ferrer L, Stürken C, Milde-Langosch K, Makarova JA, et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*. 2017; 142: 197–206.
 14. Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the $\alpha 5$ laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie*. 2020; 174: 107–16.
 15. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 7: 474.
 16. Tonevitsky AG, Agapov II, Shamshiev AT, Temyakov DE, Pohl P, Kirpichnikov MP. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett*. 1996; 392 (2): 166–8.
 17. Moisenovich M, Tonevitsky A, Maljuchenko N, Kozlovskaya N, Agapov I, Volkmandt W, et al. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol*. 2004; 121 (6): 429–39.
 18. Agapov II, Tonevitsky AG, Moysenovich MM, Maluchenko NV, Weyhenmeyer R, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 1999; 452 (3): 211–4.
 19. Agapov II, Tonevitsky AG, Maluchenko NV, Moisenovich MM, Bulah YS, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Lett*. 1999; 464 (1–2): 63–6.
 20. Pohl P, Antonenko YN, Evtodienko VY, Pohl EE, Saparov SM, Agapov II, et al. Membrane fusion mediated by ricin and viscumin. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1371 (1): 11–6.
 21. Kudriaeva A, Galatenko V, Maltseva D, Khaustova N, Kuzina E, Tonevitsky A, et al. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-Gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules*. 2017; 22 (5): 808.
 22. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011; 17 (1): 10.
 23. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40 (1): 37–52.
 24. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15 (12): 550.
 25. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (D1): D239–45.
 26. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018; 13 (10): e0206239.
 27. Flora AD, Teel LD, Smith MA, Sinclair JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Ricin crosses polarized human intestinal cells and intestines of ricin-gavaged mice without evident damage and then disseminates to mouse kidneys. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e69706.
 28. Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect*. 2008; 10 (4): 424–31.
 29. Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17 (3): 169–83.
 30. Lo CC, Coschigano KT. ApoB48 as an efficient regulator of intestinal lipid transport. *Front Physiol*. 2020; 11: 796.

ИЗМЕНЕНИЯ В СТЕНКЕ ЖЕЛУДКА ПОСЛЕ ГАСТРОПЛИКАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С МОРБИДНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

О. В. Галимов, В. О. Ханов [✉], Р. А. Зиангиров, Е. С. Галимова, Д. М. Минигалин, Д. О. Галимов

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Морбидное ожирение — самостоятельное заболевание, ведущее к метаболическим нарушениям и развитию многих серьезных хронических заболеваний, поэтому его эффективное лечение является актуальной проблемой современной медицины. На сегодняшний день морбидное ожирение и ассоциированные с ним заболевания представляют собой все возрастающую проблему, связанную со значительным риском заболеваемости и смертности. Целью исследования было изучить морфофункциональные изменения в стенке желудка после выполнения гастропликации в новом варианте, разработанном на базе кафедры хирургических болезней и новых технологий Башкирского государственного медицинского университета. Гастропликацию выполнили 15 кроликам-самцам породы «Серый великан» в возрасте 12–16 месяцев, весившим 3050–5380 г. Животных выводили из эксперимента через 3, 6 и 12 месяцев с последующим гистологическим изучением стенки пликированного участка желудка. Изменения, происходившие в слизистой и мышечном слое стенки желудка после гастропликации, носили адаптивный характер и не сопровождалась серьезными морфологическими нарушениями. Это позволило применить способ в клинической практике у 15 пациентов с морбидным ожирением, 9 женщин и 6 мужчин в возрасте $42 \pm 2,1$ лет. В дальнейшем у большинства (13 пациентов, 86,7%) удалось достичь стойкого снижения массы тела в течение первых 2–12 месяцев. Отдаленные результаты лечения отслеживали в течение двух лет. Было установлено, что разработанная методика лапароскопической гастропликации не вызывает патологических изменений стенки желудка в пликированной ее части, поэтому ее можно применять в клинической практике для лечения пациентов с морбидным ожирением как технически простую и экономически эффективную.

Ключевые слова: бариатрическая хирургия, гастропликация, клинико-экспериментальная работа, операции на кроликах, лапароскопические вмешательства

Вклад авторов: О. В. Галимов, В. О. Ханов — концепция и дизайн исследования; В. О. Ханов, Р. А. Зиангиров, Е. С. Галимова — планирование исследования; Д. М. Минигалин, Д. О. Галимов, Е. С. Галимова — анализ литературы; Р. А. Зиангиров, Д. М. Минигалин, Д. О. Галимов — сбор и обработка данных; Е. С. Галимова, Д. М. Минигалин — статистическая обработка; О. В. Галимов, В. О. Ханов, Д. М. Минигалин — интерпретация данных; Д. М. Минигалин, Д. О. Галимов — подготовка рукописи; О. В. Галимов, В. О. Ханов, Р. А. Зиангиров — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: клиническая работа одобрена этическим комитетом Клиники ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (протокол № 47 от 29 мая 2020 г.). Добровольное информированное согласие получено от всех участников исследования или их законных представителей. Условия содержания животных и работы с ними соответствовали принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, директиве Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденным приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23 августа 2010 г.

✉ **Для корреспонденции:** Владислав Олегович Ханов
ул. Султанова, д. 24, кв. 24, г. Уфа, 450076; khanovv@mail.ru

Статья получена: 12.06.2020 **Статья принята к печати:** 26.06.2020 **Опубликована онлайн:** 13.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.041

STOMACH WALL CHANGES AFTER GASTROPLICATION IN PATIENTS WITH MORBID OBESITY

Galimov OV, Khanov VO [✉], Zianguirov RA, Galimova ES, Minigalin DM, Galimov DO

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Morbid obesity is a distinct disorder which leads to metabolic disorders and to the development of many severe chronic diseases, therefore, the effective treatment of the disorder is an urgent problem of modern medicine. Currently, morbid obesity and the corresponding disorders are a growing problem associated with a significant risk of morbidity and mortality. The study was aimed to assess the morphological and functional changes in the stomach wall after gastroplication performed by the new method worked out in the Clinic of the Department of Surgical Diseases and New Technologies of the Bashkir State Medical University. Gastroplication was performed in 15 male rabbits of the Gray Giant breed aged 12–16 months weighting 3050–5380 g. The animals were withdrawn from the experiment 3, 6 and 12 months after surgery, followed by histological examination of the stomach wall plicated section. Changes in the mucous membrane and the muscle layer of the stomach wall after gastroplication were adaptive and associated with no severe morphological impairment. That made it possible to use the method in clinical practice in 15 patients with morbid obesity, 9 women and 6 men aged 42 ± 2.1 . In most patients (13 people, 86.7%), a steady decrease in the body weight was achieved during the first 2–12 months. Long-term treatment results had been tracked during two years. It has been confirmed, that the new laparoscopic gastroplication technique does not lead to pathological changes in the stomach wall plicated section, therefore, the simple and cost-effective method may be used in clinical practice for treatment of patients with morbid obesity.

Keywords: bariatric surgery, gastroplication, clinical and experimental studies, operations on rabbits, laparoscopic surgery

Author contribution: Galimov OV, Khanov VO — study concept and design; Khanov VO, Zianguirov RA, Galimova ES — study planning; Minigalin DM, Galimov DO, Galimova ES — literature analysis; Zianguirov RA, Minigalin DM, Galimov DO — data acquisition and processing; Galimova ES, Minigalin DM — statistical analysis; Galimov OV, Khanov VO, Minigalin DM — data interpretation; Minigalin DM, Galimov DO — manuscript preparation; O. V. Galimov, V. O. X Galimov OV, Khanov VO, Zianguirov RA — editing.

Compliance with ethical standards: the clinical study was approved by the Ethics Committee of the Bashkir State Medical University Clinic (protocol № 47 dated May 29, 2020). The informed consent was submitted by all patients or their legal representatives. The animals were treated in strict compliance with the Declaration of Helsinki, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council (September 22, 2010) on the protection of animals used for scientific purposes, and Good Laboratory Practice guidelines established by the Order 708n of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (August 23, 2010).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav O. Khanov
Sultanova, 24-24, Ufa, 450076; khanovv@mail.ru

Received: 12.06.2020 **Accepted:** 26.06.2020 **Published online:** 13.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.041

В последние годы во всех странах со стороны врачей различных специальностей растет интерес к проблеме метаболических нарушений. По некоторым данным, около 250 млн человек страдают ожирением, что составляет примерно 7% взрослого населения земного шара. По данным ВОЗ, в развитых странах избыточную массу тела имеет порядка трети (33,3%) населения [1, 2]. Последствиями метаболического синдрома как осложнения ожирения являются значительное сокращение продолжительности жизни и снижение ее качества. При этом существенно повышается риск развития глубоких метаболических нарушений в виде сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, что приводит к увеличению показателей смертности у больных в возрасте до 40 лет в 12 раз. Большинство современных исследователей признает, что консервативное лечение крайних степеней ожирения — задача чрезвычайно трудная и для 90–95% пациентов невыполнимая [3–5].

Многие авторы обосновывают необходимость использования мощного ресурса разнообразных хирургических методов для коррекции сопутствующих ожирению патологических изменений стремительным ростом числа больных ожирением и значительным увеличением расходов на их лечение [6, 7]. Применение хирургических методик лечения пациентов с метаболическим синдромом является самым эффективным способом борьбы с морбидным ожирением, особенно на фоне осложнений заболевания. Оно требует особого подхода, как в предоперационной подготовке, так и в интра- и послеоперационном ведении, что связано с наличием неизменно выявляемой у пациентов сопутствующей патологии жизненно важных органов и систем организма [8–10].

В бариатрической хирургии известна операция, предусматривающая уменьшение объема желудка за счет инвагинации в его просвет части желудочной стенки (создания складки за счет гофрирующих серозно-мышечных швов) вдоль всего желудка [11, 12]. Группой авторов опубликован 12-летний опыт применения лапароскопической гастропликации в больницах Лалех и Сина (Иран) у более чем 800 пациентов [13, 14]. Однако на сегодняшний день нет литературных данных по морфологическим изменениям, происходящим в желудочной стенке после гастропликации, и актуальность таких исследований не вызывает сомнений [15].

В клинике хирургических болезней Башкирского государственного медицинского университета с 2003 г. проводят лечение морбидного ожирения и метаболического синдрома хирургическим путем. В течение длительного периода применяли многие общепризнанные методики, а также вели разработку собственных оригинальных методов лечения. Разнообразные инвазивные бариатрические процедуры были выполнены 165 пациентам, у которых индекс массы тела (ИМТ) превышал 35 кг/м². В последние годы предпочтение отдавали применению рестриктивных методик, в частности, рукавной («sleeve») резекции желудка, выполняемой преимущественно в лапароскопическом варианте.

Альтернативой рукавной резекции желудка, направленной на уменьшение объема органа, является операция присбаривания желудка (гастропликация). Нами предложен новый метод лапароскопической гастропликации для хирургического лечения пациентов с морбидным ожирением. Суть метода заключается в уменьшении объема желудка за счет вворачивания (инвагинации) в его просвет с помощью специальных инструментов части желудочной стенки (создания складки за счет гофрирующих серозно-мышечных швов) вдоль всего желудка (рис. 1). Объем желудка значительно уменьшается, и пациент начинает испытывать чувство насыщения при приеме пищи значительно быстрее, чем до операции. Технического результата достигают тем, что желудок после его мобилизации по большой кривизне с помощью специально разработанного инструмента, кишечного зажима, сворачивают в трубочку в виде «рулета» и фиксируют нерассасывающейся нитью. При этом с использованием специального калибровочного желудочного зонда добиваются уменьшения объема желудка до 50 мл [16].

Многие авторы, отмечая очевидные преимущества гастропликации в лечении ожирения (простота выполнения, экономическая эффективность), в то же время выделяют риски и неопределенность, связанные с морфофизиологическим состоянием желудочной стенки в области гастропликации [7, 12].

Целью настоящего исследования было изучить морфофункциональные изменения в стенке желудка после выполнения гастропликации в новом варианте, разработанном на клинической базе кафедры

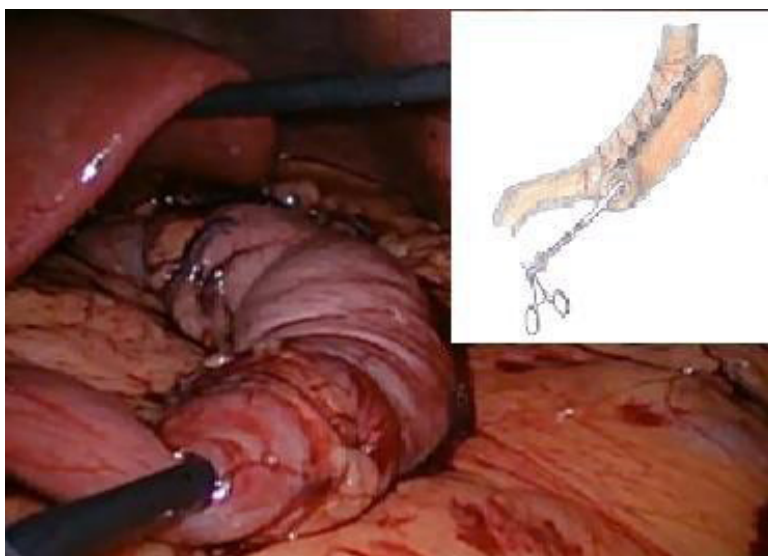


Рис. 1. Новая операция «гастропликация сворачиванием желудка»

хирургических болезней и новых технологий Башкирского государственного медицинского университета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки гистологической картины инвагинированной части желудка и выявления изменений, способных вызвать осложнения в послеоперационном периоде, в рамках клинко-экспериментального исследования на базе ветеринарной клиники Башкирского государственного аграрного университета в 2017–2020 гг. была проведена экспериментальная работа, в ходе которой было прооперировано 15 кроликов [10]. Все кролики — самцы породы «Серый великан» в возрасте 12–16 месяцев. Вес кроликов варьировал от 3050 до 5380 г. Критерии включения в исследование: возраст 12–16 месяцев, мужской пол, вес не менее 3 кг. Критерии исключения: наличие каких-либо заболеваний, перенесенные ранее операции на животе, вес менее 3 кг, женский пол, участие животного в каком-либо другом эксперименте.

За два дня до операции кроликов отсаживали в отдельные клетки, они получали только воду для эвакуации содержимого из желудка. Всем кроликам была выполнена операция гастропликации. Время операции составило 12–19 мин (в среднем 14,5 мин). После трехкратной обработки операционного поля спиртовым раствором хлоргексидина под комбинированной анестезией (тилетамин, золазепам, ксилазина гидрохлорид) выполнена верхне-срединная лапаротомия. Визуализирован желудок размерами 5,0 x 9,0 см. Произведена мобилизация желудка по большой кривизне. Далее зажимом желудок фиксирован за противобрыжеечный край, свернут в «рулет», наложены серозно-мышечные швы, послойные швы на рану.

В послеоперационном периоде кролики находились под наблюдением в отдельных клетках, на третьи сутки после операции в питание вводили зерно, на 5–6-е сутки сено и траву. Кроликам внутримышечно вводили растворы 5% глюкозы, 0,9% физиологического раствора в объеме 20 мл, витамин В12 по 0,5 мл, биомидин 0,1 г 2 раза в сутки.

Через три и шесть месяцев после первых операций с проведением соответствующей подготовки и в аналогичных условиях было выполнено повторное оперативное вмешательство — резекция пликированной части желудка. Резецированную часть поместили в 10%-й раствор формалина и отправили на гистологическое исследование. Забор материала также проводили через 6–12 месяцев после выполнения операции гастропликации.

Для гистологических исследований из пликированной части желудка (из различных его отделов) брали кусочек ткани размером 1x1 см, содержащий все слои стенки органа. Взятый биопсийный материал фиксировали в 10%-м формалине и после гистологической проводки изготавливали срезы толщиной 7 мкм. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Описанный способ в клинической практике был применен у 15 пациентов с морбидным ожирением, сопровождающимся развитием метаболического синдрома. Выборка включала пациентов старше 18 лет с ИМТ 35–45 кг/м². Среди них было 9 женщин и 6 мужчин в возрасте 42 ± 2,1 года. Критерии отбора пациентов были очень строгими, гастропликация была выбрана для мотивированных пациентов, способных непрерывно соблюдать диету и выполнять физическую нагрузку после операции.

Критериями включения в исследование были повышенный ИМТ (> 35 кг/м²) с сопутствующей коморбидной патологией

и возраст старше 18 лет. Для пациентов был выбран ряд критериев исключения, направленных на повышение однородности прооперированной группы пациентов. Критерии исключения: хронические заболевания в стадии обострения или декомпенсации, перенесенный инфаркт миокарда или нарушение мозгового кровообращения, возраст до 18 лет, психологические или психические нарушения, отсутствие триггера снижения веса.

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с использованием приложения Microsoft Excel (Microsoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В раннем послеоперационном периоде у трех кроликов возникли осложнения в форме диспепсии (отказывались от еды и воды) и вялости. При дальнейшем наблюдении на 3–4-й день кролики начали пить воду. Постепенно начали употреблять твердую пищу. Умерших в ходе клинко-экспериментальной работы кроликов не было.

При исследовании материала, отобранного через три месяца, макроскопическая картина была без явных патологических изменений, отмечены невыраженные

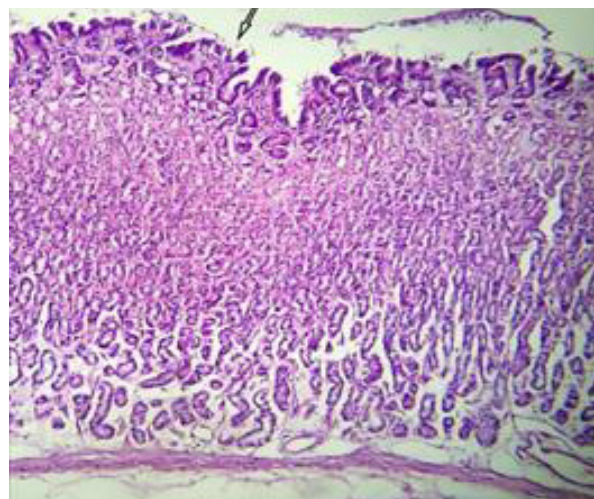


Рис. 2. Препарат неизменной слизистой желудка (окраска гематоксилином и эозином), увеличение 40–64х

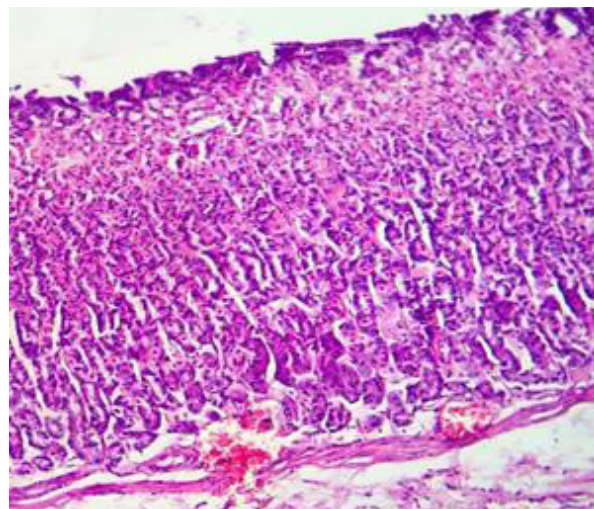


Рис. 3. Препарат слизистой желудка из пликированной части, полученный через три месяца после операции (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40–64х). Дистрофические изменения покровно-ямочного эпителия (однослойного призматического железистого эпителия)

рубцовые и склеротические изменения в инвагинированной части желудка, не мешавшие развернуть пликированную часть при рассечении шовного материала. При микроскопическом исследовании срезов, по сравнению с неизменной частью желудка (рис. 2), в пликированной части желудка отмечены слабые дистрофические изменения покровно-ямочного эпителия (однослойного призматического железистого эпителия). Желудочные ямки мелкие, валики равномерно сглажены; слабая атрофия желез; слабая дистрофия эпителия желез; умеренный межклеточный отек стромы; мелкие слабые очаги склероза; очаговая скудная лимфоидная инфильтрация; сосуды с неравномерным кровенаполнением, в части стенок сосудов явления склероза; в просветах местами эритроциты; в подслизистом и мышечном слоях: явления отека, очаговые периваскулярные кровоизлияния; в единичных срезах встречались фрагменты шовного материала; серозная оболочка утолщена за счет неравномерных склеротических изменений и скудной очагово-лимфоидной инфильтрации (рис. 3).

Через шесть месяцев при исследовании материала макроскопическая картина была следующей: выраженные рубцовые изменения, невозможность развернуть инвагинированную часть желудка без повреждения или рассечения тканей острым путем. При микроскопическом гистологическом исследовании срезов отобранного материала, по сравнению с препаратами трехмесячной давности, были обнаружены выраженные дистрофические изменения покровно-ямочного эпителия в пликированной части желудка. Желудочные ямки и валики равномерно сглажены; умеренная атрофия желез; умеренная дистрофия эпителия желез; снижение межклеточного отека стромы; отмечено распространение очагов склероза в субэпителиальных отделах слизистой и стенках сосудов; очаговая скудная лимфоидная инфильтрация; в просветах местами эритроциты; в подслизистом и мышечном слоях явления отека снизились, отмечены очаги неравномерного склероза; фрагменты шовного материала не найдены; серозная оболочка утолщена за счет разрастания грубоволокнистой фиброзной ткани (рис. 4).

Первые результаты проведенных в Клинике оперативных вмешательств по предложенной методике показали, что в раннем послеоперационном периоде осложнений в исследуемой группе не наблюдалось. В дальнейшем у большинства (13 пациентов, 86,7%) было достигнуто стойкое снижение массы тела в течение первых 2–12 месяцев. Следует отметить, что у двух пациентов (13,3%) не удалось добиться стойкого результата. После снижения массы тела на протяжении трех месяцев была отмечена отрицательная динамика, пациенты снова начали набирать вес. Отдаленные результаты были отслежены у пяти пациентов (33,3%) в сроки до 24 месяцев. В двух наблюдениях произошли снижение веса и его стабилизация на приемлемых для пациента показателях. В трех случаях после снижения веса вновь отмечали набор веса, корректируемый терапевтическими методами. При контрольном осмотре пациентам проводили дополнительное инструментальное обследование для контроля состояния гастропликационной трубки (фиброгастродуоденоскопия, рентгенография желудка с контрастированием, при необходимости компьютерная томография). Каких-либо отклонений от нормы в области оперированного желудка, осложнений, связанных с функционированием органов пищеварения, отмечено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По мнению ряда авторов [13, 14], лапароскопическая гастропликация не менее эффективна, чем другие рестриктивные методы, направленные на снижение веса. Кроме того, рассмотренный метод обладает рядом преимуществ: он существенно дешевле, дает меньше осложнений (0,6%), за последние 12 лет зафиксирован только 31% случаев с повторным набором веса, простой план восстановления. В случае необходимости метод может быть обратимым, он также не исключает применение дополнительных методов мальабсорбции (двухэтапная операция) в случае недостаточной потери веса [14]. Однако на сегодня отсутствуют литературные данные по морфологическим изменениям в желудочной стенке после гастропликации. Проведенные исследования показали, что изменения, которые имеют место в слизистой и мышечном слое стенки желудка после гастропликации, носят адаптивный характер и не сопровождаются серьезными морфологическими нарушениями.

При выборе вида оперативного вмешательства следует исходить из того, что пациентам нужен потенциальный триггер для похудения, каковым является гастропликация. Как показывают наши наблюдения, гастропликация эффективна в отношении сохранения рациона питания в течение нескольких лет. В послеоперационном периоде в сроки до одного года восьми прооперированным пациентам (53,3%) удалось провести комплексное обследование, включавшее фиброгастроскопию, рентгеноскопию желудка и двенадцатиперстной кишки с контрастированием, компьютерную томографию органов брюшной полости. По результатам данных дообследования было установлено, что объем пликированного желудка был меньше по сравнению с дооперационными показателями. Каких-либо нарушений пассажа пищи и ее переваривания или связанных с вмешательством патологических изменений органов брюшной полости отмечено не было.

Небольшое количество наблюдений и малые сроки наблюдения не позволяют пока говорить о достоверных результатах лечения, но представляют практический интерес ввиду низкой себестоимости и «технической простоты» выполнения одного из признанных видов оперативных пособий в метаболической хирургии при морбидном ожирении.

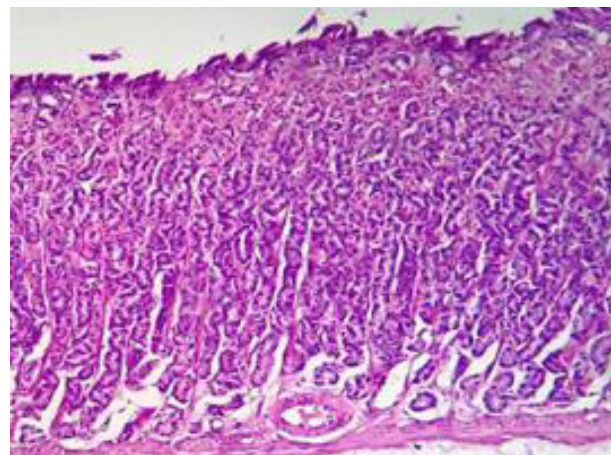


Рис. 4. Препарат слизистой желудка из пликированной части, полученный через 6 месяцев после операции (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 40х–64х). Выраженные дистрофические изменения покровно-ямочного эпителия, равномерно сглаженные желудочные ямки и валики; умеренная атрофия желез

ВЫВОДЫ

В результате проведенного бариатрического вмешательства у пациентов с морбидным ожирением происходит снижение массы тела. Экспериментальные исследования показали, что изменения в слизистой и мышечном слое стенки желудка после гастропликации носят адаптивный характер

и не сопровождаются серьезными морфологическими нарушениями. Изучение клинических результатов применения предложенной методики при лечении больных морбидным ожирением позволяет считать ее достаточно эффективной, простой и позволяющей улучшить исход лечения пациентов с избыточной массой тела и ожирением.

Литература

- Fried M, Yumuk V, Oppert JM, et al. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg.* 2014; 24 (1): 42–55. DOI: 10.1007/s11695-013-1079-8.
- Borz C, Bara TJ, Bara T, et al. Laparoscopic gastric plication for the treatment of morbid obesity by using real-time imaging of the stomach pouch. *Ann Ital Chir.* 2017; 6: 392–8. PMID: 29197192.
- Феденко В. В., Евдошенко В. В., Курганов И. А., Емельянов С. И., Матвеев Н. Л., Богданов Д. Ю., Мазикина Л. Н. Сравнительный анализ эффективности лапароскопической рукавной резекции желудка и лапароскопического желудочного шунтирования у больных с сахарным диабетом 2-го типа и нарушением толерантности к глюкозе. *Эндоскопическая хирургия.* 2016; 2: 21–31.
- Яшков Ю. И., Луцевич О. Э., Бордан Н. С., Ивлева О. В. Эффективность лапароскопической продольной резекции желудка у больных ожирением. *Ожирение и метаболизм.* 2015; 12 (1): 20–8.
- Zerweck C, Rodríguez JG, Aramburo E, et al. Revisional surgery following laparoscopic gastric plication. *Obes Surg.* 2017; 27 (1): 38–43. DOI: 10.1007/s11695-016-2242-9.
- Анищенко В. В., Семенов С. А., Хальзов А. В. Выбор метода операции при ожирении. *Альманах Института хирургии им. А. В. Вишневского.* 2012; 7 (1): 130–1.
- Brethauer SA, Harris JL, Kroh M, Schauer PR: Laparoscopic gastric plication for treatment of severe obesity. *Surg Obes Relat Dis.* 2011; 7: 15–22.
- Галимов О. В., Ханов В. О., Габдулсабиров З. Р. Результаты хирургических операций и качества жизни пациентов после различных вариантов бариатрических вмешательств. *Креативная хирургия и онкология.* 2011; 1: 39–44.
- Pujol Gebelli J, Garcia Ruiz de Gordejuela A, Casajoana Badia A, Secanella Medayo L, Vicens Morton A, Masdevall Noguera C. Laparoscopic Gastric Plication: a new surgery for the treatment of morbid obesity. *Cir Esp.* 2011; 89 (6): 356–61.
- Сковородин Е. Н., Вехновская Е. Г. Руководство к лабораторным занятиям по патологической анатомии животных. Уфа: Башкирский государственный аграрный университет, 2015 (3-е издание, переработанное и дополненное); 258 с.
- Аскерханов Р. Г., Хатьков И. Е., Бодунова Н. А., Фейдоров И. Ю., Петрова А. Л., Садыки М. Н. Первый опыт лапароскопической гастропликации у пациентов с морбидным ожирением. *Эндоскопическая хирургия.* 2017; 1: 6–9.
- Perivoliotis K, Sioka E, Katsogridaki G, Zacharoulis D. Laparoscopic gastric plication versus laparoscopic sleeve gastrectomy: an up-to-date systematic review and meta-analysis. *J Obes.* 2018; 9: 3617458. DOI: 10.1155/2018/3617458.
- Heidari R, Talebpour M, Soleyman-Jahi S, Zeinoddini A, Sanjari Moghaddam A, Talebpour A. Outcomes of reoperation after laparoscopic gastric plication failure. *Obes Surg.* 2019; 29 (2): 376–86. DOI: 10.1007/s11695-018-3522-3.
- Talebpour, et al. Twelve year experience of laparoscopic gastric plication in morbid obesity: development of the technique and patient outcomes. *Annals of Surgical Innovation and Research.* 2012; 6: 7. Available from: <http://www.asir-journal.com/content/6/1/7>.
- Khidir N, Al Dhaheri M, El Ansari W, Al Kuwari M, Sargsyan D, Bashah M. Outcomes of laparoscopic gastric greater curvature plication in morbidly obese patients. *J Obes.* 2017; 2017: 7989714. DOI: 10.1155/2017/7989714.
- Галимов О. В., Ханов В. О., Сагитдинов Р. Р., Сайфуллин Р. Р. и др. Способ хирургического лечения избыточной массы тела и ожирения. Патент РФ № RU 2654572 C1. 21.05.2018.
- Fried M, Yumuk V, Oppert JM, et al. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg.* 2014; 24 (1): 42–55. DOI: 10.1007/s11695-013-1079-8.
- Borz C, Bara TJ, Bara T, et al. Laparoscopic gastric plication for the treatment of morbid obesity by using real-time imaging of the stomach pouch. *Ann Ital Chir.* 2017; 6: 392–8. PMID: 29197192.
- Fedenko VV, Evdoshenko VV, Kurganov IA, Emeljanov SI, Matveev NL, Bogdanov DJu, Mazikina LN. Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti laparoskopicheskoy rukavnoj rezekcii zheludka i laparoskopicheskogo zheludochного shuntirovaniya u bol'nyh s saharnym diabetom 2-go tipa i narusheniem tolerantnosti k gljukeze. *Jendoskopicheskaja hirurgija.* 2016; 2: 21–31. Russian.
- Jashkov Jul, Lucevich OJe, Bordan NS, Ivleva OV. Jefferktivnost' laparoskopicheskoy prodol'noj rezekcii zheludka u bol'nyh ozhireniem. *Ozhirenie i metabolizm.* 2015; 12 (1): 20–8. Russian.
- Zerweck C, Rodríguez JG, Aramburo E, et al. Revisional surgery following laparoscopic gastric plication. *Obes Surg.* 2017; 27 (1): 38–43. DOI: 10.1007/s11695-016-2242-9.
- Anishhenko VV, Semenov SA, Halzov AV. Vybory metoda operacii pri ozhireнии. *Al'manah Instituta hirurgii im. A.V. Vishnevskogo.* 2012; 7 (1): 130–1. Russian.
- Brethauer SA, Harris JL, Kroh M, Schauer PR: Laparoscopic gastric plication for treatment of severe obesity. *Surg Obes Relat Dis.* 2011; 7: 15–22.
- Galimov OV, Hanov VO, Gabdulsabirova ZR. Rezul'taty hirurgicheskikh operacij i kachestva zhizni pacientov posle razlichnykh variantov bariatricheskikh vmeshatel'stv. *Kreativnaja hirurgija i onkologija.* 2011; 1: 39–44. Russian.
- Pujol Gebelli J, Garcia Ruiz de Gordejuela A, Casajoana Badia A, Secanella Medayo L, Vicens Morton A, Masdevall Noguera C. Laparoscopic Gastric Plication: a new surgery for the treatment of morbid obesity. *Cir Esp.* 2011; 89 (6): 356–61.
- Skovorodin EN, Vehnovskaja EG. Rukovodstvo k laboratornym zanjatijam po patologicheskoy anatomii zhivotnyh. Ufa: Bashkirskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2015 (3-e izdanie, pererabotannoe i dopolnennoe); 258 pp. Russian.
- Askerhanov RG, Hatkov IE, Bodunova NA, Fejdorov IJu, Petrova AL, Sadyki MN. Pervyj opyt laparoskopicheskoy gastroplicacii u pacientov s morbidnym ozhireniem. *Jendoskopicheskaja hirurgija.* 2017; 1: 6–9. Russian.
- Perivoliotis K, Sioka E, Katsogridaki G, Zacharoulis D. Laparoscopic gastric plication versus laparoscopic sleeve gastrectomy: an up-to-date systematic review and meta-analysis. *J Obes.* 2018; 9: 3617458. DOI: 10.1155/2018/3617458.
- Heidari R, Talebpour M, Soleyman-Jahi S, Zeinoddini A, Sanjari Moghaddam A, Talebpour A. Outcomes of reoperation after laparoscopic gastric plication failure. *Obes Surg.* 2019; 29 (2): 376–86. DOI: 10.1007/s11695-018-3522-3.

References

376–86. DOI: 10.1007/s11695-018-3522-3.

14. Talebpour, et al. Twelve year experience of laparoscopic gastric plication in morbid obesity: development of the technique and patient outcomes. *Annals of Surgical Innovation and Research*. 2012; 6: 7. Available from: <http://www.asir-journal.com/content/6/1/7>.
15. Khidir N, Al Dhaheri M, El Ansari W, Al Kuwari M, Sargsyan D, Bashah M. Outcomes of laparoscopic gastric greater curvature plication in morbidly obese patients. *J Obes*. 2017; 2017: 7989714. DOI: 10.1155/2017/7989714.
16. Galimov OV, Hanov VO, Sagitdinov RR, Sajfullin RR, et al. Method of surgical treatment of overweight and obesity. Russian Federation patent № RU 2654572 C1. 21.05.2018.

КОНЦЕПЦИЯ ИНФОРМАЦИОННОЙ МОДЕЛИ СИСТЕМЫ РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

П. А. Рыбакова¹, Ю. И. Королева¹, Г. Е. Иванова², Т. В. Зарубина¹

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

² «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

В настоящее время происходит активное внедрение новой модели оказания помощи больному с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК). В связи с этим стоит множество задач, касающихся цифровизации этого процесса. Целью исследования было разработать информационную модель системы реабилитации пациентов с ОНМК на первом этапе оказания помощи. С помощью методов системного анализа, моделирования бизнес-процессов и на основании изучения нормативно-правовых актов, клинических рекомендаций, протокола пилотного проекта «Развитие медицинской реабилитации в РФ» и результатов работы экспертов проблемной области выделены и проанализированы основные объекты информационной модели системы реабилитации: пациент, МИС МО, документооборот, описаны их свойства и взаимоотношения, построена информационная модель и обозначено направление ее развития.

Ключевые слова: информационная модель, цифровизация здравоохранения, медицинская реабилитация, острое нарушение мозгового кровообращения, электронный документооборот

Благодарности: заведующей отделением медицинской реабилитации пациентов с нарушением функции центральной нервной системы ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России Марии Анатольевне Булатовой за консультацию и активное участие в работе.

Вклад авторов: П. А. Рыбакова — работа с литературой, анализ результатов, формулировка выводов, оформление рукописи; Ю. И. Королева — анализ результатов, формулировка выводов; Г. Е. Иванова — консультация, подготовка рукописи; Т. В. Зарубина — подготовка рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Полина Алексеевна Рыбакова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, polina240895@rambler.ru

Статья получена: 25.07.2020 **Статья принята к печати:** 22.08.2020 **Опубликована онлайн:** 31.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.051

INFORMATION MODEL OF POST STROKE REHABILITATION CONCEPTION

Rybakova PA¹, Koroleva Yul¹, Ivanova GE², Zarubina TV¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Currently, the new model of stroke care is actively implemented. There is a number of problems thereby related to digitalization. The study was aimed to work up the information model of the post-stroke rehabilitation at the first stage. The following basic objects of the rehabilitation system information model were identified and described using system analysis and business process modelling, based on studying laws, regulatory and legal acts, clinical guidelines, the "Development of the System of Medical Rehabilitation in Russia" pilot project protocol, and the problem area experts' findings: patient, health information system (HIS) of a healthcare organization, document management. The objects' properties and interaction are discussed, the information model is been constructed, main directions are described.

Keywords: information model, healthcare digitalization, medical rehabilitation, acute stroke, electronic document management

Acknowledgements: to Maria A. Bulatova, head of the Department of Patients With Central Nervous System Disorders Medical Rehabilitation of the Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, for counseling and strong support.

Author contribution: Rybakova PA — literature analysis, analysis of the results, drawing conclusions, manuscript writing; Koroleva Yul — analysis of the results, drawing conclusions; Ivanova GE — counseling, manuscript writing; Zarubina TV — manuscript writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Polina A. Rybakova
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997; polina240895@rambler.ru

Received: 25.07.2020 **Accepted:** 22.08.2020 **Published online:** 31.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.051

Одним из путей повышения качества медицинской помощи пациентам с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) является информатизация (цифровизация) системы оказания медицинской помощи — проведение комплекса мероприятий, направленных на своевременное и полное обеспечение участников лечебно-диагностического процесса необходимой информацией, определенным образом переработанной и преобразованной [1].

В рамках национального проекта «Здравоохранение» 1 января 2019 г. был запущен федеральный проект «Цифровой контур здравоохранения» [2], основными направлениями которого являются внедрение и развитие медицинских информационных систем и электронного медицинского документооборота между всеми медицинскими организациями и органами управления здравоохранением. На решение задач, касающихся

цифровизации здравоохранения, частично нацелен и федеральный проект «Развитие сети национальных медицинских исследовательских центров и внедрение инновационных медицинских технологий», в рамках которого разрабатываются четыре вертикально интегрированные системы по профилям «онкология», «сердечно-сосудистые заболевания», «акушерство и гинекология» и «неонатология», «профилактика». Они должны обеспечить преемственность медицинской помощи, маршрутизацию пациентов, мониторинг оказания медицинской помощи по отдельным профилям заболеваний.

Важным этапом всех четырех профилей является медицинская реабилитация. До недавнего времени разработки в рамках цифровизации медицинской реабилитации носили локальный характер, тогда как для построения информационной системы федерального

уровня необходим всесторонний анализ предметной области и поэтапное построение информационной модели.

Целью работы было проанализировать модель оказания помощи больным с ОНМК путем выделения и описания основных объектов информационной модели и определения перспектив ее развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основными документами, регламентирующими существующий порядок оказания помощи, являются Приказ МЗ РФ от 15.11.2012 № 928н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения» и Приказ Минздрава России от 29.12.2012 № 1705н «О порядке организации медицинской реабилитации». Для ознакомления с новой моделью оказания помощи использовали описание пилотного проекта «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации» (2015–2016 гг.). Более детально действия по оказанию медицинской помощи описаны в российских и зарубежных клинических рекомендациях [3–11]. Для изучения Международной классификации функционирования и ее применения использовали документы Всемирной организации здравоохранения [12–15]. При построении алгоритмов, описывающих движение пациента в специализированном отделении, и для описания объектов информационной модели использовали специализированное прикладное программное обеспечение MS VISIO 2010 (Microsoft; США), Axure RP 9 (Axure; США), draw.io (Voodoo; Франция), методы системного анализа (анализ проблемной ситуации, формирование целей и функций системы, моделирование), а также методологию моделирования бизнес-процессов (диаграмму вариантов использования).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Границы предметной области

Первым этапом построения информационной модели является определение границ предметной области, а именно описание сути медицинской реабилитации после ОНМК. Она включает в себя диагностику состояния пациента, формирование целей реабилитации и программы мероприятий, медикаментозную и немедикаментозную терапию, оценку эффективности реабилитации и прогнозирование. Учитывающая современные тенденции система оказания помощи состоит из трех этапов [16]. Первый этап реабилитации начинается с поступления пациента в палаты реанимации и интенсивной терапии специализированного сосудистого отделения медицинского учреждения и не позднее 24 ч от момента поступления, т. е. в острейший и острый периоды заболевания [16, 17]. Пациенту проводят клинические, лабораторные и инструментальные исследования с целью диагностики типа и подтипа инсульта, тромболитическую терапию и хирургические вмешательства по показаниям. Анестезиолог-реаниматолог контролирует витальные параметры пациента и, при необходимости, назначает консультации специалистов другого профиля. Совместно с членами мультидисциплинарной реабилитационной бригады в ОРИТ начинают проводить мероприятия по медицинской реабилитации: коррекцию дисфагии, нутритивной недостаточности, профилактику иммобилизационного синдрома (пассивную или активно-

пассивную вертикализацию, раннюю мобилизацию). После стабилизации состояния пациента его переводят в неврологическое отделение для больных с нарушением мозгового кровообращения, где его лечащий врач-невролог продолжает лечебно-диагностический процесс и организует мероприятия по медицинской реабилитации с мультидисциплинарной бригадой своего отделения. В переводном эпикризе из ОРИТ необходимо давать оценку функционирования пациента по Шкале реабилитационной маршрутизации (ШРМ), которая является критерием маршрутизации и выбора клинико-статистической группы для оказания помощи при медицинской реабилитации на всех последующих этапах [18, 19]. Оказание помощи при медицинской реабилитации в ОРИТ и отделении для больных с ОНМК — это первый этап реабилитации.

В зависимости от того, с каким функциональным результатом будет завершено лечение в сосудистом отделении, пациент может быть маршрутизирован для продолжения реабилитационного лечения в круглосуточные стационарные отделения медицинской реабилитации (ШРМ 4–5) второго этапа или отделения медицинской реабилитации дневных стационаров (ШРМ 3) и амбулаторные отделения медицинской реабилитации (ШРМ 2) третьего этапа медицинской реабилитации. Второй и третий этапы осуществляют в ранний и поздний восстановительный периоды, в период остаточных явлений заболевания или при хроническом течении заболевания вне обострения. Мероприятия третьего этапа медицинской реабилитации пациент может осуществлять и дома под дистанционным руководством ответственного специалиста с использованием телемедицинских технологий.

Начальный этап оказания помощи самый важный и трудный, так как требует незамедлительных действий. От проведенных на этом этапе мероприятий зависит динамика состояния пациента — известно, что чем раньше начаты реабилитационные мероприятия, тем они эффективнее [20], поэтому первый этап оказания помощи был взят как стартовый для построения информационной модели.

Объекты информационной модели

В настоящее время в России активно внедряют новую модель оказания помощи пациенту с ОНМК [18], ее алгоритм построен с учетом рекомендаций экспертов Федерального центра цереброваскулярной патологии и инсульта (рис. 1).

Основными ее отличиями от привычной модели являются пациентоориентированный подход, формулировка диагноза не только по международной классификации болезней (МКБ), но и по Международной классификации функционирования (МКФ), а также появление в лечебно-диагностическом процессе мультидисциплинарной бригады (МДБ), работу которой можно представить в виде реабилитационного цикла [21]. Такой способ представления позволяет оценить время появления и действия каждого лица, принимающего участие в лечебно-диагностическом процессе.

Для описания и анализа объекта «пациент» использовали диаграмму бизнес-процесса (BPD), более подробно описывающую маршрут пациента в специализированном отделении. Небольшой ее фрагмент представлен на рис. 2. На схеме горизонтальные «дорожки» обозначают подразделения медицинской организации и блоки (действия) с ключевыми точками маршрута.

После поступления пациента в неврологическое отделение происходит осмотр лечащим врачом — неврологом и всеми членами мультидисциплинарной команды, инструментальное

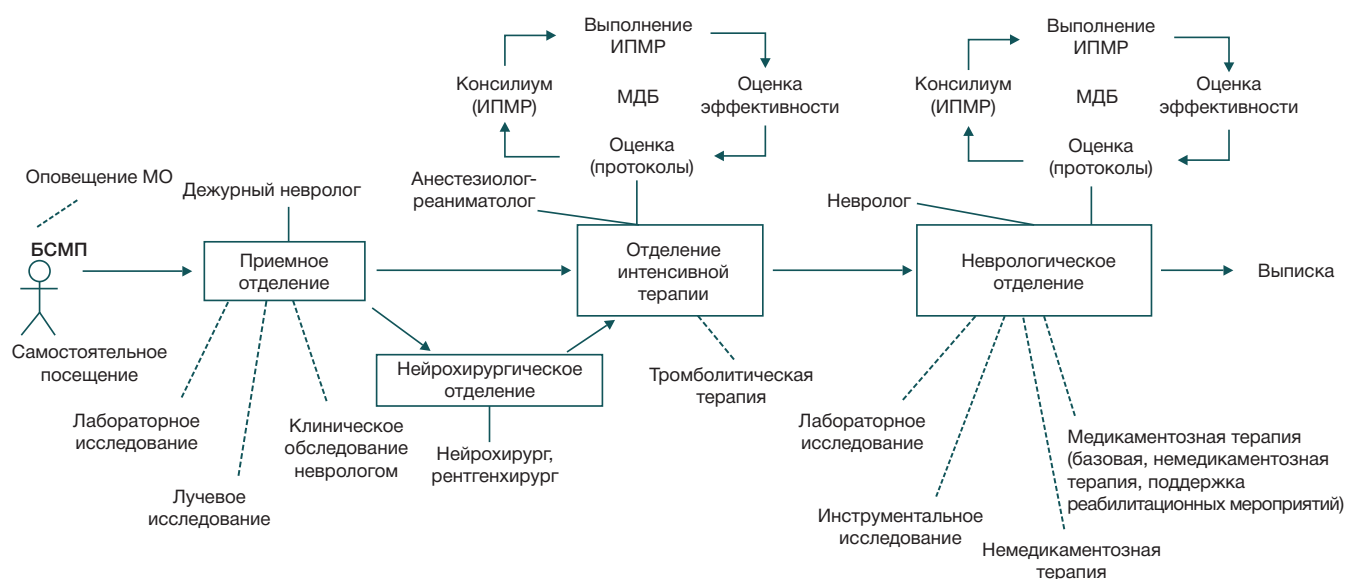


Рис. 1. Алгоритм оказания помощи, современная модель

исследование, дополнительное лабораторное исследование по показаниям и интерпретация результатов. Прямоугольником на рис. 2 обозначен реабилитационный цикл работы МДБ.

Другим важным объектом информационной модели системы реабилитации является медицинская информационная система организации (МИС МО). Она состоит из нескольких объединенных подсистем и содержит базовые автоматизированные рабочие места (АРМ). Однако базовая МИС МО не учитывает специфику работы стационара неврологического профиля по новой модели оказания помощи. Поэтому необходимо расширение ее функциональных возможностей, требуется разработка новых автоматизированных рабочих мест. В первую очередь это касается АРМ специалистов, входящих в состав МДБ: врача физической и реабилитационной медицины (ФРМ), анестезиолога-реаниматолога, специалиста по физической реабилитации, медицинского психолога, медицинского логопеда, эрготерапевта [18], а также АРМ младшего медицинского персонала.

Ведение электронного документооборота

Одна из главных функций АРМ — ведение электронного документооборота, формирование электронной

медицинской карты (ЭМК) пациента и профильных документов. Ниже приведен фрагмент ведения электронного документооборота на первом этапе реабилитации, основанный на алгоритме оказания помощи (рис. 3).

После обследования пациента каждый специалист МДБ формирует первый профильный документ — протокол обследования. Далее, на консилиуме МДБ, проходящем раз в 7 дней или чаще, на основании обсуждения и объединения полученных результатов, врач физической и реабилитационной медицины формулирует реабилитационный диагноз, долгосрочные и краткосрочные цели медицинской реабилитации, индивидуальную программу медицинской реабилитации (ИПМР), определяет исполнителей этой программы и формирует график выполнения мероприятий ИПМР. Всю полученную информацию вносят в общий протокол мультидисциплинарной бригады — второй профильный документ, часть макета которого представлена на рис. 4.

Оценку состояния пациента, полученную от разных специалистов бригады в категориях МКФ, выраженных в баллах, собирают в реабилитационный диагноз.

Третий профильный документ (расширенный выписной эпикриз) оформляет лечащий врач при завершении первого

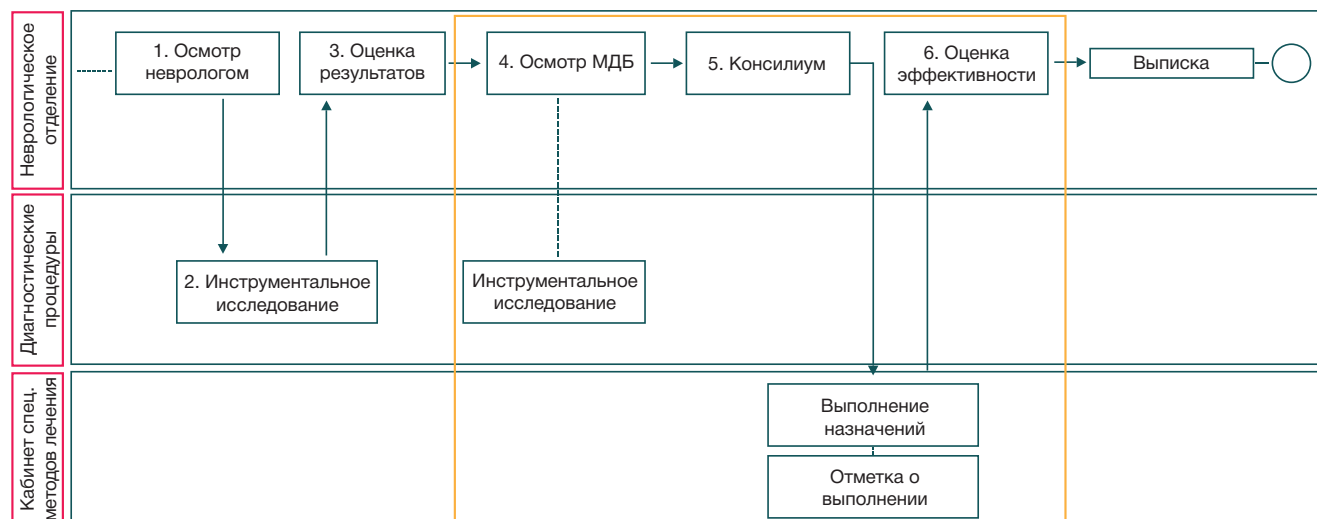


Рис. 2. Фрагмент маршрута пациента в неврологическом отделении

этапа реабилитации. Он содержит в себе клиническую информацию из базовых документов ЭМК, а также данные из протоколов МДБ о проведенных мероприятиях по медицинской реабилитации, их результатах и динамике состояния пациента за время лечения.

Согласно новой модели оказания помощи, врачи МДБ производят оценку состояния пациента не только по привычным клиническим шкалам, но и в доменах Международной классификации функционирования (МКФ). Такая оценка необходима для постановки реабилитационного диагноза, который позволяет дифференцировать мероприятия, направленные на сохранение жизнеспособности (лечебно-диагностический процесс), от мероприятий, направленных на сохранение и восстановление жизнедеятельности, что крайне важно для организации реабилитационных мероприятий в дальнейшем. Необходимо заметить, что, если пациент был оперирован по поводу основного заболевания, к оценке состояния будут добавлены дополнительные шкалы.

Автоматизированное формирование реабилитационного диагноза

Оценка и по клиническим шкалам, и по всем необходимым доменам МКФ, соответствующим модели оказания помощи пациенту с ОНМК, вручную занимает много времени, поэтому был разработан элемент системы поддержки принятия решений в виде алгоритма перевода данных клинической шкалы тяжести инсульта NIHSS (как и других клинических инструментов) [5] в баллы МКФ, фрагмент алгоритма представлен в таблице.

Алгоритм представляет собой сопоставление оценок каждого пункта шкалы тяжести инсульта соответствующим доменам МКФ. Так как МКФ является более подробным инструментом, чем клинические шкалы, в ряде случаев однозначного соответствия нет. К примеру, в п. 2 (см. табл. 1) МКФ имеет больше градаций по нарушениям артикуляции, и балл 1 по шкале NIHSS может соответствовать оценке B320.1 или B320.2 по МКФ. Еще более сложную ситуацию можно наблюдать в п. 3: разделу «Чувствительность» может соответствовать сразу несколько доменов МКФ («сенсорные функции, связанные с раздражителями», «тактильная чувствительность», «чувствительность к повреждающим стимулам»). В таких «спорных» ситуациях алгоритм не дает однозначный ответ и требует коррекции врачом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе использован системный подход к информатизации процесса оказания помощи больным с ОНМК, а именно определены границы предметной области, проведен анализ объектов информационной модели (пациент, медицинская организация, МИС МО, электронный документооборот), их связей и отношений. В доступной литературе обнаружено лишь одно исследование, посвященное данной проблеме [22], причем описан программный продукт, в котором частично реализован ввод клинической информации о пациенте; оценка состояния с помощью реабилитационных шкал. Поддержка постановки диагноза осуществляется в категориях МКФ, но алгоритм перевода не прозрачен, его реализация в других системах не представляется возможной.

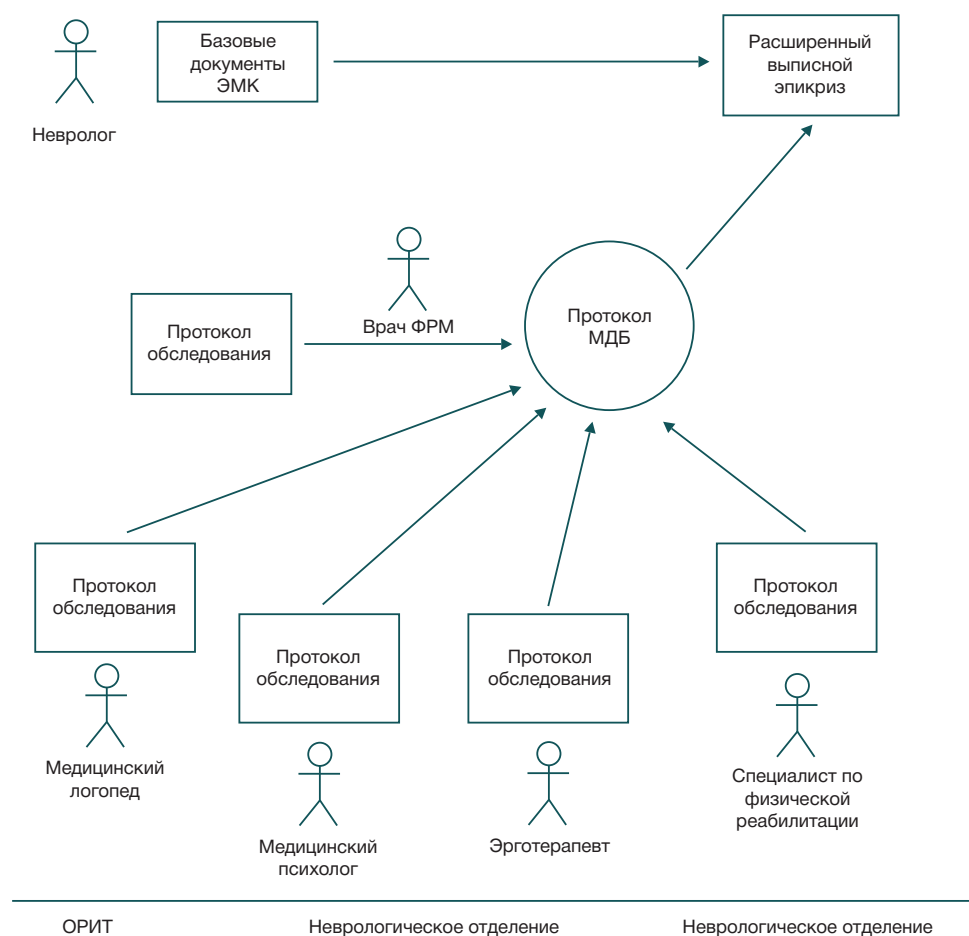


Рис. 3. Порядок оформления профильных документов в неврологическом отделении

Протокол МДБ № 10

от 08.05.2019

Организация: ФГБУ "ФЦЦПИ" Минздрава России
Отделение: медицинской и социальной реабилитации
Пациент: Воскресенский Алексей Михайлович, 54 года, М
Номер истории болезни: 35268

Реабилитационный потенциал: Высокий ▼

Значение Шкалы Реабилитационной Маршрутизации: 4

Реабилитационная цель:
 Долгосрочная: через 3 месяца пациенту будет требоваться амбулаторная помощь один раз в день
 Краткосрочная: пациент сможет самостоятельно передвигаться
 Цель на этап: самостоятельная вертикализация

Реабилитационный диагноз:

Функции и структуры

Домен	Расшифровка
b134.2	Функции сна
b28012.2	Боль в желудке или животе
b7301.3	Сила мышц одной конечности
b7401.4	Выносливость мышечных групп
b7603.3	Опорные функции руки или ноги
b820.4	Репаративные функции кожи
s810.0	Структура кожного покрова

Активность и участие

Домен	Расшифровка
d410.31	Изменение позы тела
d510.43	Мытье
d520.32	Уход за частями тела
d530.31	Физиологические отправления
d540.32	Одевание
d550.21	Прием пищи
d560.20	Питие

Факторы окружающей среды

Домен	Расшифровка
e260.3	Качество воздуха
e310+3	Семья и ближайшие родственники
e540.1	Транспортные службы, административные системы и политика

Личностные факторы

Домен	Расшифровка	Значение
ЛФ	Принятие болезни	-
ЛФ	Осознание смысла реабилитации	+

Факторы, ограничивающие проведение реабилитационных мероприятий:

нет ▼

Реабилитационный план

Рис. 4. Часть макета профильного документа — протокола мультидисциплинарной бригады

Предлагаемый в нашей работе подход может стать идеологической и алгоритмической основой для построения информационных систем по ведению больных с ОНМК от учрежденческого до федерального уровня. Полученные уже на этом этапе результаты позволяют сформулировать дальнейшую стратегию по развитию информационной модели системы реабилитации и обозначить первоочередные задачи, среди которых:

1) разработка технического задания по созданию профильных документов ЭМК: «протокол обследования специалистами МДБ», «протокол МДБ», расширенный выписной (посмертный) эпикриз. Для передачи на второй или третий этапы реабилитации и на более высокие уровни МИС (региональный, федеральный) необходима также разработка стандартизированных электронных

медицинских документов (СЭМД) для выписных документов и руководств по их реализации;

2) определение перечня федеральных медицинских справочников для формализации клинической и общей информации, содержащейся в профильных документах: протоколе обследования специалистом МДБ, протоколе МДБ, выписном эпикризе;

3) построение ролевой модели, описывающей права доступа каждого участника лечебно-диагностического процесса всех профильных отделений стационара;

4) разработка АРМ специалистов, принимающих участие в реабилитационном процессе: врача ФРМ, специалиста по физической реабилитации, медицинского психолога, нейропсихолога, медицинского логопеда, эрготерапевта, массажиста, инструктора ЛФК, социального работника;

Таблица. Фрагмент алгоритма перевода клинической шкалы NIHSS в баллы МКФ

	NIHSS	МКФ
1	Сила мышц нижних конечностей (удержание 5 с)	B740 — Функции мышечной выносливости B7401 — Выносливость мышечных групп
	0 = Нога не опускается	0 B7401.0
	1 = Нога начинает опускаться, но не касается кровати	1 B7401.1
	2 = Нога касается кровати	2 B7401.2
	3 = Нога сразу падает, но в ней есть движения	3 B7401.3
	4 = Движения в ноге отсутствуют	4 B7401.4
	UN = исследовать невозможно	UN B7401.8
2	Дизартрия	Функции голоса и речи B320 — Функции артикуляции
	0 = Норма	0 B320.0
	1 = Легкая или умеренная	1 B320.1- B320.2
	2 = Грубая или анартрия/мутизм	2 B320.3- B320.4
	UN = исследовать невозможно	UN B320.8
3	Чувствительность (уколы и прикосновения)	Дополнительные сенсорные функции (b250-279) B270 — Сенсорные функции, связанные с температурой и другими раздражителями
	0 = Норма	0 B270.0
	1 = Легкая или умеренная гемипестезия	1 B270.1
	2 = Тяжелая гемипестезия или гемианестезия	2 B270.3
		B2702 — Тактильная чувствительность
		B2703 — Чувствительность к повреждающим стимулам

5) создание элементов системы поддержки принятия врачебных решений, позволяющих автоматизировать постановку диагноза по МКФ для специалистов МДБ.

Перспективными направлениями развития информационной модели являются: создание административных АРМ, аналитического и справочного модулей, личного кабинета пациента, дополнение модулей АРМ специалистов с учетом вида инсульта и оказанной помощи, а также интеграция с внешними системами.

ВЫВОДЫ

В настоящее время, как в России, так и за рубежом, происходит активное внедрение в клиническую практику «новой модели» оказания помощи пациенту

с ОНМК, описанной в протоколе пилотного проекта «Развитие системы медицинской реабилитации в РФ». Согласно модели, реабилитацией пациента занимается новая структура лечебно-диагностического процесса — мультидисциплинарная бригада, использующая МКФ как инструмент для оценки состояния пациента, что необходимо учитывать при разработке информационной системы.

В данной работе проанализированы основные объекты информационной модели, выявлены различия существующей и новой моделей оказания помощи больному с ОНМК, на основе которых предложено расширение функционала типовой МИС МО. Освещены основные направления развития информационной модели системы реабилитации: разработка профильных документов, федеральных справочников, АРМ и дополнительных модулей МИС.

Литература

1. Зарубина Т. В., Кобринский Б. А. Медицинская информатика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; 512 с.
2. Паспорт федерального проекта «Создание единого цифрового контура в здравоохранении на основе единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения (ЕГИСЗ)» (утв. президиумом Совета при Президенте Российской Федерации по стратегическому развитию и национальным проектам, протокол № 16 от 24 декабря 2018 г.). Доступно по ссылке: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/natsproektzdravoohranenie/tsifra>.
3. Гусев Е. И., Гехт А. Б. Клинические рекомендации по проведению тромболитической терапии при ишемическом инсульте. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015; с. 11–14, 16.
4. Денисов И. Н., Кандыба Д. В., Кузнецова О. Ю. Диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики, включая первичную и вторичную профилактику. Клинические рекомендации утверждены на IV Всероссийском съезде врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации. 2013; 15: 13–24.
5. Иванова Г. Е., редактор. Практическое применение оценочных
6. Мельникова Е. В., Буйлова Т. В., Бодрова Р. А., Шмонин А. А., Мальцева М. Н., Иванова Г. Е. Использование международной классификации функционирования (МКФ) в амбулаторной и стационарной медицинской реабилитации: инструкция для специалистов. Вестник восстановительной медицины. 2017; 6 (82): 1219–28.
7. Casaubon LK, et al. Canadian stroke best practice recommendations: hyperacute stroke care guidelines, update 2015. International Journal of Stroke. 2016; 10 (6): 924–40.
8. Gutenbrunner C, Ward AB, Chamberlain MA. White book on physical and rehabilitation medicine in Europe. European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine. 2006; 42 (4): 295.
9. Hebert D, et al. Canadian stroke best practice recommendations: stroke rehabilitation practice guidelines, update 2015. International Journal of Stroke. 2016; 11 (4): 459–84.
10. Powers WJ, et al. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare

- professionals from the American Heart Association. American Stroke Association. 2018; 49 (3): 46–99.
11. Steiner T, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *International Journal of stroke*. 2014; 9 (7): 840–55.
 12. ICF Research Branch in cooperation with the World Health Organization Collaborating Centre for the Family of International Classifications (WHO-FIC) in Germany (at DIMDI). Available from: www.icf-research-branch.org.
 13. Organisation mondiale de la santé, World Health Organization, World Health Organization Staff. International classification of functioning, disability and health: ICF. World Health Organization, 2001; 299 p.
 14. Gimigliano F, Negrini S. The World Health Organization «rehabilitation 2030—a call for action». *Eur J Phys Rehabil Med*. 2017; 53 (2): 155–168.
 15. World Health Organization. WHO global disability action plan 2014–2021: Better health for all people with disability. 2015; 25 p. Available from: <https://extranet.who.int/iris/restricted/handle/10665/199544>.
 16. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 1705н от 29.12.2012 «О порядке организации медицинской реабилитации». Доступно по ссылке: <https://base.garant.ru/70330294/>.
 17. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 928н от 15.11.2012 «Порядок оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения». Доступно по ссылке: <https://base.garant.ru/70334856/>.
 18. Иванова Г. Е., Белкин А. А., Беляев А. Ф., Бодрова Р. А., Буйлова Т. В., Мельникова Е. В. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации». Общие принципы и протокол. *Вестник ИвГМА*. 2016; (1): 6–11.
 19. Иванова Г. Е., Мельникова Е. В., Шмонин А. А., Аронов Д. М., Белкин А. А., Беляев А. Ф. и др. Пилотный проект «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации». Протокол второй фазы проекта. Ученые записки ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2016; (2): 27–34.
 20. Кадомцев Д. В., Пасечникова Е. А., Занин С. А., Кочарян В. Э., Плотникова В. В., Виноградов И. О. Тромболитическая терапия при ишемическом инсульте. Современное состояние проблемы. Современные проблемы науки и образования. 2016; (4): 40.
 21. Steiner WA, et al. Use of the ICF model as a clinical problem-solving tool in physical therapy and rehabilitation medicine. *Physical therapy*. Oxford University Press. 2002; 82 (11): 1098–07.
 22. Шмонин А. А., Никифоров В. В., Мальцева М. Н., Мельникова Е. В., Иванова Г. Е. Электронная система мониторинга эффективности реабилитации в пилотном проекте «Развитие системы медицинской реабилитации в Российской Федерации» — программа «ICF-reader». *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2016; 21 (1): 66–70.

References

1. Zarubina TV, Kobrinskij BA. *Medicinskaja informatika*. M.: GJeOTAR-Media, 2016; 512 s. Russian.
2. Paspot federal'nogo proekta «Sozdanie edinogo cifrovogo kontura v zdravooxranenii na osnove edinoj gosudarstvennoj informacionnoj sistemy v sfere zdravooxranenija (EGISZ)» (utv. prezidiumom Soveta pri Prezidente Rossijskoj Federacii po strategicheskomu razvitiyu i nacional'nym proektam, protokol # 16 ot 24 dekabrja 2018 g.). Available from: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/natsproektzdravooxranenie/tsifra>. Russian.
3. Gusev EI, Geht AB. *Klinicheskie rekomendacii po provedeniju tromboliticheskoj terapii pri ishemicheskom insul'te*. M.: GJeOTAR-Media, 2015; s. 11–14, 16. Russian.
4. Denisov IN, Kandyba DV, Kuznecova OYu. Diagnostic and tactics of stroke care in general medical practice, including primary and secondary prevention. Clinical guidelines approved on the IV All-Russian Congress of general practitioners (family doctors) of Russian Federation. 2013; 15: 13–24. Russian.
5. Ivanova GE, redaktor. *Prakticheskoe primenenie ocenочnyh shkal v medicinskoj reabilitacii. Metodicheskie rekomendacii dlja Pilotnogo proekta «Razvitie sistemy medicinskoj reabilitacii v Rossijskoj Federacii»*. 2016; s. 4–7. Russian.
6. Melnikova EV, Bujlova TV, Bodrova RA, Shmonin AA, Maltseva MN, Ivanova GE. International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF) in out-patient and in-patient medical rehabilitation: instruction for specialists. *Journal of Restorative Medicine*. 2017; 6 (82): 1219–28. Russian.
7. Casaubon LK, et al. Canadian stroke best practice recommendations: hyperacute stroke care guidelines, update 2015. *International Journal of Stroke*. 2016; 10 (6): 924–40.
8. Gutenbrunner C, Ward AB, Chamberlain MA. White book on physical and rehabilitation medicine in Europe. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*. 2006; 42 (4): 295.
9. Hebert D, et al. Canadian stroke best practice recommendations: stroke rehabilitation practice guidelines, update 2015. *International Journal of Stroke*. 2016; 11 (4): 459–84.
10. Powers WJ, et al. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association. *American Stroke Association*. 2018; 49 (3): 46–99.
11. Steiner T, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *International Journal of stroke*. 2014; 9 (7): 840–55.
12. ICF Research Branch in cooperation with the World Health Organization Collaborating Centre for the Family of International Classifications (WHO-FIC) in Germany (at DIMDI). Available from: www.icf-research-branch.org.
13. Organisation mondiale de la santé, World Health Organization, World Health Organization Staff. International classification of functioning, disability and health: ICF. World Health Organization, 2001; 299 p.
14. Gimigliano F, Negrini S. The World Health Organization «rehabilitation 2030—a call for action». *Eur J Phys Rehabil Med*. 2017; 53 (2): 155–168.
15. World Health Organization. WHO global disability action plan 2014–2021: Better health for all people with disability. 2015; 25 p. Available from: <https://extranet.who.int/iris/restricted/handle/10665/199544>.
16. Prikaz Ministerstva zdravooxranenija Rossijskoj Federacii # 1705n ot 29.12.2012 «O porjadke organizacii medicinskoj reabilitacii». Available from: <https://base.garant.ru/70330294/>. Russian.
17. Prikaz Ministerstva zdravooxranenija Rossijskoj Federacii # 928n ot 15.11.2012 «Porjadok okazaniya medicinskoj pomoshhi bol'nym s ostrymi narushenijami mozgovogo krovoobrashhenija». Available from: <https://base.garant.ru/70334856/>. Russian.
18. Ivanova GE, Belkin AA, Belyaev AF, Bodrova RA, Bujlova TV, Melnikova EV, et al. Pilot project «Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation». General Principles and Protocol. *Journal of the Ivanovsky Medical Academy*. 2016; (1): 6–11. Russian.
19. Ivanova GE, Melnikova EV, Shmonin AA, Aronov DM, Belkin AA, Belyaev AF, et al. Pilot project «Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation». Protocol of the second phase of the project. *Scientific notes of PSPbGMU*. 2016; (2): 27–34. Russian.
20. Kadomcev DV, Pasechnikova EA, Zanin SA, Kocharjan VYe, Plotnikova VV, Vinogradov IO. Thrombolytic therapy in ischemic stroke care. Current status. Current status of science and education. 2016; (4): 40. Russian.
21. Steiner WA, et al. Use of the ICF model as a clinical problem-solving tool in physical therapy and rehabilitation medicine. *Physical therapy*. Oxford University Press. 2002; 82 (11): 1098–07.
22. Shmonin AA, Nikiforov VV, Maltseva MN, Melnikova EV, Ivanova GE. Electronic monitoring of rehabilitation efficacy system in pilot project «Development of medical rehabilitation system in the Russian Federation» — «ICF-reader» program. *Journal of the Ivanovsky Medical Academy*. 2016; 21 (1): 66–70. Russian.