

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

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

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

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
А. Г. Платонова, д. м. н. (Киев, Украина)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х.П.Тахчиди, 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.2020-05

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 31.10.2020
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.2020-05

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 31.10.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19 А. Н. Казимирский, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	15
<hr/>	
Новые однодоменные антитела к мезотелину и клеточные модели для разработки таргетной терапии рака молочной железы Ю. Е. Кравченко, С. П. Чумаков, Е. И. Фролова New anti-mesothelin single-domain antibodies and cell models for developing targeted breast cancer therapy Kravchenko YuE, Chumakov SP, Frolova EI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	24
<hr/>	
Иммуногистохимическая экспрессия белка Nanog в клетках рака предстательной железы различных прогностических групп Г. Ю. Кудрявцев, Л. В. Кудрявцева, Л. М. Михалева, Я. Ю. Кудрявцева, Н. А. Соловьева, В. А. Осипов, И. И. Бабиченко Immunohistochemical expression of Nanog protein in prostate cancer cells of distinct Grade Groups Kudryavtsev GYu, Kudryavtseva LV, Mikhaleva LM, Kudryavtseva YaYu, Solovyeva NA, Osipov VA, Babichenko II	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	31
<hr/>	
Потенциальные фармакологические эффекты продуктов фотоокисления псоралена и их циклоаддуктов с аминотиолами: хеоминформационный анализ В. В. Скарга, А. Д. Задорожный, Б. В. Шилов, Е. В. Невежин, В. В. Негребетский, М. А. Маслов, А. А. Лагунин, М. В. Малахов Prospective pharmacological effects of psoralen photooxidation products and their cycloadducts with aminothiols: chemoinformatic analysis Skarga VV, Zadorozhny AD, Shilov BV, Nevezhin EV, Negrebetsky VV, Maslov MA, Lagunin AA, Malakhov MV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	40
<hr/>	
Влияние курса нейромодуляции на профиль нейротрофических факторов у пациентов с хроническими нарушениями сознания Е. Г. Язева, Л. А. Легостаева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, Д. А. Абаймов, Н. А. Супонева, А. А. Шабалина, Ю. В. Рябинкина, М. А. Пирадов Effect of neuromodulation on neurotrophic factors in patients with chronic disorders of consciousness Iazeva EG, Legostaeva LA, Bakulin IS, Poydasheva AG, Abaimov DA, Suponeva NA, Shabalina AA, Ryabinkina YV, Piradov MA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	47
<hr/>	
Влияние роботизированных тренировок на биомеханику голеностопного сустава у пациентов с постинсультным парезом А. С. Клочков, А. А. Зимин, А. Е. Хижникова, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов Effect of robot-assisted gait training on biomechanics of ankle joint in patients with post-stroke hemiparesis Klochkov AS, Zimin AA, Khizhnikova AE, Suponeva NA, Piradov MA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	58
<hr/>	
Таксономический дисбиоз микробиоты и сывороточные биомаркеры как отражение тяжести поражения центральной нервной системы Е. А. Черневская, А. Ю. Меглей, И. В. Буйкова, Н. Ю. Ковалева, К. М. Горшков, В. Е. Захарченко, Н. В. Белобородова Taxonomic dysbiosis of gut microbiota and serum biomarkers reflect severity of central nervous system injury Chernevskaya EA, Meglei AY, Buyakova IV, Kovaleva NYu, Gorshkov KM, Zakharchenko VE, Beloborodova NV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	66
<hr/>	
Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ Е. С. Ворошилина, Д. Л. Зорников, А. В. Иванов, Д. Г. Почерников, Е. А. Паначева Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernikov DG, Panacheva EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	74
<hr/>	
Сенсомоторные ритмы ЭЭГ у детей с расстройствами аутистического спектра А. И. Кайда, Е. В. Эйсмонт, А. А. Михайлова, В. Б. Павленко EEG sensorimotor rhythms in children with autism spectrum disorders Kaida AI, Eismont EV, Mikhailova AA, Pavlenko VB	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	82
<hr/>	
Теломеризованные фибробласты как потенциальный объект для 3D-моделирования патологических гипертрофических рубцов <i>in vitro</i> В. С. Шадрин, П. М. Кожин, О. О. Шошина, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов Telomerized fibroblasts as a candidate 3D <i>in vitro</i> model of pathological hypertrophic scars Shadrin VS, Kozhin PM, Shoshina OO, Luzgina NG, Rusanov AL	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

91

Клиническое значение малой ягодичной мышцы при эндопротезировании тазобедренного сустава

К. А. Егиазарян, И. В. Сиротин, И. О. Чижикова, Г. Д. Лазишвили, А. П. Ратъев, А. Б. Бут-Гусаим

Clinical significance of the musculus gluteus minimus in total hip arthroplasty

Yegiazaryan KA, Sirotin IV, Chizhikova IO, Lazishvili GD, Ratiev AP, But-Gusaim AB

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

96

Применение лазерной коагуляции сетчатки при болезни Илза

Х. П. Тахчиди, Е. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина, М. В. Мокрунова

Retinal laser photocoagulation in management of Eales' disease

Takhchidi KhP, Takhchidi EK, Kasminina TA, Tebina EP, Mokrunova MV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

104

Поэтапный подход в лечении комбинированной гамарты сетчатки и ретинального пигментного эпителия

Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина

Staged approach to treatment of combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium

Takhchidi KhP, Takhchidi NK, Kasminina TA, Tebina EP

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

109

Сложности дифференциальной диагностики кожных проявлений при коронавирусной инфекции

Р. Т. Таирова, Т. А. Гайдина, А. С. Дворников, А. Д. Тазартукова, О. В. Лянг

Difficulties in differential diagnosis of cutaneous manifestations in patients with coronavirus infection

Tairova RT, Gaydina TA, Dvornikov AS, Tazartukova AD, Lyang OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

116

Эффективность использования оптической системы смартфона для оценки злокачественности меланоцитарных невусов

Т. А. Гайдина, Е. Г. Дворникова

Efficacy of smartphone-compatible optical instrument for assessing melanocytic nevi for malignancy

Gaydina TA, Dvornikova EG

ИСПРАВЛЕНИЕ

122

Исправление к статье

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. Тоневицкий

Опубликована в журнале Вестник РГМУ (июль–август 2020, с. 63–69).

Erratum to

Hypoxia enhances transcytosis in intestinal enterocytes

Maltseva DV, Shkurnikov MYu, Nersisyan SA, Nikulin SV, Kurnosov AA, Raigorodskaya MP, Osipyants AI, Tonevitsky EA

Published in Bulletin of RSMU (july–august 2020, 60–66).

АНТИВИРУСНАЯ СИСТЕМА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА: ПАТОГЕНЕЗ И ЛЕЧЕНИЕ COVID-19


А. Н. Казимирский , Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин

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

В обзоре представлена концепция антивирусной системы врожденного иммунитета и описаны главные структурные компоненты этой системы в организме человека, действующей против РНК-содержащих вирусов. Антивирусная система врожденного иммунитета включает в себя два главных компонента: митохондриальный антивирусный сенсор (MAVS) — белок наружной мембраны митохондрий и нейтрофилы периферической крови, способные формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки. В зависимости от пути активации MAVS при инфицировании клетки РНК-содержащим вирусом развиваются два возможных варианта ее гибели — апоптоз или дегенерация клеток с некротическими изменениями. Развитие вирус-индуцированного апоптоза инфицированных клеток вызывает формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек, секрецию воспалительных цитокинов, генерацию АФК, тканевое повреждение, гемокоагуляцию и возникновение острого воспалительного процесса с развитием COVID-19-пневмонии. Нарушение прионоподобной реакции MAVS в ответ на вирусное инфицирование клетки запускает альтернативный путь активации аутофагии. Клетки в условиях продолжительной активации аутофагии испытывают дегенеративные изменения и элиминируются из организма моноцитами/макрофагами, которые секретируют противовоспалительные цитокины. Такой тип реакции антивирусной системы врожденного иммунитета соответствует бессимптомному течению заболевания. Из приведенных наиболее существенных сторон патогенеза коронавирусной инфекции COVID-19 вытекают рекомендации по профилактическому лечению этого опасного заболевания. Предлагаемое лечение позволит значительно ослабить тяжесть заболевания Covid-19 и снизить летальность.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антивирусная система, митохондриальный антивирусный сигнальный белок, MAVS, нейтрофильные экстраклеточные ловушки, лечение COVID-19

Вклад авторов: равнозначный

 **Для корреспонденции:** Александр Николаевич Казимирский
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117437, alnica10@mail.ru

Статья получена: 31.08.2020 **Статья принята к печати:** 13.09.2020 **Опубликована онлайн:** 21.09.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.054

ANTIVIRAL SYSTEM OF INNATE IMMUNITY: COVID-19 PATHOGENESIS AND TREATMENT


Kazimirskii AN , Salmasi JM, Poryadin GV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Antiviral system of innate immunity includes two main components: the mitochondrial antiviral sensor — the mitochondrial outer membrane protein and peripheral blood neutrophils capable of forming neutrophilic extracellular traps. Depending on the activation pathway of the mitochondrial antiviral sensor (MAVS), two possible variants of cells death, apoptosis or cellular degeneration with necrotic changes, develop during cell infection with an RNA-containing virus. The development of virus-induced apoptosis of infected cells causes the formation of neutrophilic extracellular traps, the secretion of inflammatory cytokines, ROS generation, tissue damage, hemocoagulation and the development of an acute inflammatory process with the development of COVID-19 pneumonia. Violation of the prion-like reaction of MAVS in response to viral infection of the cell triggers an alternative pathway for activating autophagy. Cells under conditions of prolonged activation of autophagy experience necrotic changes and are eliminated from the organism by monocytes/macrophages that secrete anti-inflammatory cytokines. This type of reaction of the antiviral system of innate immunity corresponds to the asymptomatic course of the disease. From the most significant aspects of the pathogenesis of the coronavirus infection COVID-19 given, recommendations for the prophylactic treatment of this dangerous disease follow. The proposed treatment can significantly decrease the severity of COVID-19 disease and reduce mortality.

Keywords: innate immunity, antiviral system, mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS, neutrophilic extracellular traps, COVID-19 treatment

Author contribution: the authors contributed equally to all aspects of the article.

 **Correspondence should be addressed:** Alexander N. Kazimirskii
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117437; alnica10@mail.ru

Received: 31.08.2020 **Accepted:** 13.09.2020 **Published online:** 21.09.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.054

В последние 20 лет обнаружены восемь новых смертельно опасных вирусов, угрожающих человеку, что актуализирует поиск компонентов антивирусной системы организма. Немногочисленные исследования показали, что антивирусная система организма человека сопряжена с врожденным иммунитетом и немедленно активируется при поступлении вируса в клетки, поэтому может быть названа антивирусной системой врожденного иммунитета.

Существование антивирусной системы врожденного иммунитета в организме человека признается некоторыми исследователями, но как составные части этой системы, так и ее функционирование в настоящее время в полной мере неясны. В то же время накопленный экспериментальный материал позволяет нам выделить основные части этой системы и построить модель ее функционирования. Ни в коей мере не претендуя на полноту охвата

этого вопроса, мы полагаем, что антивирусная система врожденного иммунитета имеет два главных компонента: митохондриальный антивирусный сенсор — белок наружной мембраны митохондрий и нейтрофилы периферической крови, способные формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки.

Митохондриальный антивирусный сенсор

Митохондриальный антивирусный сенсор (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) — это поверхностный белок наружной митохондриальной мембраны с прионоподобной активностью, который обладает способностью изменять конформацию при взаимодействии с вирусной РНК. Вирусная инфекция запускает образование агрегатов MAVS, который активно стимулирует

иммунную сигнализацию [1]. Противовирусное действие этого белка весьма существенно зависит от скорости его обновления. Ингибирование убиквитинлигазы, отвечающей за ускоренное обновление MAVS, ослабляет иммунный ответ и увеличивает внутриклеточное инфицирование [2]. Мутации в MAVS, нарушающие его прионоподобную активность, также полностью отменяют его способность передавать сигналы иммунной активации в клетках млекопитающих. Результаты проведенных исследований показывают, что прионоподобная полимеризация является консервативным механизмом передачи сигнала активации врожденного иммунитета и при развитии воспаления [3, 4]. Значение MAVS продемонстрировано при заражении мышей дикого типа вирусом Эбола (EBOV). MAVS контролировал репликацию EBOV посредством экспрессии IFN α , ослаблял воспалительные реакции в селезенке и предотвращал гибель клеток печени. У MAVS(-/-)-мышей развивалось тяжелое воспаление, происходила вирусная репликация и снижение синтеза IFN-I [5]. Угроза, связанная с эпидемиями вируса Зика (ZIKV) и вызванными им серьезными осложнениями, подчеркивает растущую потребность в лучшем понимании патогенных механизмов ZIKV. При секвенировании РНК цельной крови от пациентов, инфицированных ZIKV, обнаружили, что программы транскрипционных антивирусных интерферон-стимулированных генов и врожденных иммунных сенсоров у пациентов, инфицированных ZIKV, оставались неактивными по сравнению с таковыми у здоровых доноров. У инфицированных пациентов ZIKV был способен подавлять индукцию IFN-I, а вирусный белок ZIKV NS4A непосредственно связывал MAVS и тем самым прерывал взаимодействие RIG-I/MAVS, ослабляя синтез IFN-I [6]. Некоторые внеклеточные патогены способны активировать внутриклеточные механизмы защиты, которые действуют против вирусных инфекций. Пневмолизин (Ply), основной фактор вирулентности *Streptococcus pneumoniae*, способен инициировать окислительное повреждение митохондрий, что вызывает выделение митохондриальной ДНК, которая опосредует экспрессию IFN β в макрофагах. В ответ на пневмолизин макрофаги экспрессируют IFN β с помощью стимулятора генов интерферона STING (stimulator of interferon genes) [7]. Активация главных внутриклеточных адаптерных белков противовирусной защиты MAVS и STING состоит в их фосфорилировании при участии определенных (серин-треониновых) протеинкиназ (IKK и/или TBK1) при поступлении в клетку патогенов [8]. Внутриклеточным сигналом инфицирования клетки служит необычный неканонический циклический динуклеотид 2',3'-cGAMP (сGAMP) [9]. В организме высших млекопитающих и человека синтезируется динуклеотид 2',3'-cGAMP, способный активировать главные внутриклеточные адаптерные белки противовирусной защиты MAVS и STING под влиянием фермента сGAMP-синтазы. Образование 2',3'-cGAMP катализирует сGAMP-синтаза (сGAS) при обнаружении цитозольной двухцепочечной ДНК, и он функционирует в качестве эндогенного индуктора врожденного иммунитета путем непосредственного связывания и активации адаптерного белка — стимулятора генов интерферона (STING). Циклический динуклеотид 2',3'-cGAMP стимулирует секрецию интерферона- β (IFN β), основного сигнального пути защиты, который не зависит от активации рецепторов врожденного иммунитета (toll-подобных рецепторов, TLR) [10]. Вирус коровьей оспы в клетках человека индуцирует

синтез специфических нуклеаз под названием «поксины», способных катализировать расщепление 3'-5'-связи, превращая циклический 2',3'-сGAMP в линейный Gp[2'-5']Ap[3'] динуклеотид. Линейный гуанил-адениловый динуклеотид теряет способность активировать стимулятор генов интерферона STING, при этом противовирусные механизмы не действуют. Полученные результаты демонстрируют механизм того, как вирусы избегают врожденного иммунитета [11].

В распознавании внутриклеточных патогенов и продуцировании интерферонов I типа (IFN-I) наиболее важная роль принадлежит дендритным клеткам и макрофагам [12]. При инфицировании мышей респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), который является основной причиной респираторных инфекционных заболеваний у младенцев и детей младшего возраста, идентифицировали альвеолярные макрофаги в качестве основного источника IFN-I [13]. Инфицирование генно-модифицированных Myd88/Trif/Mavs(-/-)-мышей, у которых была нарушена передача сигналов всеми TLR, RLR (RIG-I, MDA5, LGP2) и IL-1R, а также другими рецепторами цитокинов, такими как рецептор IL18, показало, что у таких RSV-инфицированных животных ранняя продукция провоспалительных медиаторов полностью отсутствовала. Однако RSV-специфичные CD8⁺-Т-лимфоциты были обнаружены в легочной ткани и дыхательных путях. RSV-инфицированные Myd88/Trif/Mavs(-/-)-мыши с выключенным врожденным иммунитетом преодолели инфекцию, но показали более высокую вирусную нагрузку, тяжелое и продолжительное воспаление, потерю веса. Эти данные демонстрируют определенный уровень избыточности в иммунной защите организма, а также то, что вовлечение цитотоксических Т-лимфоцитов в ответную реакцию обеспечивают клетки самой инфицированной ткани, продуцирующие IFN γ [14]. В экспериментальной модели токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*) определили наличие нелимфоидного источника IFN γ у генетически измененных мышей, лишенных всех лимфоидных клеток из-за недостатков генов 2 and IL-2R γ , активирующих рекомбинацию, которые также продуцировали IFN γ в ответ на инфицирование простейшим паразитом. Проточная цитометрия и морфологические исследования показали, что в этой экспериментальной модели источниками IFN γ являются нейтрофилы, а не NK-клетки и не CD8⁺-Т-лимфоциты [15, 16]. Внутриклеточные патогены также индуцируют ускоренное образование IFN γ . Причем вирусное заражение не увеличивает экспрессию рецепторов врожденного иммунитета (TLR) в плазматцитоидных дендритных клетках. Мыши, инфицированные вирусом лимфоцитарного хориоменингита, развивали сильную TLR-независимую продукцию интерферона I типа (IFN-I) с помощью РНК-хеликаз и при участии MAVS [17].

MAVS индуцирует апоптоз

MAVS (IPS-1, VISA или Cardiff) имеет решающее значение для защиты организма хозяина от вирусной инфекции благодаря не только индукции интерферонов I типа (IFN-I), но и апоптозу инфицированных клеток независимо от его функции в инициации продукции IFN-I. Причем MAVS(-/-)-фибробласты устойчивы к апоптозу, вызванному вирусом Сендай. Функциональный скрининг показывает, что белок (NSP15) коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) ингибирует MAVS-индуцированный апоптоз и это способ коронавируса уклониться от

иммунитета [18]. В MAVS-дефицитных клетках снижается активация каспазы-8 и каспазы-3. После заражения РНК-содержащим вирусом MAVS не только вызывает противовирусный ответ типа I, но и рекрутирует каспазу-8 в митохондрии, чтобы обеспечить активацию каспазы-3 и апоптоз инфицированных клеток [19]. Вирус африканской чумы свиней увеличивает экспрессию MAVS в альвеолярных макрофагах. Экспрессия MAVS усиливалась под влиянием внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). Кроме того, MAVS увеличивал индукцию противовирусных и провоспалительных цитокинов и апоптоз инфицированных клеток и ингибировал репликацию вируса [20].

У мышей с дефицитом MAVS вирус гепатита А вызывает гистологические признаки повреждения печени, инфильтрацию лейкоцитов и выделения ферментов печени в кровь [21]. Обнаружена микроРНК miR-33/33*, способная увеличивать вирусную репликацию и летальность, в то же время ослабляющая синтез интерферона I типа как *in vitro*, так и *in vivo*. Дальнейшие исследования показали, что эта микроРНК предотвращает MAVS от образования активированных агрегатов и является негативным регулятором антивирусной системы врожденного иммунитета [22]. Эти и ряд других работ показывают критическую роль MAVS в вирус-индуцированном апоптозе. Вирусная инфекция запускает защитные механизмы организма, центральным звеном которых является MAVS. Стратегия антивирусной защиты организма заключается в запуске апоптоза клеток, инфицированных РНК-содержащими вирусами. Описанная стратегия защиты может быть реализована только при наличии функционально полноценного MAVS.

Подавление воспаления путем ограничения (сокращения) числа апоптозирующих клеток

Однако после синтеза в клетке и транспорта в наружную митохондриальную мембрану MAVS с течением времени подвергается модификации. Суть модификации этого ключевого сенсора вирусной РНК заключается в его геранилировании (присоединении двух остатков геранилдифосфата) с последующим пальмитоилированием (присоединением двух остатков пальмитиновой кислоты). Такой модифицированный MAVS не способен к агрегации под влиянием вирусной РНК и не способен к активации и агрегации с последующим развитием апоптоза вирус-инфицированной клетки [23]. Геранилдифосфат — линейная десятиуглеродная молекула, состоящая из двух остатков изопрена, образуется в организме в ходе синтеза холестерина, поэтому профилактическое лечение коронавирусной инфекции может состоять в фармакологическом ингибировании пути синтеза холестерина с помощью статинов. Своевременное применение профилактической терапии против текущей коронавирусной инфекции (COVID-19) позволит избежать тяжелого течения заболевания и осложнений. Воспалительный процесс при функционально полноценном MAVS, как мы полагаем, будет локализован в области верхних дыхательных путей и не получит распространения в организме. Важный и актуальный вопрос о прогнозировании тяжести течения, осложнений и исхода коронавирусной инфекции может быть решен после разработки теста на наличие геранилированного MAVS. Неинфицированные люди с высоким уровнем модифицированного (геранилированного) MAVS могут составлять группу риска в отношении коронавирусной

инфекции (SARS-CoV-2) и нуждаться в изоляции и назначении профилактической терапии.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки — это форма реагирования предварительно активированных нейтрофилов на контактные взаимодействия с клетками, находящимися в состоянии апоптоза. Нейтрофилы периферической крови предварительно активируются, получая сигналы активации через различные рецепторы врожденного иммунитета (TLR). На этапе активации нейтрофилы взаимодействуют с различными молекулами патогенов или модифицированными молекулами собственного организма, которые распознают TLR как патогены. В ходе активации нейтрофилов происходит экспрессия генома, развивается синтез цитокинов, ферментов, осуществляется генерация АФК. Однако этого недостаточно для формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек происходит после контактных взаимодействий с апоптозирующимися клетками или их остатками. Сеть из волокон нейтрофильной ДНК захватывает и удерживает апоптозирующиеся клетки, а затем другие интактные нейтрофилы и моноциты фагоцитируют эту структуру, гидролизуют ее компоненты и презентуют антигены. Интересно, что после фагоцитоза клетки к раскрытию нейтрофильных экстраклеточных ловушек уже не способны [24–27]. Сигнальная молекула, заставляющая активированные нейтрофилы формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки, — мембранный липид фосфатидилсерин, локализованный на поверхности апоптозирующихся клеток. Развитие апоптоза клетки сопряжено с инверсией фосфатидилсерина, в норме расположенного на внутренней поверхности клеточной мембраны. Перемещение фосфатидилсерина с внутренней стороны клеточной мембраны на ее наружную поверхность происходит с помощью фосфолипидной скрамблазы-1 (PLSCR1) и является апоптотическим сигналом для активированных нейтрофилов к раскрытию нейтрофильных экстраклеточных ловушек [26].

Избыточное образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек вызывает гемокоагуляцию

Вместе с тем воздействие фосфатидилсерина на активированные нейтрофилы является ключевым событием в патогенезе микрососудистой дисфункции. Проведенные исследования выявляют ранее непризнанную связь между гиперкоагуляцией и присутствием фосфатидилсерина в циркуляции, что обуславливает очевидный тромботический риск [28, 29]. Тромботические осложнения представляют серьезную опасность в целом ряде заболеваний. С момента открытия нейтрофильных экстраклеточных ловушек взгляд на патофизиологию тромбозов существенно изменился. Генерируемые нейтрофилами сети, состоящие из деконденсированного хроматина в виде волокон, способствуют образованию тромба, служа каркасом, активирующим тромбоциты и коагуляцию. Тромбогенное поражение сосудов, обусловленное избыточным образованием нейтрофильных экстраклеточных ловушек, было описано при различных условиях тромбоза, включая инсульт, инфаркт миокарда и тромбоз глубоких вен [30]. Для преодоления тромбогенного

поражения сосудов предложено использовать ДНКазу I, которая ограничит избыточное образование волокон деконденсированного хроматина и ускорит их гидролиз [31]. Механизмы, лежащие в основе развития системной коагулопатии и приобретенной тромбофилии, характеризующейся в большинстве случаев склонностью к венозному, артериальному и микрососудистому тромбозу, при пандемии, вызванной COVID-19, неясны. Врачи и исследователи находятся на этапе сбора и анализа информации об этой опасной инфекции [32].

В патогенезе коронавирусной инфекции (COVID-19) просматривается отчетливая связь между развитием системной коагулопатии и формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Причем наиболее тяжелые в клиническом отношении пациенты это те, у которых развивается вирус-индуцированный апоптоз только в части инфицированных клеток. Эти клетки экспрессируют фосфатидилсерин на поверхности и индуцируют раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек, которые захватывают апоптозирующие клетки и их остатки. Другая часть инфицированных клеток не входит в апоптоз из-за функциональной недостаточности MAVS. Эти клетки участвуют в вирусной репликации и поддерживают распространение вируса по организму. Распространение вируса по организму увеличивает число апоптозирующихся клеток и, соответственно, количество раскрывающихся нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Нейтрофилы при формировании экстраклеточных ловушек секретируют воспалительные цитокины, ферменты, АФК, пептиды с порообразующей активностью. Часть секретируемых продуктов — АФК, пептиды с порообразующей активностью (такие как LL-37), TNF α предназначены для повреждения и уничтожения микроорганизмов. Но в отсутствии бактериальной инфекции повреждению подвергаются собственные ткани и клетки крови. Эндотелиоциты капилляров малого круга становятся пористыми, что ведет к интерстициальному отеку в легких, развитию вирусной пневмонии, а увеличение проницаемости мембран эритроцитов и тромбоцитов вызывает потерю гемоглобина и гемокоагуляцию. Эту нашу концепцию поддерживают исследования больных с COVID-19 с пневмонией, у которых обнаружили нейтрофильные экстраклеточные ловушки в микрососудах малого круга вместе с поврежденными эндотелиальными клетками и отложениями фибрина [33].

Развитие иммунодефицита при коронавирусной инфекции

Исследование клеток крови больных с тяжелой коронавирусной инфекцией (COVID-19) показало, что у них снижено число лимфоцитов и повышено число лейкоцитов.

Общее число Т-лимфоцитов было значительно сниженным за счет как CD4 $^{+}$ -, так и CD8 $^{+}$ -клеток по сравнению с уровнем здоровых доноров [34]. Причем степень возникающего иммунодефицита зависит от тяжести и продолжительности заболевания. Продолжительное инфекционное воспаление вызывает существенные сдвиги в популяционном и субпопуляционном составе лимфоцитов и вызывает развитие Т-клеточного иммунодефицита. В основе снижения содержания Т-лимфоцитов, а также субпопуляций CD4 $^{+}$ - и CD8 $^{+}$ -клеток периферической крови лежит недостаточный уровень экспрессии активационных антигенов лимфоцитов (CD25, CD71, HLA-DR) и увеличенная экспрессия рецептора запуска активационного апоптоза CD95 [35–37]. Действие этих факторов вызывает ускоренную элиминацию

Т-лимфоцитов и обуславливает развитие иммунодефицита. Эти наблюдения показывают, что стратегия лечения больных должна быть направлена на сокращение времени воспаления.

Нарушение синтеза IgG при коронавирусной инфекции

Формирование продуктивного иммунитета при коронавирусной инфекции (COVID-19) представляет для врачей и исследователей практически неразрешимую задачу. Не проводя подробный анализ результатов скрининга на антитела у больных после перенесенной коронавирусной инфекции, можно выделить главные черты недостаточности в образовании иммуноглобулинов. Это прежде всего отсутствие вирусспецифического IgG у части больных, низкий титр IgG специфических антител, а у некоторых пациентов и чрезвычайно ослабленный иммунный ответ, который все-таки вызывает образование вирусспецифического IgG, но в некоторых случаях только через 4–5 и более недель после поступления в стационар. Так, сообщается, что из шести обследованных пациентов высокий титр вирус-нейтрализующих антител имели пятеро заболевших [38]. В ходе обследования 208 образцов плазмы через 14 дней после начала заболевания обнаружили наличие вирус-специфических IgM и IgG у 85,4 и 77,9% больных соответственно [39]. Будучи не в состоянии проанализировать полученные данные авторы приводят отдельные наблюдения, из которых следует, что вирусспецифические IgM- и IgG-антитела у отдельных больных регистрировались через 6, 11, 18, 23, 24, 35 и 43 дня после поступления в отделение интенсивной терапии. Как можно заметить из приводимых данных, поздний срок появления специфических IgG совпадает с более высокой вирусной нагрузкой пациентов [40]. Результаты исследований показывают, что коронавирусная инфекция (SARS-CoV-2) сопровождается явными нарушениями процесса продуцирования специфических иммуноглобулинов и в этом состоит основное звено иммунопатогенеза. Причина наблюдаемых нарушений может быть связана, как ни парадоксально, с избыточным формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек при коронавирусной инфекции. Формирование сети из волокон ДНК сопровождается секрецией ряда соединений, в том числе секрецией ферментов. Главные секретируемые ферменты — NADPH-оксидаза, миелопероксидаза, аргиназа. Физиологическое значение NADPH-оксидазы, миелопероксидазы установлено и состоит в генерации радикалов кислорода и азота, повреждающих и инактивирующих различные патогены. Роль аргиназы состоит в нарушении антигенной презентации антигенпрезентирующими клетками и ингибированию Т-лимфоцитов с хелперно-индукторной функцией (CD4 $^{+}$ -клетки) в начальный период воспаления. Модулирующая (ингибирующая) адаптивный иммунитет роль аргиназы уже описана [41]. Исследуя ранние стадии воспаления, обнаружили выраженную реципроктность в отношении активации врожденного и адаптивного иммунитета. Физиологическая роль секретируемой нейтрофилами аргиназы состоит в организации правильной и последовательной активации двух частей иммунной системы [42, 43]. Однако продолжительное воспаление опасно не только повреждением собственных тканей и развитием гемокоагуляции. Происходит, как можно судить, выраженное продолжительное подавление адаптивного иммунитета, в результате которого образуется

недостаточно вирусспецифичных иммуноглобулинов у некоторых больных.

Особенность коронавирусной инфекции (COVID-19) состоит в том, что повреждаемые эндотелиальные клетки капилляров малого круга также содержат аргиназу. Поэтому при воспалении, сопровождающем коронавирусную инфекцию, аргиназа поступает в кровь из двух источников — нейтрофилов и эндотелиальных клеток. Подавление адаптивного иммунитета при этой инфекции особенно выражено. Преодоление ингибирования адаптивного иммунитета у больных с целью активации иммуногенеза может быть достигнуто, на наш взгляд, применением ингибиторов аргиназы (таких как валин) в острый период заболевания.

Бессимптомное течение коронавирусной инфекции

Ряд вирусных заболеваний и в том числе коронавирусная инфекция имеют бессимптомное течение. Опасность этих больных для окружающих состоит в том, что они являются бессимптомными вирусносителями и способны заражать других людей. Важно также, что антитела у некоторых таких больных не образуются, и после преодоления инфекции они сами способны заболеть повторно. Так, в группе из 112 COVID-19-позитивных пациентов, из которых 38 имели бессимптомный характер течения заболевания, IgM-антитела были найдены у 22 больных, семь пациентов этой группы имели IgG-антитела, а девять вирус-позитивных бессимптомных больных не имели вирусспецифичных антител [44]. Описана группа из 24 бессимптомных носителей вируса SARS-CoV-2. После их госпитализации в пяти случаях (20,8%) появились симптомы (лихорадка, кашель, усталость), в 12 случаях (50,0%) были найдены типичные КТ-изображения матового стекла, а в пяти (20,8%) обнаружены полосы затемнения в легких. Ни в одном из 24 случаев не было выявлено тяжелой пневмонии. Но у некоторых членов семей этих бессимптомных носителей в дальнейшем возникло тяжелое коронавирусное воспаление легких [45]. Исследование распространения коронавирусной инфекции среди новобранцев Швейцарских вооруженных сил в кантоне Тичино (южный кантон Швейцарии на границе с Италией) показывает, что молодые здоровые люди часто демонстрируют умеренное течение COVID-19 с быстрым ослаблением симптомов, но они были постоянными носителями SARS-CoV-2 [46].

Бессимптомное течение заболевания — активация альтернативного пути удаления вируса из организма

Бессимптомное течение заболевания COVID-19 связано с активацией аутофагии. Аутофагия — обновление многих клеточных структур — включается при попадании клетки в стрессовые условия. Одновременно это и способ преодоления вирусной инфекции за счет ускоренного гидролиза клеточных белков и других компонентов с последующим их синтезом. Аутофагия является одной из первых линий клеточной защиты от вторжения микроорганизмов, включая вирусы [47]. Многие вирусы эволюционировали до такой степени, что используют аутофагию для собственного развития. Они приобрели способность или ингибировать аутофагию в клетке, ускользая от клеточного гидролиза своих компонентов, или, что встречается чаще, использовать аутофагосомы для репликации и сборки вирусных частиц.

Причем некоторые вирусы даже способны вызывать дополнительную активацию аутофагии в инфицированной клетке для собственного развития. Так, пикорнавирусы используют клеточный аппарат для размножения, а затем ингибируют слияние аутофагосом с лизосомами, что приводит к увеличению формирования вирусных частиц [48]. Энтеровирус A71 (EV-A71) активирует аутофагию при инфицировании как *in vitro*, так и *in vivo*. EV-A71 запускает формирование аутолизосом во время инфекции в клетках рабдомиосаркомы человека, что облегчает его репликацию [49]. Вирус Зика (ZIKV) при инфицировании эндотелиальных клеток пупочной вены человека запускает клеточную аутофагию и увеличивает репликацию, используя для этого аутофагосомы. Применение ингибиторов образования аутофагосом значительно снижает образование вирусных частиц [50, 51]. Вирус Узуту (USUV) — африканский флавивирус, переносимый комарами, тесно связанный с вирусом лихорадки Западного Нила и вирусом японского энцефалита, в число переносчиков которого входят в основном комары и птицы. Циркуляция USUV в Африке была обнаружена более 50 лет назад, но в последнее десятилетие она появилась в Европе, вызвав эпизоды птичьей смертности и некоторые случаи тяжелых заболеваний среди людей. USUV-инфекция тоже стимулирует аутофагический процесс. Фармакологическая модуляция пути аутофагии с помощью индуктора аутофагии рапамицина приводила к увеличению выхода вируса. В то же время лечение 3-метиладенином или вортманнином, двумя различными ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназ, участвующих в аутофагии, приводило к снижению выхода вирусных частиц [52].

В индуцированной вирусом аутофагии принимают участие RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), обнаруживающий вирусные инфекции путем распознавания вирусной РНК, MAVS и TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) — цитозольный адаптерный белок, относящийся к семейству факторов, связанных с рецептором фактора некроза опухолей α . Дефицит в клетках любого из этих белков нарушает запуск аутофагии [53]. Эти и многие другие примеры показывают, что вирусы, длительное время циркулирующие в человеческой популяции, используют механизмы аутофагии для собственного развития. А SARS-CoV-2 таких механизмов видимо пока не имеет. Несмотря на то что прямых данных о взаимодействии SARS-CoV-2 с белками аутофагии или аутофагосомами не получено, характер бессимптомного течения COVID-19 указывает, что аутофагия при этом заболевании все-таки выполняет свою сдерживающую роль и препятствует распространению вируса по организму.

Активация аутофагии вызывает некротическую гибель клеток, инфицированных вирусом

Кратковременная активация аутофагии способствует выживаемости клеток при недостаточном поступлении необходимых метаболитов. Активация аутофагии, индуцированная вирусом, продолжается длительное время и ведет к некротической гибели клеток [54–57]. Такие клетки не экспонируют на своей поверхности фосфатидилсерин и не способны вызывать раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Поэтому секретиция воспалительных цитокинов не происходит. Удаление таких инфицированных дегенерирующих клеток развивается за счет фагоцитоза моноцитов/макрофагов, секретирующих противовоспалительные цитокины.

Таблица. Реакция антивирусной системы врожденного иммунитета и форма воспаления

Реакция клетки на инфицирование РНК-содержащим вирусом	Реакция MAVS	Мононуклеарные клетки крови	Цитокины в периферической крови	Характер воспалительного процесса и заболевания
Апоптоз	MAVS развивает прионоподобную полимеризацию	Активированные нейтрофилы формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки	Провоспалительные	Острый воспалительный процесс
Дегенерация клеток с некротическими изменениями	MAVS не развивает прионоподобную полимеризацию	Нейтрофилы не формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки	Противо-воспалительные	Нет признаков воспаления, бессимптомный характер заболевания

Бессимптомное течение заболевания обусловлено реакцией антивирусной системы врожденного иммунитета по альтернативному пути. Результаты проведенного исследования представлены в таблице.

Поляризация M0-макрофагов в M2-фенотип, продуцирующий противовоспалительные цитокины, развивается при дефиците IFN γ , а в присутствии IFN γ дифференциация макрофагов в M2-фенотип напротив ослабляется [58, 59], чем можно объяснить присутствие противовоспалительных цитокинов при недостаточности формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Стратегия лечения бессимптомных COVID-19-пациентов может быть направлена на активацию апоптоза в инфицированных вирусом клетках. Для этого может быть использован ресвератрол, который способен индуцировать апоптоз, одновременно ингибируя антиапоптотический белок Bcl2, и усиливая экспрессию p53 в нормальных и опухолевых клетках человека [60–62].

Мы призываем врачей и исследователей экспериментально проверить теоретическую основу нашей концепции и методы лечения COVID-19, вытекающие из предложенной нами антивирусной системы врожденного иммунитета.

ВЫВОДЫ

Представленные данные позволяют описать составные части и функционирование антивирусной системы врожденного иммунитета в организме человека. Мы полагаем, что антивирусная система врожденного

иммунитета имеет два главных компонента: это MAVS — белок наружной мембраны митохондрий и нейтрофилы периферической крови, способные формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки. В зависимости от пути активации MAVS при инфицировании клетки РНК-содержащим вирусом (SARS-CoV-2) развиваются два возможных варианта ее гибели — апоптоз или дегенерация клеток. Эти варианты преобладающей клеточной гибели определяют вид воспаления и характер течения заболевания. Развитие вирус-индуцированного апоптоза инфицированных клеток вызывает формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек, секрецию воспалительных цитокинов, генерацию АФК, тканевое повреждение, гемокоагуляцию и развитие острого воспалительного процесса в форме COVID-19-пневмонии. Нарушение прионоподобной реакции MAVS в ответ на вирусное инфицирование клетки запускает альтернативный путь активации аутофагии. Клетки в условиях продолжительной активации аутофагии испытывают некротические изменения и элиминируются из организма моноцитами/макрофагами, которые секретируют противовоспалительные цитокины. Такой тип реакции антивирусной системы врожденного иммунитета соответствует бессимптомному течению заболевания.

Приведенные основные этапы патогенеза коронавирусной инфекции дают возможность предложить патогенетически обоснованную терапию, которая сможет существенно ослабить тяжесть заболевания, активировать продуктивный иммунитет и понизить летальность.

Литература

- Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9 (4). pii: a023580. DOI: 10.1101/cshperspect.a023580.
- He X, Zhu Y, Zhang Y, Geng Y, Gong J, Geng J, et al. RNF34 functions in immunity and selective mitophagy by targeting MAVS for autophagic degradation. *EMBO J.* 2019. pii: e100978. DOI: 10.15252/embj.2018100978.
- Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang QX, Halfmann R, et al. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell.* 2014; 156 (6): 1207–2. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.063.
- Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9 (4). pii: a023580. DOI: 10.1101/cshperspect.a023580.
- Dutta M, Robertson SJ, Okumura A, Scott DP, Chang J, Weiss JM, et al. A Systems Approach Reveals MAVS Signaling in Myeloid Cells as Critical for Resistance to Ebola Virus in Murine Models of Infection. *Cell Rep.* 2017; 18 (3): 816–29. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.069.
- Hu Y, Dong X, He Z, Wu Y, Zhang S, Lin J, et al. Zika virus antagonizes interferon response in patients and disrupts RIG-I-MAVS interaction through its CARD-TM domains. *Cell Biosci.* 2019; 9: 46. DOI: 10.1186/s13578-019-0308-9. eCollection 2019.
- Hu X, Peng X, Lu C, Zhang X, Gan L, Gao Y, et al. Type I IFN expression is stimulated by cytosolic MtDNA released from pneumolysin-damaged mitochondria via the STING signaling pathway in macrophages. *FEBS J.* 2019. DOI: 10.1111/febs.15001.
- Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science.* 2015; 347 (6227): aaa2630. DOI: 10.1126/science.aaa2630.
- Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep.* 2013; 3 (5): 1355–61. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.05.009.
- Schwede F, Genieser HG, Rentsch A. The Chemistry of the Noncanonical Cyclic Dinucleotide 2'3'-cGAMP and Its Analogs. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 238: 359–84. DOI: 10.1007/164_2015_43.
- Eaglesham JB, Pan Y, Kupper TS, Kranzusch PJ. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS-STING signalling. *Nature.* 2019; 566 (7743): 259–63. DOI: 10.1038/s41586-019-0928-6.
- Oh DS, Kim TH, Lee HK. Differential Role of Anti-Viral Sensing

- Pathway for the Production of Type I Interferon — in Dendritic Cells and Macrophages Against Respiratory Syncytial Virus A2 Strain Infection. *Viruses*. 2019; 11 (1). pii: E62. DOI: 10.3390/v11010062.
13. Goritzka M, Makris S, Kausar F, Durant LR, Pereira C, Kumagai Y, et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med*. 2015 May 4; 212 (5): 699–714. DOI: 10.1084/jem.20140825.
 14. Goritzka M, Pereira C, Makris S, Durant LR, Johansson C. T cell responses are elicited against Respiratory Syncytial Virus in the absence of signalling through TLRs, RLRs and IL-1R/IL-18R. *Sci Rep*. 2015 Dec 21; 5: 18533. DOI: 10.1038/srep18533.
 15. Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, et al. TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (26): 10711–6. DOI: 10.1073/pnas.1307868110.
 16. Kirsebom FCM, Kausar F, Nuriev R, Makris S, Johansson C. Neutrophil recruitment and activation are differentially dependent on MyD88/TRIF and MAVS signaling during RSV infection. *Mucosal Immunol*. 2019. DOI: 10.1038/s41385-019-0190-0.
 17. Gonzalez-Quintal R, Nguyen A, Kono DH1, Oldstone MBA, Theofilopoulos AN, Baccala R. Lupus acceleration by a MAVS-activating RNA virus requires endosomal TLR signaling and host genetic predisposition. *PLoS One*. 2018; 13 (9): e0203118. DOI: 10.1371/journal.pone.0203118. eCollection 2018.
 18. Lei Y, Moore CB, Liesman RM, O'Connor BP, Bergstralh DT, Chen ZJ, et al. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One*. 2009; 4 (5): e5466. DOI: 10.1371/journal.pone.0005466.
 19. El Maadidi S, Faletti L, Berg B, Wenzl C, Wieland K, Chen ZJ, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis. *J Immunol*. 2014; 192 (3): 1171–83. DOI: 10.4049/jimmunol.1300842.
 20. Dong W, Lv H, Li C, Liu Y, Wang C, Lin J, et al. MAVS induces a host cell defense to inhibit CSFV infection. *Arch Virol*. 2018 Jul; 163 (7): 1805–21. DOI: 10.1007/s00705-018-3804-z.
 21. Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Joyce M, Tyrrell DL, Lemon SM. Murine Models of Hepatitis A Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019; 9 (1). pii: a031674. DOI: 10.1101/cshperspect.a031674.
 22. Liu D, Tan Q, Zhu J, Zhang Y, Xue Y, Song Y, et al. MicroRNA-33/33* inhibit the activation of MAVS through AMPK in antiviral innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2019. DOI: 10.1038/s41423-019-0326-x.
 23. Yang S, Harding AT, Sweeney C, Miao D, Swan G, Zhou C, et al. Control of antiviral innate immune response by protein geranylgeranylation. *Sci Adv*. 2019; 5 (5): eaav7999. DOI: 10.1126/sciadv.aav7999.
 24. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MT, et al. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin and β_2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood*. 2009; 113: 5254–65. DOI: 10.1182/blood-2008-09-180794.
 25. Manfredi AA, Covino C, Rovere-Querini P, Maugeri N. Instructive influences of phagocytic clearance of dying cells on neutrophil extracellular trap generation. *Clin Exp Immunol*. 2015; 179 (1): 24–9. DOI: 10.1111/cei.12320.
 26. Ma R, Xie R, Yu C, Si Y, Wu X, Zhao L, et al. Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 4978. DOI: 10.1038/s41598-017-04773-8.
 27. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytosis vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2018; 9: 288. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00288. eCollection 2018.
 28. Strumwasser A, Bhargava A, Victorino GP. Attenuation of Endothelial Phosphatidylserine Exposure Decreases Ischemia-Reperfusion Induced Changes in Microvascular Permeability. *J Trauma Acute Care Surg*. 2018; 84 (6): 838–46. DOI: 10.1097/TA.0000000000001891.
 29. Tong D, Yu M, Li G, Li T, Li J, Novakovic VA, et al. Phosphatidylserine-exposing Blood and Endothelial Cells Contribute to the Hypercoagulable State in Essential Thrombocythemia Patients. *Ann Hematol*. 2018; 97 (4): 605–16. DOI: 10.1007/s00277-018-3228-6.
 30. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019; 45 (1): 86–93. DOI: 10.1055/s-0038-1677040.
 31. Li B, Liu Y, Hu T, Zhang Y, Zhang C, Li T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Enhance Procoagulant Activity in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019; 145 (7): 1695–707. DOI: 10.1007/s00432-019-02922-2.
 32. Becker RC. COVID-19 Update: Covid-19-associated Coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 1–14. DOI: 10.1007/s11239-020-02134-3.
 33. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting Potential Drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps. *J Exp Med*. 2020; 217 (6): e20200652. DOI: 10.1084/jem.20200652.
 34. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020; ciaa248. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
 35. Казимирский А. Н., Порядин Г. В., Салмаси Ж. М. Механизмы развития иммунодефицита при неспецифическом воспалении инфекционного генеза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2003; 3: 23.
 36. Порядин Г. В., Салмаси Ж. М., Казимирский А. Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2006; 1: 2–7.
 37. Салмаси Ж. М., Казимирский А. Н., Порядин Г. В. Ведущие механизмы патогенеза при воспалении различного генеза. *Русский иммунологический журнал*. 2019; 13-22 (2); 518–20.
 38. Zhang L, Pang R, Xue X, Bao J, Ye S, Dai Y, et al. Anti-SARS-CoV-2 Virus Antibody Levels in Convalescent Plasma of Six Donors Who Have Recovered From COVID-19 Aging (Albany NY). 2020; 12 (8): 6536–42. DOI: 10.18632/aging.103102.
 39. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020; ciaa310. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
 40. Lee Y-L, Liao C-H, Liu P-Y, Cheng C-Y, Chung M-Y, Liu C-E, et al. Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG Antibodies Among COVID-19 Patients. *J Infect*. 2020; S0163-4453(20)30230-9. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.019.
 41. Казимирский А. Н., Порядин Г. В., Салмаси Ж. М., Семенова Л. Ю. Эндогенные регуляторы иммунной системы (sCD100, малоновый диальдегид, аргиназа). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164 (11): 652–60.
 42. Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV. Coordination of Innate and Adaptive Immunity Depending on Neutrophilic Extracellular Traps Formation. *Austin J Clin Immunol*. 2019; 6 (1): 1037.
 43. Казимирский А. Н., Салмаси Ж. М., Порядин Г. В. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки — регуляторы формирования врожденного и адаптивного иммунитета. *PMЖ. Медицинское обозрение*. 2020; 1: 38–41. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-38-41.
 44. Imai K, Tabata S, Ikeda M, Noguchi S, Kitagawa Y, Matuoka M, et al. Clinical Evaluation of an Immunochromatographic IgM/IgG Antibody Assay and Chest Computed Tomography for the Diagnosis of COVID-19. *J Clin Virol*. 2020; 128: 104393. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104393.
 45. Hu Z, Song C, Xu C, Jin G, Chen Y, Xu X, et al. Clinical Characteristics of 24 Asymptomatic Infections With COVID-19 Screened Among Close Contacts in Nanjing, China. *Sci China Life Sci*. 2020; 63 (5): 706–11. DOI: 10.1007/s11427-020-1661-4.
 46. Baettig SJ, Parini A, Cardona I, Morand GB. Case Series of Coronavirus (SARS-CoV-2) in a Military Recruit School: Clinical, Sanitary and Logistical Implications. *BMJ Mil Health*. 2020; DOI: 10.1136/bmjmilitary-2020-001482.
 47. Rozières A, Viret C, Faure M. Autophagy in Measles Virus Infection. *Viruses*. 2017; 9 (12): 359. DOI: 10.3390/v9120359.

48. Mohamud Y, Shi J, Qu J, Poon T, Xue YC, Deng H, et al. Enteroviral Infection Inhibits Autophagic Flux via Disruption of the SNARE Complex to Enhance Viral Replication. *Cell Rep*. 2018; 22 (12): 3292–303. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.090.
49. Lai JKF, Sam I-C, Verhac P, Baguet J, Eskelinen E-L, Faure M, et al. 2BC Non-Structural Protein of Enterovirus A71 Interacts With SNARE Proteins to Trigger Autolysosome Formation Viruses. 2017; 9 (7): 169. DOI: 10.3390/v9070169.
50. Peng H, Liu B, Yves TD, He Y, Wang S, Tang H, et al. Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses*. 2018; 10 (5): 259. DOI: 10.3390/v10050259.
51. Gratton R, Agreli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (5): 1048. DOI: 10.3390/ijms20051048.
52. Blázquez A-B, Escribano-Romero E, Merino-Ramos T, Saiz J-C, Martín-Acebes MA. Infection With Usutu Virus Induces an Autophagic Response in Mammalian Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7 (10): e2509. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002509.
53. Lee N-R, Ban J, Lee N-J, Yi C-M, Choi J-Y, Kim H, et al. Activation of RIG-I-Mediated Antiviral Signaling Triggers Autophagy Through the MAVS-TRAF6-Beclin-1 Signaling Axis. *Front Immunol*. 2018 Sep 12; 9: 2096. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02096.
54. Silva LM, Jung JU. Modulation of the Autophagy Pathway by Human Tumor Viruses. *Semin Cancer Biol*. 2013; 23 (5): 323–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.05.005.
55. Green DR, Llambl F. Cell Death Signaling Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; 7 (12): a006080. DOI: 10.1101/cshperspect.a006080.
56. Nishida K, Tamura A, Yui N. ER Stress-Mediated Autophagic Cell Death Induction Through Methylated β -Cyclodextrins-Threaded Acid-Labile Polyrotaxanes. *J Control Release*. 2018; 275: 20–31. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.010.
57. Wang Y, Jiang K, Zhang Q, Meng S, Ding C. Autophagy in Negative-Strand RNA Virus Infection. *Front Microbiol*. 2018; 9: 206. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00206.
58. Müller-Quernheim UC, Potthast L, Müller-Quernheim J, Zissel G. Tumor-cell Co-Culture Induced Alternative Activation of Macrophages Is Modulated by Interferons in Vitro. *J Interferon Cytokine Res*. 2012; 32 (4): 169–77. DOI: 10.1089/jir.2011.0020.
59. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015; 53 (5): 676–88. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0012OC.
60. Yang Y, Huang X, Chen S, Ma G, Zhu M, Yan F, Yu J. Resveratrol Induced Apoptosis in Human Gastric Carcinoma SGC-7901 Cells via Activation of Mitochondrial Pathway. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018; 14 (5): e317–e324. DOI: 10.1111/ajco.12841.
61. Wang D, Gao Z, Zhang X. Resveratrol Induces Apoptosis in Murine Prostate Cancer Cells via Hypoxia-Inducible Factor 1- α (HIF-1 α)/Reactive Oxygen Species (ROS)/P53 Signaling. *Med Sci Monit*. 2018; 24: 8970–6. DOI: 10.12659/MSM.913290.
62. Li C, Hu W-L, Lu M-X, Xiao G-F. Resveratrol Induces Apoptosis of Benign Prostatic Hyperplasia Epithelial Cell Line (BPH-1) Through p38 MAPK-FOXO3a Pathway BMC Complement Altern Med. 2019; 19 (1): 233. DOI: 10.1186/s12906-019-2648-8.

References

1. Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017; 9 (4): pii: a023580. DOI: 10.1101/cshperspect.a023580.
2. He X, Zhu Y, Zhang Y, Geng Y, Gong J, Geng J, et al. RNF34 functions in immunity and selective mitophagy by targeting MAVS for autophagic degradation. *EMBO J*. 2019. pii: e100978. DOI: 10.15252/embj.2018100978.
3. Cai X, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang QX, Halfmann R, et al. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*. 2014; 156 (6): 1207–2. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.063.
4. Cai X, Xu H, Chen ZJ. Prion-Like Polymerization in Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017; 9 (4): pii: a023580. DOI: 10.1101/cshperspect.a023580.
5. Dutta M, Robertson SJ, Okumura A, Scott DP, Chang J, Weiss JM, et al. A Systems Approach Reveals MAVS Signaling in Myeloid Cells as Critical for Resistance to Ebola Virus in Murine Models of Infection. *Cell Rep*. 2017; 18 (3): 816–29. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.069.
6. Hu Y, Dong X, He Z, Wu Y, Zhang S, Lin J, et al. Zika virus antagonizes interferon response in patients and disrupts RIG-I-MAVS interaction through its CARD-TM domains. *Cell Biosci*. 2019; 9: 46. DOI: 10.1186/s13578-019-0308-9. eCollection 2019.
7. Hu X, Peng X, Lu C, Zhang X, Gan L, Gao Y, et al. Type I IFN expression is stimulated by cytosolic MtDNA released from pneumolysin-damaged mitochondria via the STING signaling pathway in macrophages. *FEBS J*. 2019. DOI: 10.1111/febs.15001.
8. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*. 2015; 347 (6227): aaa2630. DOI: 10.1126/science.aaa2630.
9. Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep*. 2013; 3 (5): 1355–61. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.05.009.
10. Schwede F, Genieser HG, Rentsch A. The Chemistry of the Noncanonical Cyclic Dinucleotide 2'3'-cGAMP and Its Analogs. *Handb Exp Pharmacol*. 2017; 238: 359–84. DOI: 10.1007/164_2015_43.
11. Eaglesham JB, Pan Y, Kupper TS, Kranzusch PJ. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS-STING signalling. *Nature*. 2019; 566 (7743): 259–63. DOI: 10.1038/s41586-019-0928-6.
12. Oh DS, Kim TH, Lee HK. Differential Role of Anti-Viral Sensing Pathway for the Production of Type I Interferon — in Dendritic Cells and Macrophages Against Respiratory Syncytial Virus A2 Strain Infection. *Viruses*. 2019; 11 (1): pii: E62. DOI: 10.3390/v11010062.
13. Goritzka M, Makris S, Kausar F, Durant LR, Pereira C, Kumagai Y, et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med*. 2015 May 4; 212 (5): 699–714. DOI: 10.1084/jem.20140825.
14. Goritzka M, Pereira C, Makris S, Durant LR, Johansson C. T cell responses are elicited against Respiratory Syncytial Virus in the absence of signalling through TLRs, RLRs and IL-1R/IL-18R. *Sci Rep*. 2015 Dec 21; 5: 18533. DOI: 10.1038/srep18533.
15. Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mupuri J, Vitetta ES, et al. TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (26): 10711–6. DOI: 10.1073/pnas.1307868110.
16. Kirsebom FCM, Kausar F, Nuriev R, Makris S, Johansson C. Neutrophil recruitment and activation are differentially dependent on MyD88/TRIF and MAVS signaling during RSV infection. *Mucosal Immunol*. 2019. DOI: 10.1038/s41385-019-0190-0.
17. Gonzalez-Quintal R, Nguyen A, Kono DH1, Oldstone MBA, Theofilopoulos AN, Baccala R. Lupus acceleration by a MAVS-activating RNA virus requires endosomal TLR signaling and host genetic predisposition. *PLoS One*. 2018; 13 (9): e0203118. DOI: 10.1371/journal.pone.0203118. eCollection 2018.
18. Lei Y, Moore CB, Liesman RM, O'Connor BP, Bergstralh DT, Chen ZJ, et al. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One*. 2009; 4 (5): e5466. DOI: 10.1371/journal.pone.0005466.
19. El Maadidi S, Faletti L, Berg B, Wenzl C, Wieland K, Chen ZJ, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis. *J Immunol*. 2014; 192 (3): 1171–83. DOI: 10.4049/jimmunol.1300842.
20. Dong W, Lv H, Li C, Liu Y, Wang C, Lin J, et al. MAVS induces a

- host cell defense to inhibit CSFV infection. *Arch Virol.* 2018 Jul; 163 (7): 1805–21. DOI: 10.1007/s00705-018-3804-z.
21. Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Joyce M, Tyrrell DL, Lemon SM. Murine Models of Hepatitis A Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019; 9 (1). pii: a031674. DOI: 10.1101/cshperspect.a031674.
 22. Liu D, Tan Q, Zhu J, Zhang Y, Xue Y, Song Y, et al. MicroRNA-33/33* inhibit the activation of MAVS through AMPK in antiviral innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2019. DOI: 10.1038/s41423-019-0326-x.
 23. Yang S, Harding AT, Sweeney C, Miao D, Swan G, Zhou C, et al. Control of antiviral innate immune response by protein geranylgeranylation. *Sci Adv.* 2019; 5 (5): eaav7999. DOI: 10.1126/sciadv.aav7999.
 24. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MT, et al. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin and {beta}2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood.* 2009; 113: 5254–65. DOI: 10.1182/blood-2008-09-180794.
 25. Manfredi AA, Covino C, Rovere-Querini P, Maugeri N. Instructive influences of phagocytic clearance of dying cells on neutrophil extracellular trap generation. *Clin Exp Immunol.* 2015; 179 (1): 24–9. DOI: 10.1111/cei.12320.
 26. Ma R, Xie R, Yu C, Si Y, Wu X, Zhao L, et al. Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 4978. DOI: 10.1038/s41598-017-04773-8.
 27. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil's Choice: Phagocytosis vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2018; 9: 288. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00288. eCollection 2018.
 28. Strumwasser A, Bhargava A, Victorino GP. Attenuation of Endothelial Phosphatidylserine Exposure Decreases Ischemia-Reperfusion Induced Changes in Microvascular Permeability. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018; 84 (6): 838–46. DOI: 10.1097/TA.0000000000001891.
 29. Tong D, Yu M, Li G, Li T, Li J, Novakovic VA, et al. Phosphatidylserine-exposing Blood and Endothelial Cells Contribute to the Hypercoagulable State in Essential Thrombocythemia Patients. *Ann Hematol.* 2018; 97 (4): 605–16. DOI: 10.1007/s00277-018-3228-6.
 30. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2019; 45 (1): 86–93. DOI: 10.1055/s-0038-1677040.
 31. Li B, Liu Y, Hu T, Zhang Y, Zhang C, Li T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Enhance Procoagulant Activity in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019; 145 (7): 1695–707. DOI: 10.1007/s00432-019-02922-2.
 32. Becker RC. COVID-19 Update: Covid-19-associated Coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020; 1–14. DOI: 10.1007/s11239-020-02134-3.
 33. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting Potential Drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps. *J Exp Med.* 2020; 217 (6): e20200652. DOI: 10.1084/jem.20200652.
 34. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020; ciaa248. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
 35. Kazimirskii AN, Poryadin GV, Salmasi JM. The mechanisms of development of immunodeficiency in non-specific inflammation of infectious origin. *Pathological physiology and experimental therapy.* 2003; 3: 23. Russian.
 36. Poryadin GV, Salmasi JM, Kazimirskii AN. Activation markers of lymphocytes as indicators of dysregulation of the immune system during inflammation. *Pathological physiology and experimental therapy.* 2006; 1: 2–7. Russian.
 37. Salmasi JM, Kazimirskii AN, Poryadin GV. The leading mechanisms of pathogenesis in inflammation of various origins. *Russian Immunological Journal.* 2019; 13-22 (2): 518–20. Russian.
 38. Zhang L, Pang R, Xue X, Bao J, Ye S, Dai Y, et al. Anti-SARS-CoV-2 Virus Antibody Levels in Convalescent Plasma of Six Donors Who Have Recovered From COVID-19 Aging (Albany NY). 2020; 12 (8): 6536–42. DOI: 10.18632/aging.103102.
 39. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020; ciaa310. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
 40. Lee Y-L, Liao C-H, Liu P-Y, Cheng C-Y, Chung M-Y, Liu C-E, et al. Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG Antibodies Among COVID-19 Patients. *J Infect.* 2020; S0163-4453(20)30230-9. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.019.
 41. Kazimirskii AN, Poryadin GV, Salmasi JM, Semenova LY. Endogenous regulators of the immune system (sCD100, malonic dialdehyde, and arginase). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2018; 164 (5): 693–700. DOI: 10.1007/s10517-018-4061-6.
 42. Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV. Coordination of Innate and Adaptive Immunity Depending on Neutrophilic Extracellular Traps Formation. *Austin J Clin Immunol.* 2019; 6 (1): 1037.
 43. Kazimirskii AN, Salmasi JM, Poryadin GV. Neutrophil extracellular traps regulate the development of innate and adaptive immune system. *Russian Medical Review.* 2020; 4 (1): 38–41. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-1-38-41. Russian.
 44. Imai K, Tabata S, Ikeda M, Noguchi S, Kitagawa Y, Matuoka M, et al. Clinical Evaluation of an Immunochromatographic IgM/IgG Antibody Assay and Chest Computed Tomography for the Diagnosis of COVID-19. *J Clin Virol.* 2020; 128: 104393. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104393.
 45. Hu Z, Song C, Xu C, Jin G, Chen Y, Xu X, et al. Clinical Characteristics of 24 Asymptomatic Infections With COVID-19 Screened Among Close Contacts in Nanjing, China. *Sci China Life Sci.* 2020; 63 (5): 706–11. DOI: 10.1007/s11427-020-1661-4.
 46. Baettig SJ, Parini A, Cardona I, Morand GB. Case Series of Coronavirus (SARS-CoV-2) in a Military Recruit School: Clinical, Sanitary and Logistical Implications. *BMJ Mil Health.* 2020; DOI: 10.1136/bmj.military-2020-001482.
 47. Rozières A, Viret C, Faure M. Autophagy in Measles Virus Infection. *Viruses.* 2017; 9 (12): 359. DOI: 10.3390/v9120359.
 48. Mohamud Y, Shi J, Qu J, Poon T, Xue YC, Deng H, et al. Enteroviral Infection Inhibits Autophagic Flux via Disruption of the SNARE Complex to Enhance Viral Replication. *Cell Rep.* 2018; 22 (12): 3292–303. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.090.
 49. Lai JKF, Sam I-C, Verlhac P, Baguet J, Eskelinen E-L, Faure M, et al. 2BC Non-Structural Protein of Enterovirus A71 Interacts With SNARE Proteins to Trigger Autolysosome Formation. *Viruses.* 2017; 9 (7): 169. DOI: 10.3390/v9070169.
 50. Peng H, Liu B, Yves TD, He Y, Wang S, Tang H, et al. Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses.* 2018; 10 (5): 259. DOI: 10.3390/v10050259.
 51. Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (5): 1048. DOI: 10.3390/ijms20051048.
 52. Blázquez A-B, Escribano-Romero E, Merino-Ramos T, Saiz J-C, Martín-Acebes MA. Infection With Usutu Virus Induces an Autophagic Response in Mammalian Cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7 (10): e2509. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002509.
 53. Lee N-R, Ban J, Lee N-J, Yi C-M, Choi J-Y, Kim H, et al. Activation of RIG-I-Mediated Antiviral Signaling Triggers Autophagy Through the MAVS-TRAF6-Beclin-1 Signaling Axis. *Front Immunol.* 2018 Sep 12; 9: 2096. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02096.
 54. Silva LM, Jung JU. Modulation of the Autophagy Pathway by Human Tumor Viruses. *Semin Cancer Biol.* 2013; 23 (5): 323–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.05.005.
 55. Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7 (12): a006080. DOI: 10.1101/cshperspect.a006080.
 56. Nishida K, Tamura A, Yui N. ER Stress-Mediated Autophagic Cell Death Induction Through Methylated β -Cyclodextrins-Threaded Acid-Labile Polyrotaxanes. *J Control Release.* 2018; 275: 20–31. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.010.
 57. Wang Y, Jiang K, Zhang Q, Meng S, Ding C. Autophagy in Negative-Strand RNA Virus Infection. *Front Microbiol.* 2018; 9: 206. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00206.
 58. Müller-Quernheim UC, Potthast L, Müller-Quernheim J, Zissel G. Tumor-cell Co-Culture Induced Alternative Activation of

- Macrophages Is Modulated by Interferons in Vitro. *J Interferon Cytokine Res.* 2012; 32 (4): 169–77. DOI: 10.1089/jir.2011.0020.
59. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015; 53 (5): 676–88. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0012OC.
 60. Yang Y, Huang X, Chen S, Ma G, Zhu M, Yan F, Yu J. Resveratrol Induced Apoptosis in Human Gastric Carcinoma SGC-7901 Cells via Activation of Mitochondrial Pathway. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018; 14 (5): e317–e324. DOI: 10.1111/ajco.12841.
 61. Wang D, Gao Z, Zhang X. Resveratrol Induces Apoptosis in Murine Prostate Cancer Cells via Hypoxia-Inducible Factor 1- α (HIF-1 α)/Reactive Oxygen Species (ROS)/P53 Signaling. *Med Sci Monit.* 2018; 24: 8970–6. DOI: 10.12659/MSM.913290.
 62. Li C, Hu W-L, Lu M-X, Xiao G-F. Resveratrol Induces Apoptosis of Benign Prostatic Hyperplasia Epithelial Cell Line (BPH-1) Through p38 MAPK-FOXO3a Pathway *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19 (1): 233. DOI: 10.1186/s12906-019-2648-8.

НОВЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА К МЕЗОТЕЛИНУ И КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ю. Е. Кравченко, С. П. Чумаков , Е. И. Фролова

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

Среди случаев трижды негативного рака молочной железы (ТНПМЖ) преобладают новообразования с повышенной экспрессией поверхностного антигена мезотелина (MSLN) — одной из предпочтительных мишеней для направленной терапии многих видов солидных опухолей. Разработка MSLN-опосредованной терапии ТНПМЖ осложнена тем, что большая часть перевиваемых клеточных культур этого субтипа MSLN-негативны. Целью работы было найти гиперэкспрессирующие MSLN модельные клеточные культуры ТНПМЖ и получить новые однодоменные антитела (наноантитела), распознающие MSLN на клетках ТНПМЖ. Уровни транскрипта мезотелина были определены на панели клеточных линий ТНПМЖ при помощи ОТ-ПЦР-РВ, результаты верифицированы непрямым иммуно-ферментным анализом на мегакариоцит-потенцирующий фактор, секретируемую часть белка-предшественника мезотелина. Для получения наноантител адаптировали метод предварительного обогащения иммунных библиотек фрагментов VHH-антител из мононуклеаров *Vicugna pacos* с селекцией при помощи фагового дисплея. В результате исследования получены два варианта наноантител, обладающих высокой специфичностью взаимодействия с мишенью и K_d около 140 и 95 нмоль. Были идентифицированы две линии клеток MSLN⁺ и три линии MSLN⁻ ТНПМЖ. Наноантитела оказались способны распознавать целевой антиген на MSLN⁺ клетках и обладали низким уровнем связывания с MSLN⁻ клеточными культурами. Установлена удобная клеточная модель MSLN⁺ ТНПМЖ для тестирования MSLN-опосредованной терапии; новые однодоменные антитела могут быть использованы в качестве нацеливающих частей химерных антигенных рецепторов.

Ключевые слова: наноантитела, химерный антигенный рецептор, мезотелин, трижды негативный рак молочной железы

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

Вклад авторов: Ю. Е. Кравченко — работа с клеточными культурами, ПЦР-РВ, ИФА; С. П. Чумаков — получение иммунных библиотек, проведение селекции, очистка белковых препаратов, цитометрия, написание рукописи; Е. И. Фролова — планирование исследования, проведение манипуляций с животными, работа с первичными культурами, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: работу с животными проводили в соответствии с принципами и требованиями Международной лаборатории по уходу за животными и Директивой совета европейских сообществ (86/609/EEC) от 24 ноября 1986 г.

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

Статья получена: 28.09.2020 **Статья принята к печати:** 20.10.2020 **Опубликована онлайн:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.068

NEW ANTI-MESOTHELIN SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES AND CELL MODELS FOR DEVELOPING TARGETED BREAST CANCER THERAPY

Kravchenko YuE, Chumakov SP , Frolova EI

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Most triple negative breast cancers (TNBC) are characterized by elevated expression of mesothelin (MSLN), a cell surface antigen and one of the preferred targets for the therapy of solid tumors. Most continuous TNBC cell lines are MSLN-negative, which obstructs the development of MSLN-targeted therapy for TNBC. The aim of this study was to identify TNBC cell lines with MSLN hyperexpression and to obtain single-domain antibodies (nanobodies) capable of recognizing MSLN in TNBC cells. Mesothelin expression levels were measured in the panel of TNBC cell lines by real-time reverse-transcription PCR. PCR results were verified by measuring concentrations of the megakaryocyte potentiating factor (the secreted fragment of the mesothelin precursor) using sandwich ELISA. Immune phage-display VHH fragment libraries were prepared from mononuclear cells of *Vicugna pacos* using a modified library enrichment protocol. Two nanobody variants with high specificity for the target and K_d of about 140 and 95 nmol, respectively were obtained. Two MSLN⁺ and three MSLN⁻ cell lines were identified in the TNBC cell lines panel. The nanobodies demonstrated the ability to recognize the target antigen in MSLN⁺ cells and had the low ability to bind to MSLN⁻ cells. Thus, we found a convenient MSLN⁺ TNBC cell model for MSLN-targeted therapy testing. The new single-domain antibodies can be used as targeting components of chimeric antigen receptors.

Keywords: nanobody, chimeric antigen receptor, mesothelin, triple-negative breast cancer

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

Author contribution: Kravchenko JE — cell culture, real-time PCR and ELISA; Chumakov SP — preparation of immune libraries, protein purification, flow cytometry, manuscript preparation; Frolova EI — study design, immunization and blood collection, primary cultures, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in compliance with the guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International and the Directive 86/609/EEC dated November 24, 1986.

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

Received: 28.09.2020 **Accepted:** 20.10.2020 **Published online:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.068

Мезотелин (mesothelin, MSLN) — небольшой поверхностный белок, закрепленный на клеточной мембране при помощи С-концевого гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якоря) [1]. В организме человека экспрессия мезотелина ограничена клетками выстилки перикарда, брюшины и плевральной полости, однако многие типы опухолей

(100% мезотелиом, до 70% рака яичников, 60% ТНПМЖ, 50% рака легкого, опухоли поджелудочной железы и желчевыводящих путей, рак желудка) характеризуются высоким содержанием мезотелина на поверхности клеток [2, 3]. Биологическая роль мезотелина в развитии злокачественного новообразования понятна не до конца.

Мезотелин выступает в качестве рецептора для другого опухолевого антигена, MUC16, что может стимулировать интраперитонеальную метастатическую экспансию MUC16-экспрессирующих клеток, которая характерна для опухолей яичника [4]. Мезотелин может подавлять TNF α -индуцированный апоптоз опухолевых клеток [5], стимулировать пролиферацию, опухолевую инвазию [6] и резистентность к химиотерапии [7]. Явное проонкогенное влияние этого белка, его усиленная продукция в наиболее злокачественных субпопуляциях опухолевых клеток и ограниченная экспрессия в нормальных тканях делают мезотелин одной из наиболее предпочтительных мишеней для направленной терапии опухолей моноклональными антителами и иммунными клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы (XAP). Уже проходят испытания нескольких вариантов иммунотоксикотерапии и MSLN-CAR-T для терапии мезотелиом, протоковых раков поджелудочной железы, желчевыводящих путей, желудка и яичников [3].

Мезотелин может выступать в качестве маркера для большей части THPMЖ [8]. Этот условный субтип РМЖ определяют как не имеющий повышенных уровней экспрессии эстрогенового рецептора (ЭР), прогестеронового рецептора (ПР) и рецептора HER2/neu (ERBB2). THPMЖ характеризуется высокой злокачественностью и наиболее неблагоприятным прогнозом, что связано с отсутствием эффективных терапевтических схем. Были предприняты попытки разделить этот субтип по экспрессионным паттернам: недавно из THPMЖ выделен клаудин-дефицитный подтип [9], однако это пока не привело к появлению средств специфической терапии. Мезотелин, который гиперэкспрессирован у более половины THPMЖ и у не более 4% ER⁺, PR⁺ и ERBB2⁺ опухолей молочной железы, мог бы выступать и в качестве достаточно селективного маркера THPMЖ, и в качестве перспективной терапевтической мишени [10].

В MSLN-направленной терапии при помощи препаратов клеток, несущих XAP, используют последовательности известных моноклональных антител к MSLN, переведенных в одноцепочечный формат (scFv) [11]. Такой подход позволяет быстро получить прототипные варианты структур XAP и испытать их эффективность, однако у него имеются и недостатки. Полученные из традиционных антител scFv могут иметь ухудшенные физико-химические свойства за счет нарушенной вторичной структуры и сниженную степень сродства к мишени либо специфичность связывания [12]. Кроме того, при отборе моноклональных антител для иммунотерапии и иммунодиагностики оптимальными считают варианты, обладающие высокой (десятки наномоль и меньше) аффинностью. Для XAP же показано, что наиболее значимым является специфичность связывания антигена, при этом оптимальная степень сродства к мишени может быть существенно ниже [13]. Такие различия приводят к необходимости поиска новых вариантов антител для использования в составе XAP.

Применение антител в виде scFv для XAP-опосредованной терапии дает дополнительные преимущества альтернативным структурам иммуноглобулинов, в частности, однодоменным антителам (sdAb) верблюдовых [14]. Антитела, состоящие из гомодимеров особых укороченных тяжелых цепей (VHH, variable heavy-heavy), возникли у животных семейства вследствие точечной мутации в шарнирной области тяжелой цепи, и в ходе эволюции адаптировались для эффективного распознавания антигенов без участия

вариабельных фрагментов легких цепей [15]. За счет большей протяженности CDR3 и наличия дополнительной дисульфидной связи, VHH-антитела обладают способностью связываться с мишенями с аффинностью и специфичностью, аналогичными антителам традиционной структуры, при этом обладают меньшим размером и хорошей растворимостью. Локализация распознающих антигены участков на единственной пептидной цепи максимально упрощает применение VHH-антител в виде scFv (VHH-фрагментов, или наноантител), что особенно востребовано при создании новых вариантов XAP [16]. Уже известны два варианта VHH-антител к мезотелину, однако их использование пока ограничено иммунодиагностикой [17, 18].

Для использования анти-MSLN XAP в терапии THPMЖ необходимы создание и испытание антигенраспознающих фрагментов к MSLN, а также поиск оптимальной модели для испытания таких XAP *ex vivo*. Согласно данным литературы, среди клеточных линий THPMЖ наиболее распространены MSLN⁺. Целью работы было провести скрининг панели коммерчески доступных линий THPMЖ для поиска модельной культуры, характеризующейся высоким уровнем MSLN, провести селекцию VHH-антител к MSLN методом фагового дисплея и идентифицировать несколько вариантов последовательностей, которые могут быть использованы для создания анти-MSLN XAP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Использованные в работе линии клеток HEK-293T (культура человеческих трансформированных клеток) и MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-453, HCC1937, HCC1143, HCC38, HCC70, HCC1806, HCC1187, HCC1395, BT-549, BT-20 и Hs 578T (THPMЖ) были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC; США). Их культивировали в среде DMEM-F12 (PAA; Австрия) с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки телят (Gibco; США), 2 mM аланилглутамин (ПанЭко; Россия), 20 mM HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко»; Россия).

Выделение РНК и постановка обратной транскрипции

Выделение РНК проводили на колонках с использованием набора RNeasy Mini kit (Qiagen; США) по протоколу производителя либо в препаративных количествах с применением реагента ExtractRNA («Евроген»; Россия) в соответствии с протоколом производителя. Очищенную РНК использовали для синтеза обратной цепи кДНК при помощи ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB; США). На реакцию брали 500 нг РНК, смешивали с компонентами набора по протоколу производителя с использованием праймера d(T)23; для получения кДНК VHH-фрагментов использовали специфичный праймер CH2-IgG-sp rev (GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC), инкубировали смесь в течение часа при 42 °C, затем при 80 °C в течение 5 мин. Для количественной ПЦР (кПЦР) использовали не более 50 нг кДНК для реакции.

ПЦР в реальном времени

кПЦР проводили с использованием полимеразы HS-Taq («Евроген»; Россия) и набора специфичных праймеров MSLN-qPCR dir (GCACTCCTCTTTCTGCCTGG), MSLN-

qPCR rev (GCCATGGTCTGTGTAGATCCC) и MSLN-probe (5'-FAM-CCCACGGTGCCTCCCTCCCT-BHQ1-3') («ДНК-синтез»; Россия). Подбор праймеров и проб осуществляли с использованием Primer-BLAST (NIH NCBI; США). Анализ праймеров на образование вторичных структур производили при помощи OligoAnalyzer Tool (IDT; США). Все эксперименты проводили в шести независимых повторностях. Сравнение представленности в образцах целевых транскриптов проводили с использованием порогового метода анализа накопления ДНК, предполагающего определение порогового цикла реакции Ct. Для внутреннего контроля процедуры ПЦР-ПВ использовали уровень экспрессии *GAPDH*, относительно которого нормализовали показатели экспрессии целевых генов (ΔCt). В качестве калибровочного образца, относительно которого определяли изменение уровней экспрессии анализируемых генов, использовали значение ΔCt в пробе с кДНК, выделенной из клеточной культуры MDA-MB-231. Таким образом, финальный расчет изменений уровней экспрессии генов в исследуемых образцах производили по формуле $2^{-\Delta Ct(\text{образца} - \Delta Ct(\text{калиб})}$ [19]. Постановку ПЦР производили в приборе MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-rad; США).

Получение продуцента MSLN и наработка рекомбинантного белка

кДНК, приготовленную из клеток линии HCC1806, использовали для постановки ПЦР с праймерами на последовательность мембрано-заякоренной части мезотелина MSLN full dir (GAAGTGGAG AAGACAGCCTGTCTTCAGGC) и MSLN full rev (GCTGAGGTCTAGGACCAGGTAGCCGTTG) («ДНК-синтез»; Россия) с предпрогревом 95 °C — 120 с, затем 30 циклов (95 °C — 30 с, 66 °C — 30 с, 72 °C — 60 с) с использованием полимеразы Tersus («Евроген»; Россия). Потом реакционную смесь электрофоретически разделили в 1%-м агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем Sybr Gold (Thermo; США), полосу, соответствующую размеру целевого продукта (~890 п.н.), выделили из геля при помощи набора Cleanup mini («Евроген»; Россия). Полученную ДНК подвергли ПЦР с праймерами MSLN Xba dir (AGAGAGTCTA GAGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCTTCAGGC) и MSLN BglII rev (AAGAGAGATCTGCTGAGGTCTAGGACCAGGTAGCCG TTG) по указанной выше программе (18 циклов). Продукт ПЦР повторно очищали при помощи набора Cleanup mini и клонировали по сайтам рестрикции XbaI — BglII/BamHI (ферменты, NEB; США) в лентивирусный экспрессионный вектор pLCMV-HT-puro (лигаза T4, «Евроген»; Россия). Плазмидную ДНК pLCMV-MSLN-HT-puro очищали при помощи набора Plasmid miniprep («Евроген»; Россия). Для приготовления препарата лентивируса клетки HEK-293T рассаживали на чашку диаметром 10 см в количестве 106 клеток. На следующий день плазмиду pLCMV-MSLN-HT-puro смешивали с упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2.G (обе плазмиды были любезно предоставлены Дидьером Троне (Addgene plasmid # 12260; <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene_12260 и Addgene plasmid # 12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene_12259) в весовом соотношении 5 : 3 : 2 в суммарном количестве 20 мкг. Трансфекцию проводили по протоколу, адаптированному из опубликованной ранее работы [20] в среде Opti-MEM (Gibco; США). На следующий день среду меняли на бессывороточную DMEM-F12 с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture

(Peprotech; США) и 4 мМ кофеина (Sigma Aldrich; США). Через 48 ч обогащенную вирусом среду собирали, фильтровали и добавляли с 10 мкг/мл полибрена (Sigma Aldrich; США) к свежим клеткам HEK-293T, высаженным чашку диаметром 10 см в количестве 5×10^5 . После суток инкубации среду заменяли на обычную. Через 72 ч после заражения в среду добавляли 1 мкг/мл пиромидина (Sigma Aldrich; США) и продолжали культивировать в течение 10 дней. Для наработки рекомбинантного мезотелина клетки рассаживали в количестве $2,5 \times 10^7$ на шесть чашек диаметром 15 см со средой DMEM-F12 с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture, белоксодержащие культуральные жидкости собирали каждые четыре дня в течение 16 дней. Очистку рекомбинантного мезотелина проводили с использованием HIS Mag Sepharose Excel (Cytiva; США) по протоколу производителя. Объединенные образцы мезотелина затем переводили в фосфатно-солевой буфер при помощи колонок PD-10 (Cytiva; США). Концентрацию белка определяли путем измерения OD280 на Nanodrop OneC (Thermo; США), контроль качества препарата мезотелина проводили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания Coomassie Blue G-250 по стандартному протоколу.

Иммунизация животного и получение генетического материала

Источником биологического материала (венозной крови) было животное альпака (Vicugna pacos) семейства верблюдовых. Для проведения первичной иммунизации использовали препарат мезотелина в количестве 400 мкг и объеме 500 мкл, смешиваемый с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Pierce; США) до получения гомогенной суспензии. Для проведения бустирований использовали по 250 мкг мезотелина в объеме 500 мкл в смеси с равным количеством неполного адьюванта Фрейнда. Всего было проведено три бустирования с интервалом в две недели; антиген вводили подкожно и внутримышечно в бедро животного. Одновременно с каждой иммунизацией забирали образец венозной крови объемом 10 мл для определения сывороточной концентрации антител к мезотелину. Получение материала В-клеток проводили через пять дней после последнего бустирования, фракция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) была получена из 100 мл свежесобранной крови альпаки с помощью центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1,077 («ПанЭко»; Россия) согласно стандартному протоколу.

Проведение предварительного отбора В-лимфоцитов

Препарат рекомбинантного мезотелина биотинилировали NHS-LC-biotin (Covachem; США) согласно стандартному протоколу. Биотинилированный мезотелин использовали для магнитной сепарации В-лимфоцитов при помощи EasySep Biotin Positive Selection Kit II (Stemcell technologies; Канада) согласно протоколу производителя. Для выделения РНК из селектированной фракции клеток использовали соосадитель Satellite red («Евроген»; Россия).

Сборка иммунной библиотеки VHH-фрагментов

Для приготовления библиотеки использовали кДНК, полученную в восьми независимых реакциях суммарно с 4 мкг мРНК. Амплификацию целевых последовательностей

VNH проводили с использованием высокоточной полимеразы Tersus («Евроген»; Россия) и праймеров AlpVNH3 uni fwd (CCACCATGTCTAGASAGTGCAGSTSGT RGAGTCTGKGGGAGG), AlpVNH-R1 (AATCCGGATCCGG GGGGTCTTCGCTGTGGTGCG) и AlpVNH-R2 (AATCCGG ATCCGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG) (последние два основаны на последовательностях, опубликованных в [21]) по программе 95 °C — 30 с, 61 °C — 30 с, 72 °C — 30 с (30 циклов). Фагмидную библиотеку получали при помощи клонирования амплифицированных последовательностей VNH в фагмиду pHEN2-XB с использованием эндонуклеаз XbaI и BamHI-HF, и T4 electro Ligase (NEB; США). Трансформации подвергали клетки штамма TG-1 при помощи электропоратора Genepulser (Bio-Rad; США). Селекцию проводили согласно опубликованному ранее протоколу [22] с использованием антигена, иммобилизованного на иммунологических пробирках.

Экспрессия и очистка биотинилированных вариантов кандидатных нанокантител

Последовательности VNH-фрагментов из препаратов фагмид, полученных из индивидуальных клонов после селекции, клонировали по сайтам XbaI и BamHI в экспрессионный вектор pET-BAD. Полученные конструкции трансформировали в клетки штамма BL21DE3-BirA, экспрессирующие биотинлигазу. Индивидуальные колонии использовали для получения растворимого белка в жидкой среде в соответствии с описанным ранее протоколом [23] с добавлением в среду для культивации 0,2 мМ D-биотина (Covachem; США). Растворимые нанокантитела выделяли из периплазмы путем лизиса осажженных бактерий в буфере, состоящем из 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100 и 10 мг/мл лизоцима с добавлением PMSF, трехкратной обработкой на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep-100 (Soniprep; США) с последующей очисткой на HIS Mag Sepharose Excel (Cytiva; США) и переводом в фосфатно-солевой буфер.

Иммуноферментный анализ

Оценку содержания секретируемого мегакариоцит-потенцирующего фактора (MPF) в культуральных жидкостях проводили при помощи Human Mesothelin Propeptide/MPF DuoSet (RND Systems; США) согласно протоколу производителя. Для измерения сывороточных антител образцы сыворотки добавляли в лунки планшета, покрытые мезотелином в концентрации 5 мкг/мл, затем обрабатывали поликлональными антиальпачьими антителами овцы, детекцию производили при помощи антиовечьих антител осла, меченых пероксидазой хрена (Santa Cruz; США). Оценку обогащения библиотек в ходе селекции производили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [22]. Лунки планшета обрабатывали препаратом мезотелина (5 мкг/мл), детекцию производили с использованием меченых пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological; Китай). При проведении прямого ИФА с нанокантителами планшет также покрывали мезотелином и обрабатывали нанокантителами в концентрации 1 мкг/мл. Детекцию проводили с использованием биотинилированных антител к эпитопу Мус («СайтСторЛаб»; Россия) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (R&D Systems; США), либо, для биотинилированных нанокантител, напрямую с HRP-конъюгированным стрептавидином.

Непрямой ИФА с нанокантителами проводили, сорбируя лунки планшета MesoVNH-1E3 в концентрации 5 мкг/мл и детектируя сигнал MesoVNH-2H5B в концентрации 1 мкг/мл с последующей обработкой HRP-конъюгированным стрептавидином. В качестве субстрата для детекции использовали готовый раствор тетраметилбензидина (Sigma Aldrich; США), колориметрические измерения проводили при помощи микропланшетного сканера Triad (Dynex; США).

Биослойная интерферометрия

Для определения Kd нанокантител использовали очищенные препараты MesoVNH-1E3B и MesoVNH-2H5B и препарат мезотелина. Определение проводили при помощи биосенсоров Streptavidin (SA) и прибора BLItz (ForteBio; США).

Мечение клеточных культур нанокантителами и проточная цитометрия

Адгерентные клетки открепляли раствором TrypLE (Thermo; США), после чего фиксировали 3,7%-м раствором параформальдегида. Суспензии клеток в фосфатно-солевом буфере инкубировали с добавлением нанокантител в концентрации 5 мкг/мл в течение часа (кроме контрольных образцов), после чего отмывали и обрабатывали раствором Streptavidin-FITC (MyBioSource; США) в течение 40 мин. Затем удаляли несвязавшийся реагент и измеряли флуоресцентный сигнал при помощи проточного цитометра FACS Vantage SE (Beckton Dickinson; США). Для обработки результатов использовали Flowing Software (Perttu Terho; Финляндия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета статистических программ Prism 8 (GraphPad Software; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунизацию и последующее получение нанокантител к мезотелину проводили на животном виде *Vicugna pacos*. Рекombинантный мезотелин, использованный для иммунизации, содержал полноразмерные регионы II и III, т. е. основные иммуногены при получении антител к этому белку. В ходе иммунизации и последующего бустирования контролировали развитие иммунного ответа. Рост уровней сывороточных антител к мезотелину между бустированиями № 2 и № 3 замедлился (рис. 1А), поэтому забор материала для приготовления иммунных библиотек был проведен на 5-й день после бустирования № 3. Мононуклеарная фракция клеток крови животного была разделена на две равные части и использована для приготовления двух иммунных фаговых библиотек. Для приготовления первой библиотеки использовали тотальную РНК, выделенную из мононуклеаров, вторая же библиотека была приготовлена из тотальной РНК, выделенной из клеток, прошедших предварительную позитивную иммуномагнитную сепарацию на микросферах, покрытых биотинилированным мезотелином. Такая предселекция была применена для удаления из клеточной популяции В-лимфоцитов, секретирующих нерелевантные антитела. Обе фаговые библиотеки подвергли трем раундам селекции на иммобилизованном антигене

с контролем обогащения между раундами. Пред-селектированную библиотеку характеризовали большое исходное присутствие MSLN-реактивных клонов и более интенсивное обогащение целевыми последовательностями уже после одного раунда селекции (рис. 1Б). По окончании отбора был проведен скрининг 48 случайно отобранных клонов из каждой библиотеки методом ИФА, и варианты, характеризовавшиеся максимальными уровнями сигнала на MSLN (рис. 1В), были отсекарованы.

Результаты секвенирования показали, что все отобранные клоны содержат два вида последовательностей VHH-фрагментов, названные MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5.

Оба отобранных варианта последовательностей были клонированы в экспрессионный вектор pET-BAD для экспрессии в растворимом виде слитно с сигнальным доменом для биотинилирования биотинлигазой BirA. Очищенные при помощи аффинной хроматографии биотинилированные MesoVHH-1E3B и MesoVHH-2H5B были протестированы методом ИФА, что подтвердило сохранение их способности связываться с мезотелином. Был также поставлен непрямой ИФА с использованием MesoVHH-1E3 в качестве захватывающего, а MesoVHH-2H5B в качестве детектирующего антител, таким методом удалось детектировать присутствие образцов мезотелина. Затем препараты VHH-фрагментов были использованы для определения их константы диссоциации методом биопленочной интерферометрии. Для MesoVHH-1E3B Kd составила около 140 нмоль, а для MesoVHH-2H5B — около 95 нмоль.

Уровни экспрессии мезотелина были оценены методом ПЦР-РВ на панели клеточных линий ТНPMЖ для определения культур MSLN⁺ и MSLN⁻. Данные ПЦР-РВ нормализованы относительно клеточной линии MDA-MB-231, для которой характерна невысокая экспрессия мезотелина. Результаты свидетельствуют, что для большей части протестированных линий ТНPMЖ

характерны незначительные уровни транскрипта мезотелина (рис. 2). Две клеточные линии HCC70 и HCC1806 продемонстрировали умеренную и высокую гиперэкспрессию MSLN и были выбраны в качестве модельных для тестирования связывания отобранных анти-MSLN VHH-фрагментов. Клеточные линии HCC1187, Hs 578T и MDA-MB-453, напротив, имели значительно (>10 раз) сниженный уровень MSLN и были выбраны в качестве отрицательного контроля. Уровни внутриклеточного транскрипта не всегда коррелируют с фактическим количеством белка на поверхности клетки, поэтому результаты ПЦР-РВ были дополнительно верифицированы при помощи ИФА на секретируемый фрагмент белка-предшественника мезотелина, MPF. Наличие MPF в культуральных жидкостях после 6 дней инкубации было зарегистрировано только для HCC70 и HCC1806 (рис. 2Б), причем зарегистрированные уровни MPF хорошо соотносились с данными ПЦР-РВ по экспрессии мезотелина.

Очищенные препараты MesoVHH-1E3B и MesoVHH-2H5B были использованы для мечения клеток отобранных культур и их последующего анализа на проточном цитометре. Использование обоих VHH-фрагментов привело к интенсивному окрашиванию большей части (%) клеточных популяций HCC1806 и HCC70 (рис. 3), при этом окрашивание HCC70 был заметно менее интенсивным. Для культур MDA-MB-453, HCC1187 и Hs 578T, выступавших в качестве отрицательного контроля для проверки неспецифического связывания наноантител, ни в одном случае не было зафиксировано значимых отклонений в гистограммах по сравнению с парными образцами, не обработанными VHH-фрагментами. Полученные результаты согласуются с данными ПЦР-РВ по уровням экспрессии мезотелина на использованных для тестирования VHH-фрагментов линиях ТНPMЖ, что свидетельствует об их высокой специфичности связывания наноантител с мишенью.

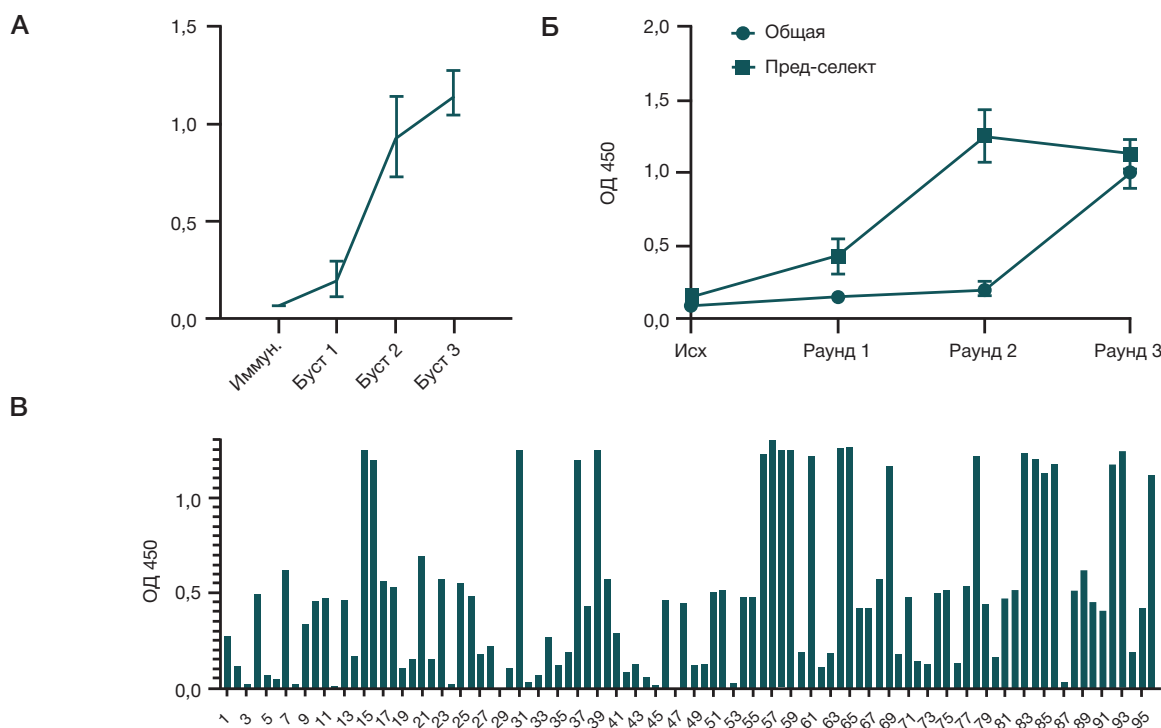


Рис. 1. Селекция наноантител. **А.** Уровни сывороточных антител к мезотелину в крови иммунизированного животного на момент проведения каждого раунда иммунизации. **Б.** Динамика обогащения иммунных фаговых библиотек наноантителами, специфично распознающими мезотелин, после каждого раунда селекции. **В.** Результаты скрининга 96 случайно отобранных клонов (прямая ИФА на мезотелин). 1–48 — клоны из общей библиотеки, 49–96 — клоны из предселектированной библиотеки

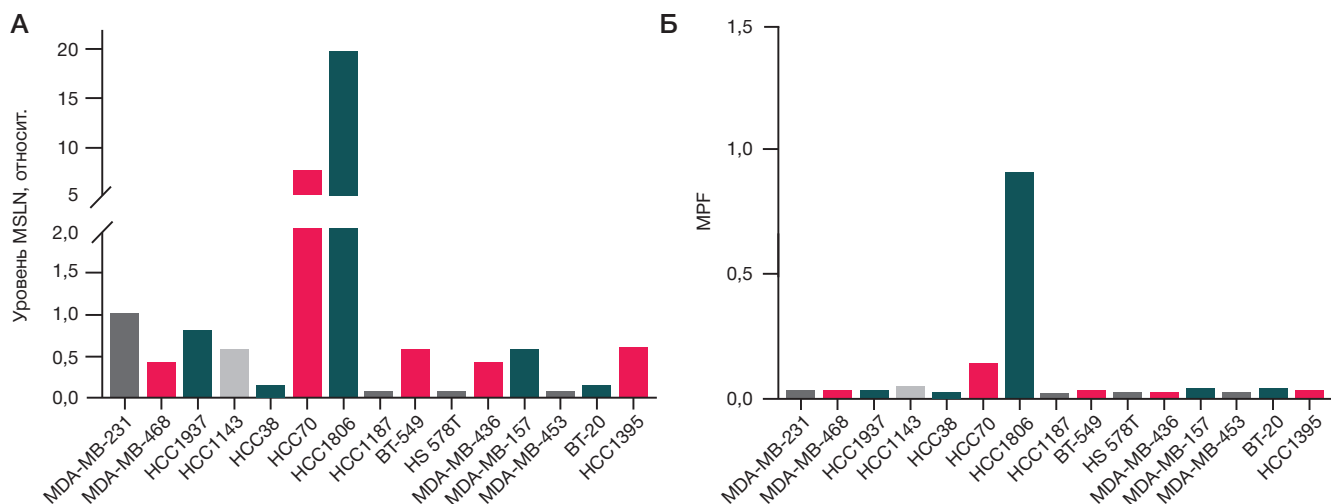


Рис. 2. Определение уровней мезотелина. **А.** Относительные уровни экспрессии MSLN в клеточных культурах THPMЖ, согласно данным ПЦР-РВ. **Б.** Уровни MPF в культуральных средах клеток THPMЖ. Приведены медианные значения и стандартные отклонения между биологическими повторностями

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования были успешно идентифицированы специфичные однодоменные антитела к мезотелину. Для приготовления иммунных библиотек применена предселекция иммунных клеток, упрощенно адаптированная согласно данным [24]. В отличие от описанного ранее метода, мы не проводили негативную иммуномагнитную сепарацию для выделения фракции В-лимфоцитов из периферических мононуклеаров, из-за отсутствия коммерчески доступных наборов для выделения В-клеток альпак. Не проводили и проточную сортировку индивидуальных В-клеток, меченых флуоресцентно-конъюгированным антигеном. Вместо этого мы использовали позитивную иммуномагнитную селекцию для выделения В-клеток, которые имеют на своей поверхности целевые В-клеточные рецепторы, при помощи биотинилированного мезотелина. Такой подход позволил более чем в 100 раз сократить количество исходного материала и получить фаговую библиотеку меньшего размера, лишенную нерелевантных вариантов фрагментов антител. Оба идентифицированных анти-MSLN-наноантитела были более представлены в предселектированной библиотеке и обнаруживались при скрининге индивидуальных клонов уже после первого раунда селекции. Можно утверждать, что использование упрощенной

предселекции позволяет минимум втрое сократить время, необходимое для отбора кандидатных клонов, по сравнению с традиционной процедурой селекции. При этом увеличение относительной представленности в исходной библиотеке клонов, обладающих сродством к мишени, может предотвратить потерю редких последовательностей, обладающих уникальными свойствами.

На данный момент уже известны несколько вариантов VHH-антител к мезотелину [17, 18]. Эти наноантитела показывают хорошие результаты как в качестве иммунодиагностических инструментов, так и в виде нацеливающих молекул для терапии наночастицами, и в составе биспецифических терапевтических агентов. Идентифицированные в ходе данной работы наноантитела несколько уступают по аффинности уже известным, однако этот параметр не является определяющим при использовании VHH-фрагмента в составе химерного рецептора. Успешное тестирование MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5B в качестве захватывающего и детектирующего антитела в сэндвич-ИФА указывает на то, что эти два наноантитела распознают различные эпитопы в составе мезотелина и не имеют препятствий для одновременного связывания с мишенью.

ХАР к мезотелину активно тестируют для терапии многих солидных опухолей [3], в последнее время

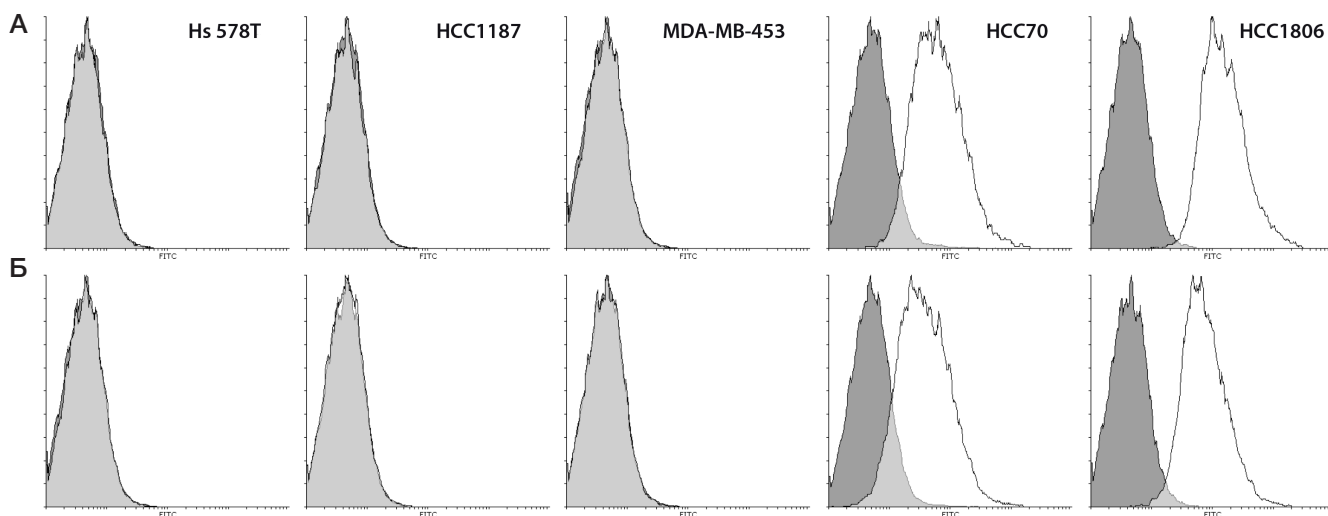


Рис. 3. Тестирование наноантител на культурах THPMЖ. Результаты измерения на проточном цитометре модельных клеточных культур THPMЖ, меченых MesoVHH-2H5B (**А**) и MesoVHH-1E3B (**Б**). Окрашивание проводили при помощи Streptavidin-FITC

появились работы и о MSLN-опосредованной терапии ТНПМЖ [10]. Для тестирования таких терапевтических подходов *ex vivo* и *in vivo* необходима удобная клеточная модель MSLN⁺ ТНПМЖ, однако имевшиеся данные свидетельствовали, что, несмотря на широкую долю MSLN⁺ первичных культур ТНПМЖ, перевиваемые линии этого субтипа в основном MSLN⁻ [8]. Проведенное нами определение уровней MSLN на широкой панели клеточных линий ТНПМЖ позволило выделить две клеточные линии, подходящие на роль модельных, а также три линии с глубоко супрессированным MSLN, причем для MSLN⁺-линий данные ПЦР-РВ хорошо согласовывались с результатами ИФА клеточных супернатантов на секретируемый фрагмент белка-предшественника мезотелина, MPF. Примечательно, что обе MSLN⁺-клеточные линии обладают хорошей прививаемостью у иммунодефицитных мышей BalbC/nude [25, 26] при ортотопическом введении, что позволяет использовать эту модель для экспериментов *in vivo*.

Тестирование отобранных вариантов наноантител к мезотелину на клеточной модели MSLN⁺ ТНПМЖ продемонстрировало их способность распознавать этот опухолевый антиген в нативных условиях, а низкий уровень фонового сигнала при окрашивании наноантителами MSLN⁺-клеточных линий свидетельствует о высокой специфичности распознавания мишени. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5 могут быть использованы для создания компактных и функционально активных антигенных рецепторов к мезотелину.

ВЫВОДЫ

При помощи модифицированного метода быстрой предселекции клеточного материала иммунизированного животного были идентифицированы два варианта наноантител, способные специфично связывать мезотелин. Активность антител была продемонстрирована в экспериментах *in vitro*, и показано, что VHH-фрагменты распознают различные неперекрывающиеся эпитопы в составе MSLN и могут быть использованы в сэндвич-ИФА. При помощи биослойной интерферометрии определены Kd MesoVHH-1E3B и MesoVHH-2H5B, которые составили около 140 и 95 нмоль. Панель клеточных линий ТНПМЖ была протестирована для поиска кандидатных клеточных моделей MSLN⁺ ТНПМЖ, были определены две клеточные линии HCC1806 и HCC70, характеризующиеся высокой и умеренной гиперэкспрессией мезотелина, а также три клеточные линии HCC1187, Hs 578T и MDA-MB-453, в которых мезотелин супрессирован. Отобранные наноантитела к мезотелину оказались способными специфично окрашивать нативный мезотелин на поверхности клеток линий HCC1806 и HCC70, при этом продемонстрировав низкие уровни неспецифического связывания на MSLN⁻-клеточных линиях РМЖ. Полученные результаты указывают на то, что отобранные наноантитела MesoVHH-1E3 и MesoVHH-2H5 могут быть использованы как для молекулярной идентификации опухолей, так и для создания компактных и функционально активных антигенных рецепторов к мезотелину.

Литература

- Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res.* 2014; 74 (11): 2907–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0337. PubMed PMID: 24824231.
- Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, et al. Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. *Br J Cancer.* 2012; 107 (1): 137–42. DOI: 10.1038/bjc.2012.235. PubMed PMID: 22644300.
- Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11 (3): 517–25. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0454. PubMed PMID: 22351743.
- Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem.* 2004; 279 (10): 9190–8. DOI: 10.1074/jbc.M312372200. PubMed PMID: 14676194.
- Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. *Mol Cancer.* 2011; 10: 106. DOI: 10.1186/1476-4598-10-106. PubMed PMID: 21880146.
- Li M, Bharadwaj U, Zhang R, Zhang S, Mu H, Fisher WE, et al. Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7 (2): 286–96. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0483. PubMed PMID: 18281514.
- Cheng WF, Huang CY, Chang MC, Hu YH, Chiang YC, Chen YL, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 2009; 100 (7): 1144–53. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604964. PubMed PMID: 19293794.
- Wang M, Li A, Sun G, Mbuagbaw L, Reid S, Lovrics PJ, et al. Association between mesothelin expression and survival outcomes in patients with triple-negative breast cancer: a protocol for a systematic review. *Syst Rev.* 2016; 5 (1): 133. DOI: 10.1186/s13643-016-0313-6. PubMed PMID: 27514374.
- Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sorlie T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 1787. DOI: 10.1038/s41467-020-15574-5. PubMed PMID: 32286297.
- Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133 (2): 799–804. DOI: 10.1007/s10549-012-2018-4. PubMed PMID: 22418702.
- Lanitis E, Poussin M, Hagemann IS, Coukos G, Sandaltzopoulos R, Scholler N, et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Mol Ther.* 2012; 20(3): 633–43. DOI: 10.1038/mt.2011.256. PubMed PMID: 22127019.
- Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, Okada N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 527 (2): 350–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.071. PubMed PMID: 32216966.
- Maus MV, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Riviere I, Merghoub T, et al. An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Mol Ther Oncolytics.* 2016; 3: 1–9. DOI: 10.1038/mt.2016.23. PubMed PMID: 29675462.
- Tillib SV. Prospective Applications of Single-Domain Antibodies in Biomedicine. *Mol Biol (Mosk).* 2020; 54 (3): 362–73. Epub 2020/06/04. DOI: 10.31857/S0026898420030167. PubMed PMID: 32492000.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993; 363 (6428): 446–8. DOI: 10.1038/363446a0. PubMed PMID: 8502296.

16. Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol*. 2018; 96: 37–47. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.02.012. PubMed PMID: 29477934.
17. Prantner AM, Turini M, Kerfelec B, Joshi S, Baty D, Chames P, et al. Anti-Mesothelin Nanobodies for Both Conventional and Nanoparticle-Based Biomedical Applications. *J Biomed Nanotechnol*. 2015; 11 (7): 1201–12. DOI: 10.1166/jbn.2015.2063. PubMed PMID: 26307843.
18. Prantner AM, Yin C, Kamat K, Sharma K, Lowenthal AC, Madrid PB, et al. Molecular Imaging of Mesothelin-Expressing Ovarian Cancer with a Human and Mouse Cross-Reactive Nanobody. *Mol Pharm*. 2018; 15 (4): 1403–11. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00789. PubMed PMID: 29462558.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. PubMed PMID: 11328886.
20. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
21. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*. 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii] 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
22. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol*. 2002; 10 (10): 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
24. Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med*. 2020; 26 (9): 1422–7. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x. PubMed PMID: 32651581.
25. Liu R, Zhi X, Zhou Z, Zhang H, Yang R, Zou T, et al. Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Kruppel-like factor 5 transcription by Sp1. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 1138. DOI: 10.1038/s41598-018-19489-6. PubMed PMID: 29348684.
26. Simon N, Antignani A, Sarnovsky R, Hewitt SM, FitzGerald D. Targeting a Cancer-Specific Epitope of the Epidermal Growth Factor Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108 (8). DOI: 10.1093/jnci/djw028. PubMed PMID: 27075852.

References

1. Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res*. 2014; 74 (11): 2907–12. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0337. PubMed PMID: 24824231.
2. Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, et al. Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. *Br J Cancer*. 2012; 107 (1): 137–42. DOI: 10.1038/bjc.2012.235. PubMed PMID: 22644300.
3. Kelly RJ, Sharon E, Pastan I, Hassan R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11 (3): 517–25. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0454. PubMed PMID: 22351743.
4. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*. 2004; 279 (10): 9190–8. DOI: 10.1074/jbc.M312372200. PubMed PMID: 14676194.
5. Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/P13K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. *Mol Cancer*. 2011; 10: 106. DOI: 10.1186/1476-4598-10-106. PubMed PMID: 21880146.
6. Li M, Bharadwaj U, Zhang R, Zhang S, Mu H, Fisher WE, et al. Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7 (2): 286–96. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0483. PubMed PMID: 18281514.
7. Cheng WF, Huang CY, Chang MC, Hu YH, Chiang YC, Chen YL, et al. High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*. 2009; 100 (7): 1144–53. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604964. PubMed PMID: 19293794.
8. Wang M, Li A, Sun G, Mbuagbaw L, Reid S, Lovrics PJ, et al. Association between mesothelin expression and survival outcomes in patients with triple-negative breast cancer: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*. 2016; 5 (1): 133. DOI: 10.1186/s13643-016-0313-6. PubMed PMID: 27514374.
9. Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sorlie T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 1787. DOI: 10.1038/s41467-020-15574-5. PubMed PMID: 32286297.
10. Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133 (2): 799–804. DOI: 10.1007/s10549-012-2018-4. PubMed PMID: 22418702.
11. Lanitis E, Poussin M, Hagemann IS, Coukos G, Sandaltzopoulos R, Scholler N, et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Mol Ther*. 2012; 20(3): 633–43. DOI: 10.1038/mt.2011.256. PubMed PMID: 22127019.
12. Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, Okada N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020; 527 (2): 350–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.071. PubMed PMID: 32216966.
13. Maus MV, Plotkin J, Jakka G, Stewart-Jones G, Riviere I, Merghoub T, et al. An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Mol Ther Oncolytics*. 2016; 3: 1–9. DOI: 10.1038/mt.2016.23. PubMed PMID: 29675462.
14. Tilib SV. Prospective Applications of Single-Domain Antibodies in Biomedicine. *Mol Biol (Mosk)*. 2020; 54 (3): 362–73. Epub 2020/06/04. DOI: 10.31857/S0026898420030167. PubMed PMID: 32492000.
15. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363 (6428): 446–8. DOI: 10.1038/363446a0. PubMed PMID: 8502296.
16. Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Mol Immunol*. 2018; 96: 37–47. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.02.012. PubMed PMID: 29477934.
17. Prantner AM, Turini M, Kerfelec B, Joshi S, Baty D, Chames P, et al. Anti-Mesothelin Nanobodies for Both Conventional and Nanoparticle-Based Biomedical Applications. *J Biomed Nanotechnol*. 2015; 11 (7): 1201–12. DOI: 10.1166/jbn.2015.2063. PubMed PMID: 26307843.
18. Prantner AM, Yin C, Kamat K, Sharma K, Lowenthal AC, Madrid PB, et al. Molecular Imaging of Mesothelin-Expressing Ovarian Cancer with a Human and Mouse Cross-Reactive Nanobody. *Mol Pharm*. 2018; 15 (4): 1403–11. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00789. PubMed PMID: 29462558.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (9): e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. PubMed PMID: 11328886.
20. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.

- 2010; 62 (1): 73–82. DOI: 10.1007/s10616-010-9259-z. PubMed PMID: 20309632.
21. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*. 2007; 324 (1–2): 13–25. Epub 2007/06/15. DOI: S0022-1759(07)00119-6 [pii] 10.1016/j.jim.2007.04.008. PubMed PMID: 17568607.
 22. Benhar I, Reiter Y. Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr Protoc Immunol*. 2002; 10 (10): 9B. DOI: 10.1002/0471142735.im1019bs48. PubMed PMID: 18432867.
 23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*. 2005; 41 (1): 207–34. PubMed PMID: 15915565.
 24. Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med*. 2020; 26 (9): 1422–7. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x. PubMed PMID: 32651581.
 25. Liu R, Zhi X, Zhou Z, Zhang H, Yang R, Zou T, et al. Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Kruppel-like factor 5 transcription by Sp1. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 1138. DOI: 10.1038/s41598-018-19489-6. PubMed PMID: 29348684.
 26. Simon N, Antignani A, Sarnovsky R, Hewitt SM, FitzGerald D. Targeting a Cancer-Specific Epitope of the Epidermal Growth Factor Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016; 108 (8). DOI: 10.1093/jnci/djw028. PubMed PMID: 27075852.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NANOG В КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ГРУПП

Г. Ю. Кудрявцев^{1,3}, Л. В. Кудрявцева¹, Л. М. Михалева², Я. Ю. Кудрявцева¹, Н. А. Соловьева¹, В. А. Осипов³, И. И. Бабиченко¹¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия² Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия³ Госпиталь для ветеранов войн № 2, Москва, Россия

Рак предстательной железы — наиболее часто выявляемое онкологическое заболевание среди мужчин, этому во многом способствуют распространение скрининговых исследований и высокая частота биопсий органа. Верификация опухолей с потенциально более неблагоприятным прогнозом течения является первостепенной задачей при лечении рака предстательной железы. Целью исследования было определить клинико-морфологические ассоциации и прогностическую значимость экспрессии белка Nanog при раке предстательной железы в различных прогностических группах. Работа выполнена на материале ткани предстательной железы, полученном после оперативного вмешательства, а также образцах ткани биопсии (всего 89 случаев). Было проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование с использованием антител к белкам Ki-67 и Nanog. Корреляционные связи между выраженностью экспрессии указанных маркеров и прогностической группой определяли с помощью коэффициента Спирмена, а связь с клинико-морфологическими проявлениями — с использованием критерия хи-квадрат (χ^2). Обнаружена статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженностью экспрессии Ki-67 и Nanog и порядковым номером прогностической группы ($r_s = 0,619$, $p < 0,001$ и $r_s = 0,786$, $p < 0,001$ соответственно). Удалось обнаружить связь между высокой степенью экспрессии Nanog и экстрапростатическим распространением опухоли ($p = 0,041$). Повышенная экспрессия белка Nanog в клетках рака предстательной железы связана с более злокачественными формами аденокарциномы и свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

Ключевые слова: рак предстательной железы, аденокарцинома простаты, Ki-67, Nanog, индекс Глисона, прогностические группы

Вклад авторов: Г. Ю. Кудрявцев, Я. Ю. Кудрявцева, Н. А. Соловьева — обзор литературы, написание текста; Л. В. Кудрявцева, В. А. Осипов — статистическая обработка данных; Л. М. Михалева — сбор и обработка материалов; И. И. Бабиченко — концепция и дизайн исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено Комитетом по этике Медицинского института РУДН (протокол № 13 от 19 декабря 2019 г.), дизайн исследования соответствовал правилам Хельсинкской декларации об использовании тканей человека. От всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Георгий Юрьевич Кудрявцев
ул. Байкальская, д. 35, кв. 216, г. Москва, 107207; kgosha@mail.ru

Статья получена: 06.10.2020 **Статья принята к печати:** 20.10.2020 **Опубликована онлайн:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.067

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF NANOG PROTEIN IN PROSTATE CANCER CELLS OF DISTINCT GRADE GROUPS

Kudryavtsev GYu^{1,3}, Kudryavtseva LV¹, Mikhaleva LM², Kudryavtseva YaYu¹, Solovyeva NA¹, Osipov VA³, Babichenko II¹¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia² Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia³ Hospital for War Veterans № 2, Moscow, Russia

Prostate cancer is the most common type of cancer among men, which is mainly due to extensive use of screening tests and high total number of prostate biopsies. Verification of tumors with poorer prognosis is the primary goal of prostate cancer management. The study was aimed to determine the clinical and morphological associations and the prognostic value of the Nanog protein expression in prostate cancer of distinct Grade Groups. We used the prostate tissue specimens obtained during surgery, and the biopsy specimens, the total of 89 cases. Histological and immunohistochemical assessment was performed using antibodies to Ki-67 and Nanog. Correlations between the expression of markers and the Grade Groups were revealed using the Spearman's rank correlation coefficient, and the correlation with clinical and morphological characteristics was determined using the chi-squared test (χ^2). There was a positive correlation between the expression of Ki-67 and Nanog, and the Grade Group numerical order ($r_s = 0,619$, $p < 0,001$ and $r_s = 0,786$, $p < 0,001$ respectively). We managed to find the relationship between the high Nanog expression and the extraprostatic extension ($p = 0,041$). High expression of Nanog protein in the prostate cancer cells was associated with a higher-grade adenocarcinoma and indicated a poor prognosis.

Keywords: prostate cancer, prostate adenocarcinoma, Ki-67, Nanog, Gleason index, Grade Groups

Author contribution: Kudryavtsev GYu, Kudryavtseva YaYu, Solovyeva NA — literature survey, manuscript writing; Kudryavtseva LV, Osipov VA — statistical data processing; Mikhaleva LM — sample collection and processing; Babichenko II — study concept and design.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Medical Institute of the Peoples' Friendship University of Russia (protocol № 13 dated December 19, 2019); the study design was consistent with the Declaration of Helsinki guidelines regarding the research involving identifiable human tissue samples. The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Georgy Yu. Kudryavtsev
Baikalskaya, 35, apt. 216, Moscow, 107207; kgosha@mail.ru

Received: 06.10.2020 **Accepted:** 20.10.2020 **Published online:** 30.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.067

По данным статистики, в 2018 г. в России было выявлено 42 518 новых случаев заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ), среди мужского населения более значимую цифру продемонстрировали только

злокачественные новообразования трахеи, бронхов и легочной ткани [1].

РПЖ является одной из самых частых опухолей, встречающихся у мужчин во всем мире, его частота в

развитых странах превышает 200 случаев на 100 000 мужчин. Хотя клиническое течение опухоли варьирует от медленно растущих локальных форм до высоко агрессивных наблюдений с быстрым метастазированием, РПЖ является одной из основных причин заболеваемости и смертности среди мужчин [2, 3].

Один из наиболее высоких показателей заболеваемости РПЖ зарегистрирован в США. У одного из шести американских мужчин в течение жизни развивается рак предстательной железы, в то же время среди таких пациентов только один умирает непосредственно от РПЖ или его осложнений, в остальных случаях опухоль, как правило, клинически не проявляется [4]. Эти данные подтверждают результаты вскрытия, в которых рак простаты посмертно диагностирован у одной трети пациентов в возрасте 50–60 лет и в 60% наблюдений умерших в возрасте старше 80 лет [5].

До момента внедрения в широкую практику исследования концентрации простатспецифического антигена (ПСА) РПЖ часто диагностировали после того, как у пациентов проявлялись симптомы местнораспространенного или метастатического процесса, а общая пятилетняя выживаемость составляла 70% [6]. Распространение скрининга ПСА привело к резкому увеличению выявления рака простаты, включая, главным образом, локализованный рак. Тем не менее данный метод не обладает высокой специфичностью и зачастую способствует увеличению числа инвазивных процедур при лечении клинически незначимых видов рака [7]. Этим обусловлена необходимость дальнейшего поиска биологических маркеров для уточнения модели прогрессирования различных форм РПЖ с целью выбора наиболее адекватной лечебной тактики.

Одним из перспективных направлений решения данной проблемы является углубленное изучение основных механизмов гистогенеза наиболее частой формы РПЖ — аденокарциномы.

На современном этапе стохастическая модель канцерогенеза, предполагающая, что каждая опухолевая клетка по отдельности обладает способностью к амплификации и способна давать начало новому опухолевому пулу, постепенно отходит на второй план [8]. На смену ей приходит иерархический подход к прогрессированию опухоли. Такой подход предполагает модель, в которой опухоль состоит из полиморфных по своей пролиферативной активности и потенциалу дифференцировки атипичных клеток. Указанная теория подразумевает наличие стволовых опухолевых клеток, которые, аналогично нормальным стволовым клеткам, обладают способностью к многократному делению, в том числе асимметричному, и, соответственно, обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки в пределах опухолевой ткани. Считается, что именно стволовые опухолевые клетки потенцируют рост опухоли [9].

Ранние наблюдения (1960-е гг.), основанные на изучении гемобластозов, доказали гетерогенность клеток в массе опухоли, предполагая существование незрелой популяции клеток. Первое доказательство, подтверждающее гипотезу о существовании раковых стволовых клеток (РСК) и основанное на исследовании острого миелолейкоза, было получено в 1990-х гг. [10]. Более поздние исследования показали наличие РСК и в других типах опухолей, в частности при РПЖ.

Механизмы сохранения РСК мультипотентного потенциала к дифференцировке изучены недостаточно,

однако одна из главных ролей может принадлежать регуляторным белкам, отвечающим за аналогичные свойства эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).

Белок Nanog представляет собой транскрипционный фактор, который участвует в самообновлении стволовых клеток. Впервые он был обнаружен в эмбриональных стволовых клетках мыши и описан как важный регулятор транскрипции, который отвечает за механизмы клеточной дифференцировки [11, 12].

Указанный белок, кодируемый геном *NANOG1*, состоит из 305 аминокислот и содержит три функциональных домена: N-концевой домен, C-концевой домен и консервативный гомеодоменный мотив, необходимый для связывания с промоторной областью целевых участков ДНК и регуляции транскрипции [13].

Вместе с другими транскрипционными факторами, наиболее консервативными из которых являются SOX2 и OCT4, Nanog играет главную роль в поддержании свойств ЭСК [14]. Эти три ключевых фактора обычно функционируют совместно через формирование транскрипционной сети, контролируя экспрессию набора связанных с плюрипотентностью ЭСК генов. Nanog высоко экспрессируется в плюрипотентных стволовых клетках, а также в клетках эмбриональных карцином, и снижение его экспрессии происходит при созревании клеток [11]. Сверхэкспрессия белка Nanog не только поддерживает плюрипотентность ЭСК в мышечных моделях в отсутствие такого сильного внешнего фактора, как лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), но также способствует росту ЭСК человека на искусственных средах в условиях отсутствия фидера — функциональной основы, представленной первичными эмбриональными фибробластами [15]. Таким образом, уровень белка Nanog определяет судьбу плюрипотентных клеток в физиологических условиях.

Идентификация в массиве опухолевой ткани клеток, проявляющих признаки и маркеры стволовости, могла бы помочь в прогнозировании клинически неблагоприятного течения РПЖ.

Целью исследования было определить прогностическую значимость экспрессии белка Nanog в клетках аденокарциномы предстательной железы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с сентября 2017 г. по май 2019 г. на базе двух стационаров (Городская клиническая больница № 31 и Госпиталь для ветеранов войн № 2) был отобран материал, полученный от 89 пациентов урологического профиля в ходе хирургического лечения, а также в результате диагностических манипуляций, связанных с заболеваниями предстательной железы.

Средний возраст пациентов на момент взятия образцов ткани железы составлял 69,3 года (от 47 до 89 лет). Критерий включения: пациенты с морфологически верифицированным РПЖ, не получавшие неoadъювантную терапию. Критерии исключения: отсутствие данных клинико-инструментальных обследований (показатели ПСА, распространение опухоли), а также наблюдения с объемом материала, недостаточным для проведения иммуногистохимического анализа и последующей интерпретации результата. Оперативное вмешательство было проведено в 48 случаях (трансуретральная резекция в 23, радикальная простатэктомия — в 25 наблюдениях), диагностическая трансректальная мультифокальная

биопсия была взята у 41 пациента. Морфологическая оценка РПЖ предполагала не только оценку степени злокачественности опухоли на основании системы градации Глисона, но также, согласно рекомендациям ВОЗ, была дополнена характеристикой прогностической группы в каждом наблюдении.

Иммуногистохимическое исследование материала проводили в соответствии со стандартным протоколом, в качестве первичных антител использовали кроличьи моноклональные антитела к белку Nanog (Clone EPR2027(2), Epitomics; США). Положительный контроль представлял собой образцы ткани семиномы яичка. Пролиферативную активность клеток оценивали при помощи моноклональных кроличьих антител к белку Ki-67 (Clone SP6, Cell Marque; США). В качестве положительного контроля использовали реакцию с лимфоидной тканью миндалин (клетки герминативных центров). ИГХ-реакцию проводили с использованием системы детекции QUANTO на Autostainer 360 (Thermo Fisher Scientific; США). Докрашивание срезов осуществляли гематоксилином Майера. Исследование препаратов проводили с помощью микроскопа Axioplan 2 imaging (Karl Zeiss; Германия) с фотофиксацией камерой AxioCam ERc 5s (Karl Zeiss; Германия).

Для количественной оценки пролиферативной активности осуществляли подсчет соотношения окрашенных ядер на 300 клеток при увеличении $\times 400$. Условно была принята следующая градация: отсутствие экспрессии (0 баллов), слабая экспрессия (1 балл) — окрашены менее 10% ядер клеток, умеренная экспрессия (2 балла) — более 10%, но менее 33% клеточных ядер, сильная экспрессия (3 балла) — более 33% ядер клеток в ткани были положительными.

Оценку экспрессии Nanog также осуществляли путем подсчета числа иммунопозитивных клеток при большом увеличении ($\times 400$, минимальное число клеток — 300), однако результат был скорректирован с учетом интенсивности окрашивания. Применяли шкалу с числом баллов от 0 до 3: 0 — отсутствие реакции, 1 — реакция слабая, 2 и 3 — реакция умеренная и сильная соответственно. Затем вычисляли иммуногистохимический индекс H-score (histochemical score) по следующей формуле:

$$H\text{-score} = \sum (P_i \times i),$$

где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; P_i — доля клеток, окрашенных с разной

интенсивностью, в %. Значение индекса колебалось от 0 до 300 баллов [16].

Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 10.0 (StatSoft; США) в среде Windows 10. Достоверность различия выборок с распределением, отличным от нормального, определяли с помощью U -критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционные взаимоотношения оценивали с помощью коэффициента Спирмена, для оценки силы связи коэффициентов корреляции использовали шкалу Чеддока. Для выявления связи между экспрессией исследуемых маркеров и клинико-морфологическими характеристиками пациентов использовали критерий хи-квадрат (χ^2) и точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После гистологического исследования РПЖ был диагностирован в 68 случаях, остальные наблюдения характеризовались наличием доброкачественной гиперплазии в сочетании с воспалительными изменениями различной степени выраженности. После морфологической оценки все наблюдения были разделены, согласно рекомендациям, на пять прогностических групп: к первой прогностической группе были отнесены 18 случаев (26,5%), ко второй — 16 случаев (23,6%), к третьей — 15 (22,1%). В четвертую и пятую прогностические группы попали 10 (14,7%) и 9 (13,2%) наблюдений соответственно. На основании клинико-морфологических данных определяли степень распространения опухолевого процесса: случаи случайно обнаруженной при обследовании опухоли, а также карциномы, ограниченной тканью органа, были отнесены к локализованным формам (T1 и T2 по классификации TNM AJCC, 8-е издание). Экстрапростатический рост расценивали как признак распространенной формы (T3 и T4). Пороговое значение концентрации ПСА в крови составляло 10 нг/мл.

Среди всех наблюдений экспрессия Ki-67 была обнаружена в 82 случаях (92,1%). В группе доброкачественной гиперплазии предстательной железы экспрессия Ki-67 была выявлена в 14 наблюдениях (66,7%), причем подавляющее большинство случаев характеризовалось слабым уровнем экспрессии. При сравнении экспрессии этого маркера в наблюдениях доброкачественного поражения предстательной железы и РПЖ были получены статистически значимые различия,

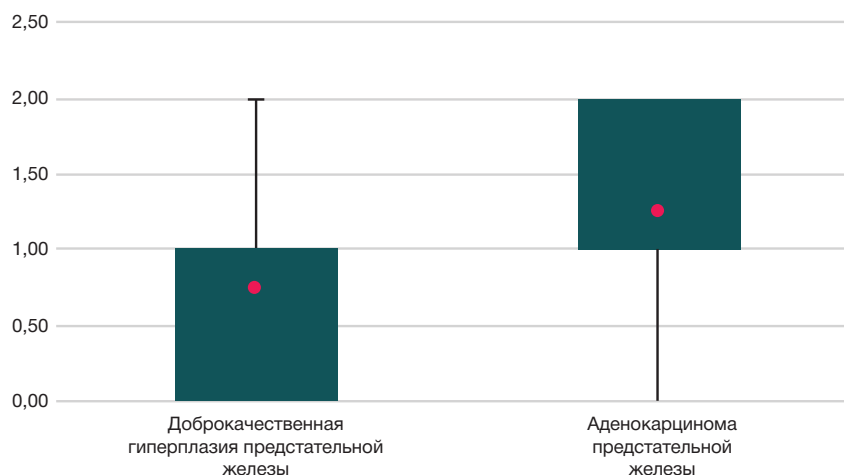


Рис. 1. Показатели экспрессии Ki-67 при доброкачественной гиперплазии и аденокарциноме предстательной железы

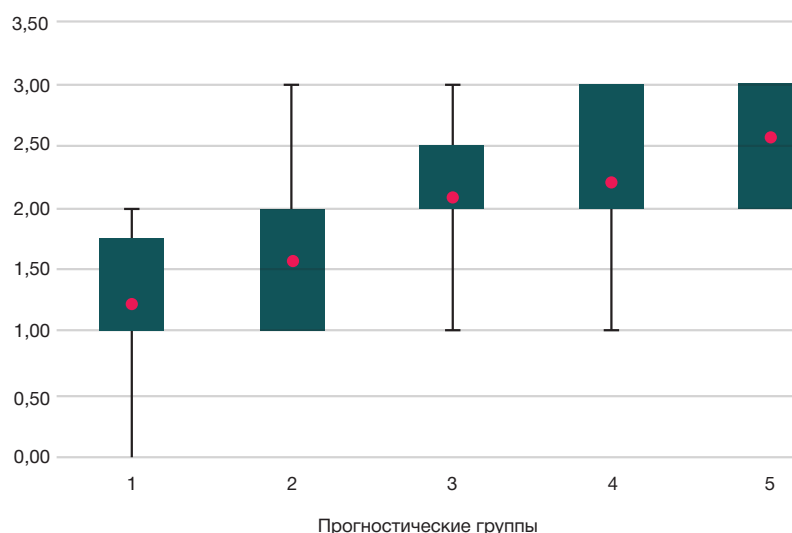


Рис. 2. Сравнительная характеристика показателей экспрессии Ki-67 в различных прогностических группах рака предстательной железы

причем в целом показатели пролиферативной активности в последнем случае оказались на порядок выше ($p < 0,001$) (рис. 1).

Сравнительный анализ показателей пролиферативной активности в различных прогностических группах продемонстрировал прогredientное увеличение средних значений уровня экспрессии Ki-67 с увеличением порядкового номера прогностической группы (рис. 2). Корреляционный анализ показал наличие сильной прямой связи между сравниваемыми параметрами ($r_s = 0,619$, $p < 0,001$).

Экспрессия Nanog

В нашем исследовании экспрессия Nanog отсутствовала во всех наблюдениях доброкачественной гиперплазии предстательной железы, в то время как среди 68 случаев РПЖ иммунопозитивными к данному белку оказались 26 наблюдений (38,2%). В прогностической группе 1 экспрессии Nanog выявлено не было, во 2-й прогностической группе позитивными оказались три наблюдения (18,75%), в 3-й — 6 (40%), в 4-й — 8 (80%), и, наконец, в 5-й — 9 из 9 наблюдений. Средние показатели экспрессии Nanog с учетом интенсивности окраски в различных прогностических группах представлены на рис. 3.

Сопоставление показателей иммуногистохимического индекса экспрессии Nanog в клетках аденокарциномы предстательной железы позволило выявить прямую связь с увеличением порядкового номера прогностической группы ($r_s = 0,786$, $p < 0,001$).

Характер экспрессии исследуемых маркеров в основных морфологических паттернах РПЖ по классификации Глисона представлен на рис. 4.

При сопоставлении клинко-морфологических особенностей с показателями экспрессии исследуемых маркеров (табл.) была обнаружена статистически значимая связь между уровнем экспрессии Ki-67 и наличием экстрапростатического распространения опухоли ($p = 0,046$), а также высоким уровнем ПСА в крови (> 10 нг/мл; $p < 0,001$). В то же время высокие значения иммуногистохимического индекса экспрессии Nanog были связаны с наличием распространенной формы рака ($p = 0,041$), однако статистически значимой связи между показателями реактивности к данному маркеру и концентрацией ПСА в крови выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение особенностей раковых стволовых клеток (РСК) позволило пересмотреть подходы к основополагающим принципам опухолевой организации и метаболизму.

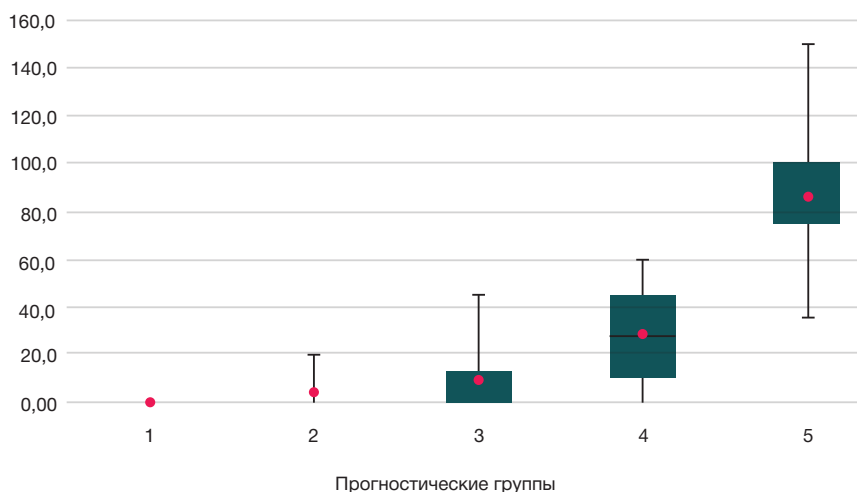


Рис. 3. Сравнительная характеристика показателей экспрессии Nanog в различных прогностических группах рака предстательной железы

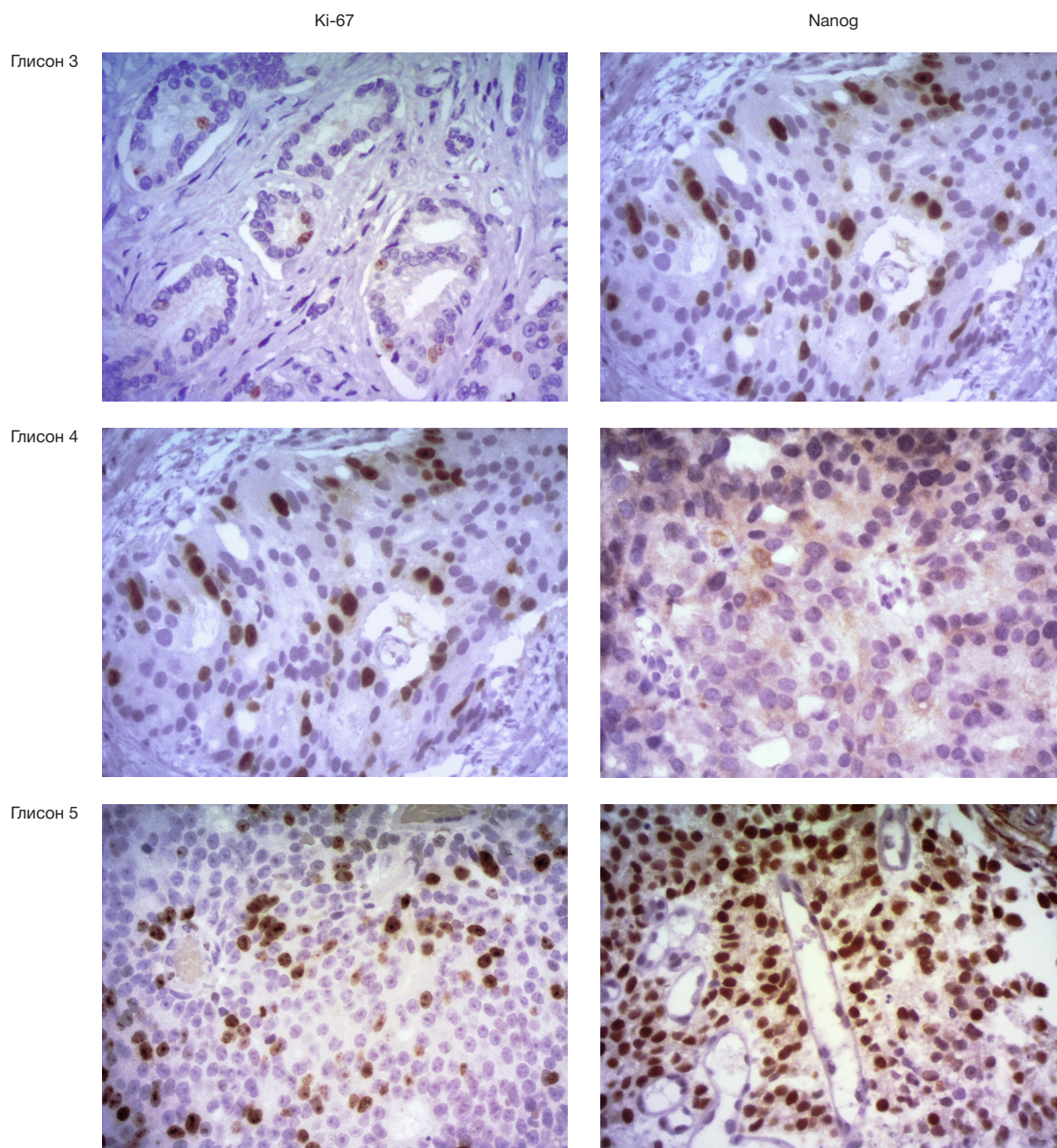


Рис. 4. Экспрессия Ki-67 и Nanog в клетках рака предстательной железы при основных морфологических паттернах по классификации Глисона (увеличение $\times 400$)

Клеточная гетерогенность опухолевой ткани обусловлена ее иерархической организацией, отчасти моделирующей физиологическую гистоархитектонику исходной ткани. Симметричное и асимметричное деление РСК приводит к поддержанию опухолевой популяции, с одной стороны, и к увеличению объема опухолевой ткани за счет потерявших свойства стволовости клеток — с другой [17].

Было показано, что уровень экспрессии Nanog выше в РСК, чем в остальной популяции опухолевых клеток при некоторых типах онкологии [18, 19].

Функциональные исследования продемонстрировали, что Nanog является не только маркером РСК, но также способствует развитию РСК-подобных характеристик при некоторых видах рака. Например, активация эмбрионального гена *NANOG* заставляет субпопуляцию клеток колоректального рака принимать стволовой фенотип [20].

Экспрессия Nanog была обнаружена в различных опухолях, включая рак молочной железы, шейки матки,

полости рта, почек, простаты, легких, желудка, мозга и яичников [21]. Выраженная экспрессия Nanog — показатель плохого прогноза для пациентов с серозной карциномой яичников, колоректальным раком и раком молочной железы. В плоскоклеточной карциноме полости рта и аденокарциноме легких более высокая экспрессия Nanog вместе с Oct4 связана с поздней стадией рака и более низкими показателями выживаемости [22, 23].

В раковых клетках aberrantная экспрессия Nanog была связана с повышенной скоростью пролиферации *in vitro* и ростом опухоли *in vivo*. Было показано, что сверхэкспрессия Nanog, наряду с Oct4, увеличивает клоногенный рост и образование сфероидных тел клеток аденокарциномы легких [24], и, наоборот, нокдаун Nanog в клетках рака молочной железы подавляет клоногенный рост и пролиферацию [25]. При нокдауне Nanog несколько генов, связанных с клеточным циклом (таких как циклины D1, D2, D3 и E1, а также циклин-зависимые киназы 1 и 6), а также связанный с p53 сигнальный путь (например, Bcl6

Таблица. Связь экспрессии Ki-67 и Nanog с основными клинико-морфологическими характеристиками

Клинико-морфологические характеристики	Число случаев, N (%), всего 68	Экспрессия Ki-67				Экспрессия Nanog (иммуногистохимический индекс)		
		1 балл	2 балла	3 балла	Значение <i>p</i>	Слабая (<40)	Сильная (>40)	Значение <i>p</i>
Распространенность опухоли								
Локализованная форма (T1, T2)	39 (57,4%)	19 (27,9%)	17 (25%)	5 (7,4%)	0,046	8 (11,8%)	2 (2,9%)	0,041
Распространенная форма (T3, T4)	29 (42,6%)	6 (8,8%)	11 (16,2%)	9 (13,2%)		5 (7,4%)	11 (16,2%)	
Показатель ПСА в крови								
<10 нг/мл	51 (75%)	23 (33,8%)	21 (30,9%)	4 (5,9%)	<0,001	9 (13,2%)	5 (7,4%)	0,238
>10 нг/мл	17 (25%)	2 (2,9%)	7 (10,3%)	10 (14,7%)		4 (5,9%)	8 (11,8%)	

и Atf3) были подавлены, что может говорить об участии Nanog в клеточном цикле [25, 26].

Настоящее исследование позволило выявить экспрессию белка Nanog в клетках РПЖ, причем данный белок отсутствовал как в нормальных тканях предстательной железы, так и в наблюдениях доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Гетерогенность выраженности экспрессии белка Nanog говорит о том, что различные варианты аденокарциномы, отличающиеся в первую очередь по степени клеточной анаплазии, имеют различный гистохимический профиль. Принимая во внимание, что этот транскрипционный белок присущ в основном эмбриональным клеткам, обнаружение его в клетках опухолевого массива говорит в пользу теории существования особого пула клеток с признаками «стволового» фенотипа. При сравнении различных прогностических групп было обнаружено, что с возрастанием степени клеточной анаплазии частота и степень выраженности экспрессии Nanog увеличивается, что находит свое отражение в оценке опухоли по классификации Глисона и в дальнейшем влияет на выбор прогностической группы. Такая прямая корреляция подтверждает тот факт, что в клеточном массиве наиболее низкодифференцированных аденокарцином предстательной железы существует значимая субпопуляция РСК, которые проявляют свойства мультипотентности благодаря наличию Nanog. Также в исследовании была продемонстрирована статистически значимая связь между выраженностью экспрессии Nanog

и наличием экстрапростатического распространения опухоли, что является немаловажным фактором, влияющим на прогноз. Большинство наблюдений, оказавшихся в значительной степени иммунореактивными по экспрессии данного белка, также характеризовались высокими показателями экспрессии Ki-67, что говорит о высоком пролиферативном потенциале анаплазированных раковых клеток, в том числе РСК. ИГХ-реакция с маркерами Nanog и Ki-67 в прогностических группах 1 и 2 оказалась на порядок ниже, чем в 5-й группе, что свидетельствует о потенциально благоприятном течении хорошо дифференцированных карцином.

ВЫВОДЫ

Определение раковых стволовых клеток в тканях рака предстательной железы является перспективным методом диагностики и прогнозирования течения заболевания. Высокие показатели экспрессии Nanog связаны с высокой пролиферативной активностью опухоли, а также потенциально неблагоприятным прогнозом — обладающие свойством полипотентности раковые стволовые клетки могут служить источником самообновления популяции опухолевых клеток, играть роль в механизмах метастазирования и химиорезистентности. Обнаружение опухолевых клеток с таким потенциалом требует выбора более агрессивной лечебной тактики, направленной в первую очередь на радикальную элиминацию опухоли.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России, 2019; 250 с.
- Zhou CK, Check DP, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Ferlay J, et al. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: an analysis of time trends overall and by age group. *Int J Cancer*. 2016; 138 (6): 1388–400.
- Heidegger I, Heidenreich A, Pfister D. New biomarkers for selecting the best therapy regimens in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Target Oncol*. 2017; 12 (1): 37–45.
- Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/
- Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: a systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*. 2015; 137 (7): 1749–57.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975–2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975–2013, National Cancer Institute. Bethesda, 2016. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med*. 2004; 350 (22): 2239–46.
- Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014; 14 (3): 275–91. DOI: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- Aguilar-Gallardo C, Simón C. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2013; 31 (01): 005–013. DOI: 10.1055/s-0032-1331792.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730–7. DOI: 10.1038/nm0797-730.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113: 643–

55. PubMed PMID: 12787505.
12. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113: 631–42.
13. Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2015; 17 (1): 1–10. DOI:10.1080/15384047.2015.1121348.
14. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 872–84.
15. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015; 54 (9): 679–87. DOI: 10.1002/mc.22340.
16. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (20): 3798–807.
17. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017; 23 (10): 1124–34. DOI:10.1038/nm.4409.
18. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2013 Sep 12; 32 (37): 4397–405.
19. Niu CS, Li DX, Liu YH, Fu XM, Tang SF, Li J. Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep*. 2011; 26 (3): 593–601.
20. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells*. 2012; 30 (10): 2076–87.
21. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med*. 2020; 245 (5): 456–64.
22. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14 (13): 4085–95.
23. Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int J Androl*. 2011; 34 (4 Pt 2): e160–e174.
24. Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of oct4 and nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res*. 2010; 70 (24): 10433–4.
25. Han J, Zhang F, Yu M, et al. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2012; 321 (1): 80–8.
26. Choi SC, Choi JH, Park CY, Ahn CM, Hong SJ, Lim DS. Nanog regulates molecules involved in stemness and cell cycle-signaling pathway for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma stem cells. *J Cell Physiol*. 2012; 227 (11): 3678–92.

References

1. Kaprin AD, Starinskiy VV, Petrova GV, editors. Malignant tumors in Russia in 2018 (morbidity and fatality). Moscow: FGBU «Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskii institut im. P.A. Gertsena» — filial FGBU «Natsional'nyy meditsinskiy issledovatel'skiy radiologicheskii tsentr» Minzdrava Rossii, 2019; 250 p. Russian.
2. Zhou CK, Check DP, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Ferlay J, et al. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: an analysis of time trends overall and by age group. *Int J Cancer*. 2016; 138 (6): 1388–400.
3. Heidegger I, Heidenreich A, Pfister D. New biomarkers for selecting the best therapy regimens in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Target Oncol*. 2017; 12 (1): 37–45.
4. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/
5. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: a systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*. 2015; 137 (7): 1749–57.
6. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975–2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975–2013, National Cancer Institute. National Cancer Institute. Bethesda, 2016. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
7. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med*. 2004; 350 (22): 2239–46.
8. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014; 14 (3): 275–91. DOI: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
9. Aguilar-Gallardo C, Simón C. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2013; 31 (01): 005–013. DOI: 10.1055/s-0032-1331792.
10. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730–7. DOI: 10.1038/nm0797-730.
11. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113: 643–55. PubMed PMID: 12787505.
12. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113: 631–42.
13. Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2015; 17 (1): 1–10. DOI:10.1080/15384047.2015.1121348.
14. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 872–84.
15. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015; 54 (9): 679–87. DOI: 10.1002/mc.22340.
16. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (20): 3798–807.
17. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017; 23 (10): 1124–34. DOI:10.1038/nm.4409.
18. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2013 Sep 12; 32 (37): 4397–405.
19. Niu CS, Li DX, Liu YH, Fu XM, Tang SF, Li J. Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep*. 2011; 26 (3): 593–601.
20. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells*. 2012; 30 (10): 2076–87.
21. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med*. 2020; 245 (5): 456–64.
22. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14 (13): 4085–95.
23. Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int J Androl*. 2011; 34 (4 Pt 2): e160–e174.
24. Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of oct4 and nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res*. 2010; 70 (24): 10433–4.
25. Han J, Zhang F, Yu M, et al. RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2012; 321 (1): 80–8.
26. Choi SC, Choi JH, Park CY, Ahn CM, Hong SJ, Lim DS. Nanog regulates molecules involved in stemness and cell cycle-signaling pathway for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma stem cells. *J Cell Physiol*. 2012; 227 (11): 3678–92.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОДУКТОВ ФОТООКИСЛЕНИЯ ПСОРАЛЕНА И ИХ ЦИКЛОАДДУКТОВ С АМИНОТИОЛАМИ: ХЕМОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

В. В. Скарга^{1,2}✉, А. Д. Задорожный¹, Б. В. Шилов¹, Е. В. Небезин¹, В. В. Негребетский¹, М. А. Маслов², А. А. Лагунин^{1,3}, М. В. Малахов¹¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Псоралены, медицинские фотосенсибилизаторы фурукумаринового ряда, используют для фотохимиотерапии и фотоиммунотерапии дерматозов. Продукты фотоокисления псораленов могут принимать участие в реализации терапевтических эффектов, однако возможные механизмы их действия остаются неизвестными. Основной целью работы было оценить потенциальные фармакологические эффекты и возможные механизмы действия шести ранее идентифицированных продуктов фотоокисления псоралена, характеризующихся наличием орто-гидроксиформильной группировки, их циклоаддуктов с аминотиолами, а также структурно родственных соединений (фурукумариновой кислоты и тукарезола). Хемоинформационный анализ потенциальных фармакологических эффектов и возможных механизмов действия указанных соединений был проведен с использованием программ PASS и PharmaExpert. Предсказанные фармакологические эффекты, частично подтверждаемые результатами ранее проведенных исследований, свидетельствуют о возможном участии продуктов фотоокисления псораленов в реализации эффектов PUVA-терапии или фотофереза при лечении ряда дерматозов и пролиферативных патологий. Широкий спектр фармакологических эффектов, обнаруженный для фурукумариновой кислоты и циклоаддуктов кумариновых и бензофурановых фотопродуктов псоралена с цистеином и гомоцистеином, определяет новые направления исследований в области терапевтического применения псораленов.

Ключевые слова: псоралены, кумарины, бензофураны, альдегиды, фурукумариновая кислота, аминотиолы, (Q)SAR, PASS, PharmaExpert**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-90277.**Вклад авторов:** В. В. Скарга — анализ литературы, анализ и интерпретация данных, подготовка и окончательная редакция текста рукописи; А. Д. Задорожный, Б. В. Шилов — сбор и анализ данных; Е. В. Небезин — анализ литературы, интерпретация данных; В. В. Негребетский — интерпретация данных, подготовка текста рукописи; М. А. Маслов — дизайн исследования; А. А. Лагунин — дизайн исследования, анализ литературы, подготовка текста рукописи; М. В. Малахов — дизайн исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка и окончательная редакция текста рукописи.✉ **Для корреспонденции:** Владислав Викторович Скарга
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117437; skargavlad@gmail.com**Статья получена:** 27.08.2020 **Статья принята к печати:** 22.09.2020 **Опубликована онлайн:** 09.10.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.059

PROSPECTIVE PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF PSORALEN PHOTOOXIDATION PRODUCTS AND THEIR CYCLOADDUCTS WITH AMINOTHIOLS: CHEMOINFORMATIC ANALYSIS

Skarga VV^{1,2}✉, Zadorozhny AD¹, Shilov BV¹, Nevezhin EV¹, Negrebetsky VV¹, Maslov MA², Lagunin AA^{1,3}, Malakhov MV¹¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia³ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia

Psoralens are medicinal photosensitizing furocoumarins which are used in photochemotherapy and photoimmunotherapy of dermatoses. Psoralen photooxidation products may be involved in therapeutic effects, but the possible mechanisms of their action remain unclear. The study was aimed to assess the prospective pharmacological effects and mechanisms of activity for six previously identified ortho-hydroxyformyl-containing psoralen photooxidation products and their cycloadducts with aminothiols, as well as for structurally similar compounds (furocoumaric acid and tucarezol). Chemoinformatic analysis of the prospective pharmacological effects and mechanisms of action of these compounds was performed using the PASS and PharmaExpert software. The predicted pharmacological effects partially confirmed by previous studies highlight the possible involvement of psoralen photooxidation products in the effects of PUVA therapy or photopheresis during the course of dermatoses and proliferative disorders treatment. A broad spectrum of pharmacological effects found for furocoumaric acid and cycloadducts of coumarinic and benzofuranic photoproducts of psoralen with cysteine and homocysteine appoints new directions of research relating to therapeutic use of psoralens.

Keywords: psoralens, coumarins, benzofurans, aldehydes, furocoumaric acid, aminothiols, (Q)SAR, PASS, PharmaExpert**Funding:** the study was supported by RFBR, project number 19-33-90277.**Author contribution:** Skarga VV — literature analysis, data analysis and interpretation, manuscript writing and editing; Zadorozhny AD, Shilov BV — data acquisition and analysis; Nevezhin EV — literature analysis, data interpretation; Negrebetsky VV — data interpretation, manuscript writing; Maslov MA — study design; Lagunin AA — study design, literature analysis, manuscript writing; Malakhov MV — study design, literature analysis, data interpretation, manuscript writing and editing.✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav V. Skarga
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117437; skargavlad@gmail.com**Received:** 27.08.2020 **Accepted:** 22.09.2020 **Published online:** 09.10.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.059

Псоралены — линейные фурукумарины растительного или синтетического происхождения, сенсибилизирующие биологические объекты к действию ближнего ультрафиолетового излучения (УФ-А-излучения, 320–400 нм)

[1]. Фотосенсибилизирующее действие псораленов широко используют в медицине при PUVA-терапии (от англ. *psoralen* и *UV-A*) или экстракорпоральном фотоферезе с целью лечения таких заболеваний, как

псориаз, витилиго, atopический дерматит, экзема, кожная Т-клеточная лимфома, склеродермия (системный склероз), реакция «трансплантат против хозяина» и ряда других патологий [2–9]. Согласно современным представлениям, PUVA-терапия и фотоферез основаны на антипролиферативном и проапоптотическом эффектах в отношении кератиноцитов и иммунокомпетентных клеток, а также индукции иммуносупрессии, т. е. по сути указанные способы лечения являются фотохимио- и фотоиммунотерапевтическими [2–9]. Важно отметить, что по причинам гибкости в применении, эффективности затрат и высокой безопасности клиническая значимость PUVA-терапии и фотофереза не уменьшается в современную эру разработки и применения биопрепаратов [6, 7, 9].

При проведении PUVA-терапии или фотофереза PUVA-воздействию подвергают кожу пациента или полученную от пациента лейкоцитарную массу соответственно. Ранее нами был предложен метод лечения псориаза, atopического дерматита и экземы, основанный на пероральном введении пациентам предварительно фотоокисленного *in vitro* псоралена (ФОП), индуцирующего иммунотерапевтический эффект *in vivo* [10, 11]. Механизмы указанного эффекта исследовали в модели реакции контактной чувствительности к динитрофторбензолу (ДНФБ) у мышей, являющейся экспериментальным аналогом atopического дерматита у человека [11, 12]. Было выявлено, что ФОП модулирует у ДНФБ-сенсibilизированных мышей продукцию секреторных цитокинов клетками лимфатических узлов: снижает продукцию IL2, IL4 и ИНФ- γ , увеличивает секрецию IL17, но не влияет на продукцию IL6 и IL10 [11]. Кроме того, обнаружено, что введение ФОП ДНФБ-сенсibilизированным мышам приводит к уменьшению числа клеток в региональных лимфатических узлах, снижению их пролиферативной активности и индукции в них апоптоза [11]. Полученные результаты хорошо согласуются с современными представлениями о механизмах реализации PUVA-терапии и фотофереза [2–9] и позволяют расценивать ФОП в качестве потенциального агента для лечения заболеваний, обусловленных гиперреактивностью Т-клеточного звена иммунитета.

Известно, что ФОП представляет собой сложную смесь фотопродуктов, образующихся в процессе фотолиза аэрированных растворов псоралена *in vitro* [13, 14]. При этом лишь некоторые из них были выделены из смеси и химически охарактеризованы вследствие их крайне малого выхода в фотореакциях и нестабильности при проведении разделения и/или аналитических процедур [13–16]. Анализ биологической активности продуктов фотоокисления псораленов *in vitro* выявил их апоптогенную активность [16, 17], а также способность влиять на процессы пролиферации и дифференцировки клеток [15, 17]. Примечательно, что апоптогенный эффект наблюдали лишь для трансформированных Т-лимфоцитов (клетки линии Jurkat), в то время как у нормальных лимфоцитов от здоровых доноров апоптогенные эффекты не были выявлены [16]. Это наблюдение позволило предположить, что апоптогенная активность фотопродуктов псоралена специфична, а сами продукты играют важную роль в реализации эффектов PUVA-терапии и фотофереза.

В настоящее время для прогноза биологической активности органических соединений широко используют методы хемоинформатики. Программные продукты, созданные с этой целью, позволяют с высокой точностью предсказывать профили биологической активности на основе

структурных формул анализируемых низкомолекулярных соединений [18–22].

Целью данной работы было оценить потенциальные фармакологические эффекты и возможные механизмы действия ранее идентифицированных продуктов фотоокисления псоралена и их циклоаддуктов с аминотиолами, соотнести результаты хемоинформационного анализа с иммуотропными (терапевтическими) эффектами, известными из литературы для этих продуктов, и определить новые направления исследований в этой области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для прогноза потенциальных фармакологических эффектов исследуемых соединений использовали компьютерную программу PASS (от англ. *prediction of activity spectra for substances*) версии 2019 (ИБМХ им. В. Н. Ореховича; Россия) [18, 19], позволяющую оценить вероятный профиль биологической активности по структурной формуле органического соединения. Оценка основана на анализе связей «структура–активность» обучающей выборки, включающей в себя более миллиона структур веществ, исследованных на биологическую активность. В программе PASS биологическая активность представлена качественным образом (активно/неактивно). Химическая структура описана в виде MNA-дескрипторов (от англ. *multilevel neighborhoods of atoms* — множественные атомные окрестности) [20]. Алгоритм построения моделей взаимосвязи «структура–активность» на основе веществ обучающей выборки и прогнозирования активности для новых соединений построен на модифицированном Байесовском алгоритме [18, 19]. Использованная версия программы PASS (PASS 2019) прогнозирует более 5000 видов биологической активности, включая терапевтические эффекты, 3818 механизмов действия, побочные эффекты со средней точностью около 95% (скользящий контроль с исключением по одному).

В качестве входной информации в программе PASS использовали информацию о структурной формуле молекулы, представленную в виде файла в формате Molfile. В качестве выходной информации получали список прогнозируемых видов активности с оценкой вероятности наличия каждого вида активности P_a и вероятности отсутствия каждого вида активности P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы. Вероятности P_a и P_i являются также оценками вероятностей ошибок первого и второго рода соответственно, а также могут быть рассмотрены в качестве меры принадлежности прогнозируемого соединения к классам «активных» и «неактивных» веществ. Чем больше для соответствующей активности прогнозируется величина P_a и чем меньше величина P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте.

В данном исследовании для прогноза и анализа возможных фармакологических эффектов и связанных с ними механизмов действия использовали также компьютерную программу PharmaExpert версии 2019 (ИБМХ им. В. Н. Ореховича; Россия) [21] с порогом вероятности проявления предсказанной активности 50% (активность считали вероятной, если величина вероятности ее наличия P_a была выше 0,5 и превосходила величину вероятности ее отсутствия P_i). Компьютерная программа PharmaExpert предназначена для анализа результатов прогноза PASS на основе известных данных о связи между действием на лекарственные мишени и

фармакологическими эффектами, которые хранятся в базе данных программы (текущая версия 2019 г. содержит более 15 тыс. таких связей).

Структуры исследуемых соединений использовали при поиске идентичных и похожих соединений в базе данных PubChem — крупнейшей свободно доступной базе, содержащей данные о структуре и биологической активности (как экспериментальные, так и патентные) для более чем 100 млн химических соединений [22]. Поиск идентичных и похожих соединений в PubChem основан на описании их структур в виде PubChem-фингерпринтов (векторов размером 881 бит, описывающих особенности структур соединений). Известно, что структурно подобные соединения могут проявлять аналогичную активность, и обнаружение подобных соединений с известной биологической активностью может помочь в планировании экспериментальных исследований. В данной работе для поиска соединений по структурному сходству использовали встроенный в PubChem сервис, который использует в качестве меры структурного сходства рассчитанный на основе PubChem-фингерпринтов коэффициент Танимото [23]:

$$T(X, Y) = (N(X \cap Y)) / (N(X \cup Y)),$$

где $N(X \cap Y)$ — число общих дескрипторов у соединений X и Y , $N(X \cup Y)$ — число всех уникальных дескрипторов у соединений X и Y . В качестве порога сходства использовали коэффициент Танимото больше 0,9 и 0,8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обоснование выбора объектов исследования

Известно, что формирование фотопродуктов, обладающих иммуностимулирующим (терапевтическим) действием, строго зависит от присутствия кислорода в процессе облучения растворов псоралена [10]. Этот факт позволяет ограничить поисковый анализ ранее охарактеризованными продуктами фотоокисления псоралена (ФОП-продуктами). Исчерпывающий анализ продуктов фотоллиза фурукумаринов и механизмов, приводящих к их формированию, был выполнен в обзоре [13]. В данном обзоре было показано, что все процессы с участием окислительной модификации молекулы псоралена и других фурукумаринов можно разделить на три группы. Первую группу формируют фотопродукты окислительного раскрытия фуранового или пиренового кольца, относящиеся к классам кумаринов и бензофуранов соответственно. Ко второй группе относят фотопродукты, формирование которых является результатом присоединения молекулы растворителя к промежуточному продукту фотоокисления по фурановому кольцу. Третья группа включает в себя фотопродукты двойной модификации молекулы псоралена, по меньшей мере одна из которых окислительная.

Проанализировав известные из литературы данные о биологической активности, мы решили сконцентрироваться на ФОП-продуктах, относящихся к первой группе. Известно, что получающиеся в процессе фотоокисления фурукумаринов кумарины и бензофураны содержат фингерпринт в виде орто-гидроксиформильной группировки (ОГФ) и обладают описанной выше биологической активностью [13, 15, 16]. Было высказано предположение [13], что биологическая активность ФОП-продуктов первой группы может быть обусловлена наличием ОГФ по аналогии с известным

иммуномодулятором тукарезолом [24]. Отчасти это предположение было подтверждено в одной из работ, в которой были описаны апоптогенные эффекты нескольких ОГФ-содержащих соединений [16]. Ранее также было показано, что ОГФ-содержащие продукты фотоокисления протопорфирина IX обладают иммуностимулирующим действием, супрессируя реакцию контактной чувствительности у мышей [25].

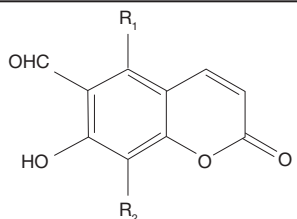
В результате, нами была определена группа соединений для проведения хемоинформационного анализа с использованием программ PASS и PharmaExpert. В нее вошли ОГФ-содержащие кумариновые ФОП-продукты (соединения 1–3), ранее идентифицированные для псоралена, а также для 8-метоксипсоралена (8-МОП) и 5-метоксипсоралена (5-МОП) — основных фотосенсибилизаторов фурукумаринового ряда, используемых в медицине [2–9]. В группу включены также известные ОГФ-содержащие бензофурановые ФОП-продукты вышеуказанных трех псораленов (соединения 4–6). Данная группа дополнена ОГФ-содержащим тукарезолом (соединение 7) в качестве соединения сравнения с известным иммуностимулирующим действием, в основе которого лежит стимуляция Т-клеток посредством формирования Шиффовых оснований с Т-клеточными рецепторами [24]. Кроме того, были проанализированы потенциальные фармакологические эффекты фурукумариновой кислоты (соединение 8) — фотопродукта псоралена, предположительно являющегося интермедиатом при формировании соединения 4 в процессе фотоокисления псоралена [26]. Отдельную группу составили соединения, являющиеся циклоаддуктами ОГФ-содержащих продуктов фотоокисления псоралена с цистеином и гомоцистеином (соединения 9–12 и 13–16 для кумаринового и бензофуранового ФОП-продуктов соответственно). Выбор цистеина и гомоцистеина для данного поискового исследования не случаен. Известно, что ОГФ-содержащие кумарины (в частности, 8-формилумбеллиферон) используют для флуориметрического анализа указанных аминокислот в биологических объектах [27], а их аддукты с аминами обладают биологической активностью [28].

Прогноз фармакологических эффектов ФОП-продуктов, фурукумариновой кислоты и тукарезолом

В табл. 1 и 2 обобщены основные результаты хемоинформационного анализа целевых ФОП-продуктов (соединения 1–6). Единственным из исследованных соединений с предсказанной иммуностимулирующей (иммуносупрессивной) активностью является кумариновый ФОП-продукт 5-МОП. Напротив, для всех соединений предсказана высокая вероятность активности в качестве индуктора апоптоза, причем величины P_a/P_i для указанного вида активности для кумариновых ФОП-продуктов были выше активности бензофурановых ФОП-продуктов. Кроме того, для соединений 1–6 предсказана противоопухолевая и цитостатическая активность.

Помимо описанных выше различных видов антипролиферативной активности, с высокой вероятностью была предсказана активность в качестве дыхательных (соединения 1–5) и в меньшей степени сердечно-сосудистых (соединения 1, 2) аналептиков, а также антимуtagens (соединения 1–6) и радиопротекторов (соединения 1, 3, 4 и 6). Для бензофурановых ФОП-продуктов (особенно, для соединения 4) предполагается ряд других защитных

Таблица 1. Кумариновые ФОП-продукты

	$R_1 = H$ $R_2 = H$ 1	$R_1 = H$ $R_2 = OMe$ 2	$R_1 = OMe$ $R_2 = H$ 3
Фармакологический эффект	P_a / P_i		
Иммуносупрессивный	–	–	0,541/0,036
Агонист апоптоза	0,899/0,004	0,915/0,004	0,764/0,010
Противоопухолевый	0,741/0,019	0,763/0,017	0,751/0,018
Цитостатический	0,538/0,020	0,586/0,015	0,516/0,023
Антимутагенный	0,807/0,004	0,760/0,005	0,774/0,004
Радиопротекторный	0,701/0,010	–	0,766/0,006
Аналептический	0,791/0,005	0,769/0,007	0,687/0,011
Противогрибковый	0,620/0,016	0,631/0,015	0,584/0,020
Антипротозойный (трипаносома)	0,537/0,014	–	–
Антипаразитарный	0,513/0,014	0,519/0,014	–
Антигельминтный (нематоды)	0,512/0,015	–	–
Антимикобактериальный	0,506/0,018	–	–

видов активности (вазопротекторная, нейропротекторная и кардиопротекторная активности).

Результаты анализа указывают на широкий спектр ожидаемой антибиотической активности: прогнозируется, что соединения 1–6 обладают противогрибковой активностью, а соединение 1 характеризуется сразу пятью видами антибиотической активности. При сравнении можно отметить, что антибиотическая активность кумариновых ФОП-продуктов количественно и качественно превосходит активность бензофурановых ФОП-продуктов.

Анализ предсказанных механизмов действия указанных выше видов активности позволяет сделать вывод, что антипролиферативные виды активности изучаемых соединений могут быть опосредованы их действием в качестве агонистов апоптоза и ингибиторов активности целого ряда

ферментов (фосфатаз, киназ, монофенолксигеназы) и факторов транскрипции (например, фактора транскрипции NF-kB). Радиопротекторные свойства связывают со способностью выступать в качестве ингибитора проницаемости мембран и способствовать ее целостности, а также действовать в качестве ловушки свободных радикалов. Антибиотическая активность предположительно обусловлена влиянием соединений на трансмембранные процессы и функционирование киназ и мембранных белков (например, ингибировать пенициллинсвязывающий белок *ampH*).

В табл. 3 представлены основные результаты предсказания фармакологических эффектов тукарезол. Согласно проведенному анализу, тукарезол с высокой вероятностью обладает противовоспалительной

Таблица 2. Бензофурановые ФОП-продукты

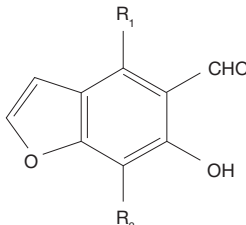
	$R_1 = H$ $R_2 = H$ 4	$R_1 = H$ $R_2 = OMe$ 5	$R_1 = OMe$ $R_2 = H$ 6
Фармакологический эффект	P_a / P_i		
Агонист апоптоза	0,884/0,005	0,906/0,004	0,702/0,015
Противоопухолевый	0,565/0,053	0,635/0,038	0,613/0,042
Цитостатический	–	0,532/0,021	–
Антимутагенный	0,780/0,004	0,724/0,005	0,741/0,005
Радиопротекторный	0,662/0,012	–	0,746/0,008
Аналептический	0,580/0,021	0,532/0,027	–
Противогрибковый	0,531/0,026	0,548/0,024	–
Антимикобактериальный	0,510/0,180	–	–
Вазопротекторный	0,732/0,009	0,550/0,028	0,523/0,034
Нейропротекторный	0,640/0,058	–	0,586/0,080
Кардиопротекторный	0,539/0,008	–	–

Таблица 3. Тукарезол

<p style="text-align: center;">7</p>	
Фармакологический эффект	P_a / P_i
Противовоспалительный (кишечник)	0,800/0,004
Лечение серповидной клеточной анемии	0,738/0,002
Антинейротоксический	0,677/0,035
Нейропротекторный	0,662/0,039
Антипротозойный (лейшмании)	0,608/0,004
Лечение предопухолевых состояний	0,556/0,026
Цитопротекторный	0,533/0,020
Радиопротекторный	0,502/0,022

активностью в кишечнике, а также нейротропными защитным эффектами (антинейротоксическая и нейропротекторная активности).

Неожиданно богатой оказалась палитра прогнозируемых фармакологических эффектов для фурукумариновой кислоты (табл. 4). Предполагается, что, действуя преимущественно в качестве ловушки свободных радикалов и способствуя сохранению целостности мембран, фурукумариновая кислота обеспечивает широкий спектр защитных эффектов (в том числе антимуtagenный, нейропротекторный, вазопротекторный, радиопротекторный, антиканцерогенный и другие эффекты), влияет на процессы метаболизма (регулирует метаболизм липидов, снижает содержание холестерина в крови), обеспечивает противовоспалительную и антиоксидантную защиту, а также обладает потенциальной терапевтической активностью в дерматологии (в частности, антипсориатической) за

счет противовоспалительного эффекта и регуляции ферментативной деятельности.

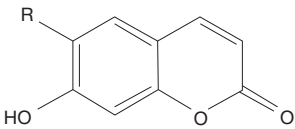
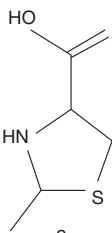
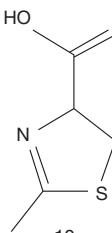
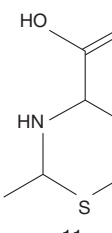
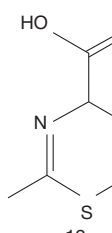
Прогноз фармакологических эффектов циклоаддуктов ОГФ-содержащих продуктов фотоокисления псоралена с аминотиолами

В табл. 5 и 6 представлен прогноз фармакологических эффектов циклоаддуктов с аминотиолами для ОГФ-содержащих продуктов фотоокисления псоралена. Взаимодействие кумаринового соединения 1 с цистеином и гомоцистеином приводит к формированию соответствующих циклоаддуктов (см. табл. 5, соединения 9 и 11). Окисление соединений 9 и 11 приводит к получению соединений 10 и 12 соответственно (см. табл. 5). По аналогии, соответствующие циклоаддукты могут быть получены для бензофуранового соединения 4 (см. табл. 6, соединения 13–16).

Таблица 4. Фурукумариновая кислота

<p style="text-align: center;">8</p>	
Фармакологический эффект	P_a / P_i
Антимуtagenный	0,896/0,002
Нейропротекторный	0,754/0,018
Вазопротекторный	0,720/0,006
Регуляция метаболизма липидов	0,676/0,012
Антигиперхолестеринемический	0,669/0,011
Радиопротекторный	0,643/0,011
Противораковый	0,631/0,013
Жаропонижающий	0,566/0,009
Дерматологический	0,530/0,028
Противовоспалительный	0,523/0,033
Антиоксидантный	0,520/0,006

Таблица 5. Циклоаддукты кумариновых ФОП-продуктов с аминотиолами

	R			
	 9	 10	 11	 12
Фармакологический эффект	P_a / P_i			
Радиопротекторный	0,857/0,003	0,569/0,015	0,800/0,005	0,513/0,021
Лечение рака предстательной железы	0,734/0,004	–	0,640/0,005	–
Противоопухолевый (меланома)	0,661/0,004	–	0,540/0,006	–
Противоопухолевый (рак печени)	0,563/0,003	–	0,503/0,003	–
Лечение заболеваний печени	0,700/0,004	0,683/0,004	0,555/0,008	0,614/0,005
Спазмолитический (мочевыводящие пути)	0,525/0,021	0,577/0,013	0,512/0,023	0,563/0,015
Лечение нейродегенеративных заболеваний	–	0,528/0,027	–	0,603/0,016
Дерматологический	–	0,522/0,029	–	0,585/0,019

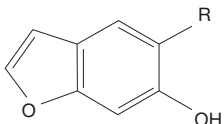
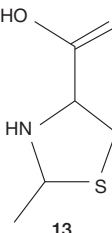
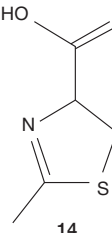
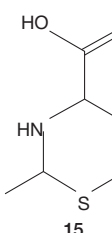
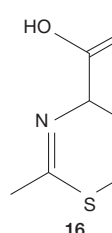
Согласно проведенному анализу, соединения 9–15 могут выступать в роли радиопротекторов, причем данное свойство, связываемое со способностью перехватывать свободные радикалы, более вероятно для неокисленных форм циклоаддуктов (соединения 9, 11, 13, 15). Кроме того, предполагается, что соединения 9, 11, 13 и 15 (но не их соответствующие окисленные формы 10, 12, 14 и 16) обладают противоопухолевой активностью для целого ряда злокачественных опухолей, таких как рак предстательной железы, рак печени и меланома. Для всех соединений 9–16 предсказана активность в роли гепатопротектора, что может быть использовано при лечении заболеваний печени. Как и в случае с радиопротекторными свойствами, этот фармакологический эффект связывают с активностью соединений 9–16 в качестве химического восстановителя и ловушек свободных радикалов. По прогнозу, кумариновые циклоаддукты 9–12 обладают спазмолитической активностью, реализующейся в мочевыводящих путях, тогда как для бензофурановых

циклоаддуктов 13–16 такая активность не предполагается. Все окисленные формы циклоаддуктов (соединения 10, 12, 14 и 16) предположительно применимы для лечения нейродегенеративных заболеваний, а соединения 10 и 12 потенциально активны и в дерматологии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Описанные результаты исследования хорошо согласуются с данными, известными из литературы. Ранее было обнаружено, что соединения 1 и 2 являются индукторами апоптоза [16], а производные псораленов способны ингибировать активность фактора транскрипции NF- κ B [29]. Кроме того, предсказанная для соединений 1–6 противоопухолевая и цитостатическая активность может объяснить некоторые полученные ранее эффекты ФОП и отдельных фотопродуктов. Так, в опытах *in vivo* с привитой мышам лимфомой EL-4, моделирующей кожную Т-клеточную лимфому человека, для ФОП была показана

Таблица 6. Циклоаддукты бензофурановых ФОП-продуктов с аминотиолами

	R			
	 13	 14	 15	 16
Фармакологический эффект	P_a / P_i			
Радиопротекторный	0,843/0,004	0,531/0,019	0,783/0,005	–
Лечение рака предстательной железы	0,710/0,004	–	0,621/0,006	–
Противоопухолевый (меланома)	0,670/0,004	–	0,549/0,005	–
Противоопухолевый (рак печени)	0,579/0,003	–	0,510/0,003	–
Лечение заболеваний печени	0,689/0,004	0,672/0,004	0,542/0,008	0,601/0,005
Лечение нейродегенеративных заболеваний	–	0,658/0,011	–	0,707/0,008

противоопухолевая активность [10], а бензофурановый ФОП-продукт псоралена (соединение 4) обладал тератогенным эффектом в опытах на эмбрионах *Xenopus laevis* [15].

Кроме того, ранее было показано, что тукарезол, использованный в настоящем исследовании в качестве соединения сравнения с известным иммунотропным действием, обладает антипротозойной активностью в модели экспериментального висцерального лейшманиоза [30], а также применим для терапии больных серповидноклеточной анемией [31]. В этой связи примечательно, что возможность использования для лечения β -талассемии и серповидноклеточной анемии была также описана для продуктов фотоокисления псораленов [17].

Особый интерес представляет неожиданное обнаружение у фурукумариновой кислоты потенциальной терапевтической активности в дерматологии (в частности, антипсориазной) за счет противовоспалительного действия и регуляции ферментативной активности. Последние два вида биологической активности характерны для коричневых кислот [32], и предположительно реализуются фурукумариновой кислотой за счет перехвата свободных радикалов, ингибирования липоксигеназы и факторов транскрипции и сохранения целостности мембран.

Терапевтической активностью в дерматологии потенциально обладают и окисленные формы кумариновых циклоаддуктов с аминотиолами. Большой интерес представляет предсказанная нами активность ОГФ-содержащих продуктов фотоокисления псоралена в отношении гомоцистеина. Известно, что повышенное содержание и/или накопление гомоцистеина может приводить к ряду патологических состояний (болезни Альцгеймера,

сенильной деменции, сосудистым нарушениям, нефропатии и др.) [33]. Поэтому предсказанная терапевтическая активность окисленных форм циклоаддуктов, возникающая в результате взаимодействия ОГФ-содержащих продуктов фотоокисления псоралена и гомоцистеина, может определять перспективу применения данных соединений для лечения вышеуказанных патологий.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе с использованием программ PASS и PharmaExpert была осуществлена хемоинформационная оценка потенциальных фармакологических эффектов и их возможных механизмов действия ранее идентифицированных продуктов фотоокисления псораленов и их циклоаддуктов с аминотиолами. Ряд предсказанных фармакологических эффектов подтверждают результаты ранних исследований, что указывает на высокую прогностическую эффективность проведенного анализа. В контексте актуального применения псораленов при лечении целого ряда дерматозов и пролиферативных патологий полученные данные свидетельствуют о возможном участии продуктов фотоокисления псораленов в реализации терапевтических эффектов PUVA-терапии или фотофереза, а потому представляют особую ценность. Отдельный интерес вызывает неожиданно широкий спектр фармакологических эффектов, обнаруженный для фурукумариновой кислоты и циклоаддуктов кумариновых и бензофурановых продуктов фотоокисления псоралена с аминотиолами и позволяющий определить новые направления исследований в области терапевтического применения псораленов.

Литература

1. Bruni R, Barreca D, Protti M, Brighenti V, Righetti L, Anceschi L, et al. Botanical Sources, Chemistry, Analysis, and Biological Activity of Furanocoumarins of Pharmaceutical Interest. *Molecules*. 2019; 24 (11): 2163. DOI: 10.3390/molecules24112163.
2. Trautinger F, Just U, Knobler R. Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy). *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12 (1): 22–8. DOI: 10.1039/c2pp25144b.
3. Racz E, Prens EP. Phototherapy and photochemotherapy for psoriasis. *Dermatol Clin*. 2015; 33 (1): 79–89. DOI: 10.1016/j.det.2014.09.007.
4. Bae JM, Jung HM, Hong BY, Lee JH, Choi WJ, Lee JH, et al. Phototherapy for Vitiligo: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2017; 153 (7): 666–674. DOI: 10.1001/jamadermatol.2017.0002.
5. Chaowattapanit S, Choonhakarn C, Foocharoen C, Julianon N. Phototherapy in systemic sclerosis: Review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2017; 33 (6): 296–305. DOI: 10.1111/phpp.12331.
6. Guitart J. Psoralen Plus UV-A Therapy in the 21st Century: Use It or Lose It. *JAMA Dermatol*. 2019; 155 (5): 529–31. DOI: 10.1001/jamadermatol.2018.5844.
7. Richard EG. The Science and (Lost) Art of Psoralen Plus UVA Phototherapy. *Dermatol Clin*. 2020; 38 (1): 11–23. DOI: 10.1016/j.det.2019.08.002.
8. Vieyra-Garcia PA, Wolf P. Extracorporeal Photopheresis: A Case of Immunotherapy Ahead of Its Time. *Transfus Med Hemother*. 2020; 47 (3): 226–35. DOI: 10.1159/000508479.
9. Torres AE, Lyons AB, Hamzavi IH, Lim HW. Role of phototherapy in the era of biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2020; S0190-9622 (20): 30711–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.09.
10. Potapenko AY, Kyagova AA, Bezdetsnaya LN, Lysenko EP, Chernyakhovskaya IYu, Bekhalo VA, et al. Products of psoralen photooxidation possess immunomodulative and antileukemic effects. *Photochem Photobiol*. 1994; 60 (2): 171–4. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05086.x.
11. Пятницкий И. А., Павлова С. И., Албегова Д. З., Козлов И. Г., Потепенко А. Я., Кыгова А. А. Супрессорное действие продуктов фотоокисления псоралена на реакцию контактной чувствительности у мышей: ингибирование пролиферации и индукция апоптоза лимфоцитов. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2013; 6: 59–63.
12. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2013; 133 (2): 303–15. DOI: 10.1038/jid.2012.284.
13. Caffieri S. Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. *Photochem Photobiol Sci*. 2002; 1 (3): 149–57. DOI: 10.1039/b107329j.
14. Potapenko AY, Malakhov MV, Kyagova AA. Photobiophysics of furocoumarins. *Biophysics*. 2004; 49 (2): 307–24.
15. Marley KA, Larson RA, Davenport R. Alternative mechanisms of psoralen phototoxicity. *ACS Symposium Series*. 1995; 616 (15): 179–88. DOI: 10.1021/bk-1995-0616.ch015.
16. Caffieri S, Di Lisa F, Bolesani F, Facco M, Semenzato G, Dall'Acqua F, et al. The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy. *Blood*. 2007; 109 (11): 4988–94. DOI: 10.1182/blood-2006-08-037192.
17. Viola G, Salvador A, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Bianchi N, Zuccato C, et al. Differentiation and apoptosis in UVA-irradiated cells treated with furocoumarin derivatives. *Ann NY Acad Sci*. 2009; 1171: 334–44. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04894.x.

18. Филимонов Д. А., Лагунин А. А., Глоризова Т. А., Рудик А. В., Дружиловский Д. С., Погодин П. В. и др. Предсказание спектров биологической активности органических соединений используя веб-ресурс PASS Online. Химия гетероциклических соединений. 2014; 50 (3): 483–99. DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.
19. Филимонов Д. А., Дружиловский Д. С., Лагунин А. А., Глоризова Т. А., Рудик А. В. и др. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения. Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2018; 1 (1): e00004. DOI: 10.18097/BMCRM00004.
20. Filimonov D, Poroikov V, Borodina Yu, Glorizova T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors. J Chem Inf Comput Sci. 1999; 39 (4): 666–70. DOI: 10.1021/ci980335o.
21. Lagunin AA, Goel RK, Gawande DY, Pahwa P, Glorizova TA, Dmitriev AV, et al. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. Nat Prod Rep. 2014; 31 (11): 1585–611. DOI: 10.1039/c4np00068d.
22. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic Acids Res. 2019; 47 (D1): D1102–9. DOI: 10.1093/nar/gky1033.
23. Willett P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. Drug Discov Today. 2006; 11 (23–24): 1046–53.
24. Chen H, Hall S, Zheng B, Rhodes J. Potentiation of the Immune System by Schiff Base-Forming Drugs. BioDrugs. 1997; 7 (3): 217–31. DOI: 10.2165/00063030-199707030-00005.
25. Kyagova AA, Mansurova GV, Kozir LA, Ponomarev GV, Pavlov VY, Konstantinov IO, et al. Systemic suppression of the contact hypersensitivity by the products of protoporphyrin IX photooxidation. Photochem Photobiol. 2005; 81 (6): 1380–5. DOI: 10.1562/2005-04-26-RA-500.
26. Nevezhin EV, Vlasova NV, Pyatnitskiy IA, Lysenko EP, Malakhov MV. On the mechanism of erythrocyte hemolysis induced by photooxidized psoralen. Biochemistry (Moscow). 2015; 80 (6): 763–8. DOI: 10.1134/S0006297915060115.
27. Yin C, Huo F, Zhang J, Martínez-Mañez R, Yang Y, Lv H, et al. Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition. Chem Soc Rev. 2013; 42 (14): 6032–59. DOI: 10.1039/c3cs60055f.
28. Patil SA, Prabhakara CT, Halasangi BM, Toragalmath SS, Badami PS. DNA cleavage, antibacterial, antifungal and anthelmintic studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of coumarin Schiff bases: synthesis and spectral approach. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015; 137: 641–51. DOI: 10.1016/j.saa.2014.08.028.
29. Marzaro F, Lampronti I, Borgatti M, Manzini P, Gambari R, Chilin A. Psoralen derivatives as inhibitors of NF κB DNA interaction — the critical role of the furan ring. Mol Divers. 2015; 19 (3): 551–61. DOI: 10.1007/s11030-015-9586-2.
30. Smith AC, Yardley V, Rhodes J, Croft SL. Activity of the novel immunomodulatory compound tucareol against experimental visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (6): 1494–8. DOI: 10.1128/aac.44.6.1494-1498.2000.
31. Arya R, Rolan PE, Wootton R, Posner J, Bellingham AJ. Tucareol increases oxygen affinity and reduces haemolysis in subjects with sickle cell anaemia. Br J Haematol. 1996; 93 (4): 817–21. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1744.x.
32. Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. Mini Rev Med Chem. 2012; 12 (8): 749–67. DOI: 10.2174/138955712801264792.
33. Zaric BL, Obradovic M, Bajic V, Haidara MA, Jovanovic M, Isenovic ER. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. Curr Med Chem. 2019; 26 (16): 2948–61. DOI: 10.2174/0929867325666180313105949.

References

1. Bruni R, Barreca D, Protti M, Brighenti V, Righetti L, Anceschi L, et al. Botanical Sources, Chemistry, Analysis, and Biological Activity of Furanocoumarins of Pharmaceutical Interest. Molecules. 2019; 24 (11): 2163. DOI: 10.3390/molecules24112163.
2. Trautinger F, Just U, Knobler R. Photopheresis (extracorporeal photochemotherapy). Photochem Photobiol Sci. 2013; 12 (1): 22–8. DOI: 10.1039/c2pp25144b.
3. Racz E, Prens EP. Phototherapy and photochemotherapy for psoriasis. Dermatol Clin. 2015; 33 (1): 79–89. DOI: 10.1016/j.det.2014.09.007.
4. Bae JM, Jung HM, Hong BY, Lee JH, Choi WJ, Lee JH, et al. Phototherapy for Vitiligo: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Dermatol. 2017; 153 (7): 666–674. DOI: 10.1001/jamadermatol.2017.0002.
5. Chaowattananapanit S, Choonhakarn C, Foocharoen C, Julianon N. Phototherapy in systemic sclerosis: Review. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2017; 33 (6): 296–305. DOI: 10.1111/phpp.12331.
6. Guitart J. Psoralen Plus UV-A Therapy in the 21st Century: Use It or Lose It. JAMA Dermatol. 2019; 155 (5): 529–31. DOI: 10.1001/jamadermatol.2018.5844.
7. Richard EG. The Science and (Lost) Art of Psoralen Plus UVA Phototherapy. Dermatol Clin. 2020; 38 (1): 11–23. DOI: 10.1016/j.det.2019.08.002.
8. Vieyra-Garcia PA, Wolf P. Extracorporeal Photopheresis: A Case of Immunotherapy Ahead of Its Time. Transfus Med Hemother. 2020; 47 (3): 226–35. DOI: 10.1159/000508479.
9. Torres AE, Lyons AB, Hamzavi IH, Lim HW. Role of phototherapy in the era of biologics. J Am Acad Dermatol. 2020; S0190-9622 (20): 30711–8. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.09.
10. Potapenko AY, Kyagova AA, Bezdetnaya LN, Lysenko EP, Chernyakhovskaya IYu, Bekhalo VA, et al. Products of psoralen photooxidation possess immunomodulative and antileukemic effects. Photochem Photobiol. 1994; 60 (2): 171–4. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05086.x.
11. Pyatnitskiy IA, Pavlova SI, Albegova DZ, Kozlov IG, Potapenko AY, Kyagova AA. Suppressive effects of psoralene photooxidation products on contact sensitivity reaction in mice: lymphocyte proliferation inhibition and apoptosis induction. Russian journal of skin and venereal diseases. 2013; 6: 59–63. Russian.
12. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. J Invest Dermatol. 2013; 133 (2): 303–15. DOI: 10.1038/jid.2012.284.
13. Caffieri S. Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. Photochem Photobiol Sci. 2002; 1 (3): 149–57. DOI: 10.1039/b107329j.
14. Potapenko AY, Malakhov MV, Kyagova AA. Photobiophysics of furocoumarins. Biophysics. 2004; 49 (2): 307–24.
15. Marley KA, Larson RA, Davenport R. Alternative mechanisms of psoralen phototoxicity. ACS Symposium Series. 1995; 616 (15): 179–88. DOI: 10.1021/bk-1995-0616.ch015.
16. Caffieri S, Di Lisa F, Bolesani F, Faccio M, Semenzato G, Dall'Acqua F, et al. The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy. Blood. 2007; 109 (11): 4988–94. DOI: 10.1182/blood-2006-08-037192.
17. Viola G, Salvador A, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Bianchi N, Zuccato C, et al. Differentiation and apoptosis in UVA-irradiated cells treated with furocoumarin derivatives. Ann NY Acad Sci. 2009; 1171: 334–44. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04894.x.
18. Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Druzhilovskij DS, Pogodin PV i dr. Predskazanie spektrov biologicheskoy aktivnosti organicheskikh soedinenij ispol'zuja veb-resurs PASS Online. Himija geterociklicheskih soedinenij. 2014; 50 (3): 483–99. DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.
19. Filimonov DA, Druzhilovskij DS, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Dmitriev AV, Pogodin PV, Poroikov VV. Computer prediction of the spectra of biological activity of chemical compounds: possibilities and limitations. Biomedical Chemistry: Research and Methods.

- 2018; 1 (1): e00004. DOI: 10.18097/BMCRM00004.
20. Filimonov D, Poroikov V, Borodina Yu, Glorizova T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors. *J Chem Inf Comput Sci*. 1999; 39 (4): 666–70. DOI: 10.1021/ci980335o.
 21. Lagunin AA, Goel RK, Gawande DY, Pahwa P, Glorizova TA, Dmitriev AV, et al. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Nat Prod Rep*. 2014; 31 (11): 1585–611. DOI: 10.1039/c4np00068d.
 22. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47 (D1): D1102–9. DOI: 10.1093/nar/gky1033.
 23. Willett P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today*. 2006; 11 (23–24): 1046–53.
 24. Chen H, Hall S, Zheng B, Rhodes J. Potentiation of the Immune System by Schiff Base-Forming Drugs. *BioDrugs*. 1997; 7 (3): 217–31. DOI: 10.2165/00063030-199707030-00005.
 25. Kyagova AA, Mansurova GV, Kozir LA, Ponomarev GV, Pavlov VY, Konstantinov IO, et al. Systemic suppression of the contact hypersensitivity by the products of protoporphyrin IX photooxidation. *Photochem Photobiol*. 2005; 81 (6): 1380–5. DOI: 10.1562/2005-04-26-RA-500.
 26. Nevezhin EV, Vlasova NV, Pyatnitskiy IA, Lysenko EP, Malakhov MV. On the mechanism of erythrocyte hemolysis induced by photooxidized psoralen. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80 (6): 763–8. DOI: 10.1134/S0006297915060115.
 27. Yin C, Huo F, Zhang J, Martínez-Máñez R, Yang Y, Lv H, et al. Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition. *Chem Soc Rev*. 2013; 42 (14): 6032–59. DOI: 10.1039/c3cs60055f.
 28. Patil SA, Prabhakara CT, Halasangi BM, Toragalmath SS, Badami PS. DNA cleavage, antibacterial, antifungal and anthelmintic studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of coumarin Schiff bases: synthesis and spectral approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015; 137: 641–51. DOI: 10.1016/j.saa.2014.08.028.
 29. Marzaro F, Lampronti I, Borgatti M, Manzini P, Gambari R, Chilin A. Psoralen derivatives as inhibitors of NF κB DNA interaction — the critical role of the furan ring. *Mol Divers*. 2015; 19 (3): 551–61. DOI: 10.1007/s11030-015-9586-2.
 30. Smith AC, Yardley V, Rhodes J, Croft SL. Activity of the novel immunomodulatory compound tucaresol against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 (6): 1494–8. DOI: 10.1128/aac.44.6.1494-1498.2000.
 31. Arya R, Rolan PE, Wootton R, Posner J, Bellingham AJ. Tucaresol increases oxygen affinity and reduces haemolysis in subjects with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 1996; 93 (4): 817–21. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1744.x.
 32. Sova M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2012; 12 (8): 749–67. DOI: 10.2174/138955712801264792.
 33. Zaric BL, Obradovic M, Bajic V, Haidara MA, Jovanovic M, Isenovic ER. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. *Curr Med Chem*. 2019; 26 (16): 2948–61. DOI: 10.2174/0929867325666180313105949.

ВЛИЯНИЕ КУРСА НЕЙРОМОДУЛЯЦИИ НА ПРОФИЛЬ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ СОЗНАНИЯ

Е. Г. Язева , Л. А. Легостаева, И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева, Д. А. Абаимов, Н. А. Супонева, А. А. Шабалина, Ю. В. Рябинкина, М. А. Пирадов

Научный центр неврологии, Москва, Россия


Одним из методов реабилитации пациентов с хроническим нарушением сознания (ХНС) является транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС). Целью работы было изучить нейротрофические факторы у пациентов с ХНС и их изменение на фоне применения курса ТМС. Пациентам с ХНС различной этиологии в хронических сроках (26 человек) и здоровым добровольцам (21 человек) проводили курс ритмической ТМС левой ангулярной извилины. У всех участников собирали образцы сыворотки крови и ликвора до и после курса. В биоматериале исследовали уровни BDNF, NSE, NGF, PDGF, GDNF, NT3. Показано, что уровни BDNF, NSE, PDGF, GDNF, NT3 в крови у пациентов с ХНС выше, чем у здоровых добровольцев ($p < 0,05$). Не выявлено различий в концентрации нейротрофических факторов в крови и ликворе в зависимости от формы ХНС. У пациентов с последствиями черепно-мозговой травмы уровень BDNF в ликворе оказался выше, чем у пациентов с нетравматической этиологией ХНС ($p < 0,05$). После проведения курса ТМС показано увеличение уровня BDNF в ликворе у посттравматических пациентов ($p < 0,05$). Других значимых изменений по группам и другим биомаркерам в крови и ликворе выявлено не было. Таким образом, уровни нейротрофических факторов BDNF, NSE, PDGF, GDNF, NT3 в сыворотке крови пациентов с ХНС выше, чем у здоровых добровольцев. Уровень BDNF в ликворе пациентов был выше при посттравматическом ХНС и увеличивался после проведения курса высокочастотной ТМС у этой группы. Это может свидетельствовать о длительных процессах нейропластичности, происходящих у пациентов после черепно-мозговой травмы, и более благоприятном реабилитационном прогнозе.

Ключевые слова: хронические нарушения сознания, вегетативное состояние, синдром ареактивного бодрствования, состояние минимального сознания, BDNF, NSE, PDGF, NT3, нейротрофические факторы, транскраниальная магнитная стимуляция

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) 16-15-00274.

Вклад авторов: Е. Г. Язева — клиническая работа, клиническая оценка, сбор биоматериалов, подготовка рукописи; Л. А. Легостаева — клиническая работа, клиническая оценка, сбор биоматериалов; И. С. Бакулин, А. Г. Пойдашева — выполнение рТМС, подготовка рукописи; Д. А. Абаимов, А. А. Шабалина — выполнение лабораторных исследований; Н. А. Супонева, Ю. В. Рябинкина, М. А. Пирадов — планирование и руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 9-5.16 от 26 октября 2016 г.). Пациентов включали в исследование после получения от их родственников добровольного письменного информированного согласия.

 **Для корреспонденции:** Елизавета Григорьевна Язева
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; yazeva@neurology.ru

Статья получена: 19.08.2020 **Статья принята к печати:** 05.09.2020 **Опубликована онлайн:** 23.09.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.056

EFFECT OF NEUROMODULATION ON NEUROTROPHIC FACTORS IN PATIENTS WITH CHRONIC DISORDERS OF CONSCIOUSNESS

Iazeva EG , Legostaeva LA, Bakulin IS, Poydasheva AG, Abaimov DA, Suponeva NA, Shabalina AA, Ryabinkina YV, Piradov MA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia


Transcranial magnetic stimulation (TMS) is one of rehabilitation approaches for patients with chronic disorders of consciousness (DOC). The aim of our study was to assess neurotrophic factors and the changes of those after TMS course in patients with chronic DOC. We enrolled 26 patients with chronic DOC of various etiology and 21 healthy volunteers. Blood serum and cerebrospinal fluid (CSF) were collected from all patients before and after the TMS course, the levels of BDNF, NSE, NGF, PDGF, GDNF and NT3 were assessed in the biomaterial. The blood BDNF, NSE, PDGF, GDNF and NT3 in patients with chronic DOC were higher compared to healthy volunteers ($p < 0.05$). We found no correlations between the type of DOC and neurotrophic factors concentrations in blood and CSF. The CSF level of BDNF in patients after traumatic brain injury (TBI) was higher compared to patients with non-traumatic chronic DOC ($p < 0.05$). We also found the increase of CSF BDNF after the TMS course in patients after TBI ($p < 0.05$). No other significant differences between groups and another blood and cerebrospinal fluid biomarker levels were detected. Thus, the serum BDNF, NSE, PDGF, GDNF and NT3 levels in patients with chronic DOC were higher compared to healthy volunteers. The BDNF level in CSF was higher in patients with traumatic DOC, and it also increased after the course of high-frequency TMS in this group. This fact may indicate the long-term neuronal plasticity processes in patients after TBI, as well as more favorable rehabilitation prognosis.

Keywords: disorders of consciousness, vegetative state, unresponsive wakefulness syndrome, minimally consciousness state, BDNF, NSE, PDGF, NT3, neurotrophic factors, transcranial magnetic stimulation

Funding: the study was supported by Russian Science Foundation (RSF) grant 16-15-00274.

Author contribution: Iazeva EG — clinical practice, clinical assessment, collecting biomaterials, manuscript writing; Legostaeva LA — clinical practice, clinical assessment, collecting biomaterials; Bakulin IS, Poydasheva AG — pTMS, manuscript writing; Abaimov DA, Shabalina AA — laboratory tests; Suponeva NA, Ryabinkina YV, Piradov MA — study planning and management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 9-5.16 dated October 26, 2016). Patients were included in the study after obtaining the informed consent from their legal representatives.

 **Correspondence should be addressed:** Elizaveta G. Iazeva
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; yazeva@neurology.ru

Received: 19.08.2020 **Accepted:** 05.09.2020 **Published online:** 23.09.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.056

Совершенствование методов реаниматологии и интенсивной терапии привело к увеличению числа пациентов, выживающих после тяжелого повреждения мозга. В связи с этим появилось большое число тяжело инвалидизированных больных с различными формами хронических нарушений сознания (ХНС), к которым относят вегетативное состояние, или синдром ареактивного бодрствования (BC/CAБ), состояние минимального сознания (СМС) и состояние выхода из СМС. Как известно, для BC характерно спонтанное открывание глаз без признаков осознания себя и окружающей действительности. СМС отличает хоть и ограниченное, но четко определяемое наличие признаков сознания [1–4]. Пациенты с ХНС ставят перед медициной и обществом множество трудных задач, таких как разработка подходов к социальной адаптации пациентов и поиск методов реабилитации с доказанной эффективностью, что создает широкое поле для исследований в клинической и фундаментальной нейронауке.

В настоящее время большая часть исследований в области ХНС направлена на изучение нейрофизиологических и нейровизуализационных особенностей нарушенного сознания, а также применение различных подходов к восстановлению сознания, среди которых наибольшее внимание привлекают методы неинвазивной нейромодуляции, такие как транскраниальная магнитная стимуляция (TMC) и транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) [5]. При этом изучение биохимических изменений нервной ткани отходит на второй план. На сегодняшний день известно большое число нейротрофических факторов, которые участвуют в восстановлении центральной нервной системы (ЦНС) и могут служить маркерами нейропластичности.

В контексте ХНС и восстановления сознания наибольший интерес представляет фактор, выделенный из головного мозга — BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Он известен как один из самых активных нейропротективных факторов и участвует в восстановлении нейронов как в остром периоде повреждения ткани мозга, так и при хронических патологических состояниях [6]. Среди других нейротрофических белков, участвующих в процессах нейропластичности, рассматривают нейротрофин-3 (NT3), нейротрофический фактор, выделенный из глиальных клеток (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF), фактор роста, выделенный из тромбоцитов (platelet derived growth factor, PDGF), и фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF). Как правило, изучение нейротрофических факторов обусловлено поиском возможных способов лечения нейродегенеративных заболеваний [6], но известны и попытки применения их после травматических повреждений нервной ткани [7]. NT3 в основном известен как фактор, стимулирующий процессы нейрогенеза у плода, у взрослых людей он участвует в процессах образования нейронов из стволовых клеток и их регенерации [8]. GDNF повышает выживаемость дофаминергических нейронов, а также мотонейронов, в связи с чем его тоже считают фактором, способствующим восстановлению нервной ткани [9]. PDGF является фактором роста тромбоцитов, поэтому широко известен благодаря своему влиянию на ангиогенез и мезенхимальные стволовые клетки. Кроме этого, PDGF стимулирует активность глиальных клеток, в частности, олигодендроцитов, что влияет на функционирование нейронов и их восстановление [10]. NGF стимулирует рост и восстановление нейронов [6]. Другим потенциально интересным белком может стать маркер повреждения нервной ткани — нейронспецифичная енолаза (NSE). NSE

традиционно исследуют в контексте острых ситуаций (острой черепно-мозговой травмы, остановки сердца), и на сегодняшний день показана прогностическая точность изменений уровня NSE в остром периоде повреждения головного мозга как для дальнейшего восстановления сознания, так и при смерти мозга [11, 12].

На сегодняшний день исследований уровней нейротрофических факторов у пациентов с ХНС крайне мало, неизвестно потенциальное влияние этих факторов на восстановление сознания. Как уже упоминалось выше, одним из важных направлений реабилитации таких пациентов является неинвазивная стимуляция головного мозга, в частности TMC. В ряде исследований показаны изменения уровней BDNF, NT3, GDNF и PDGF в плазме пациентов после проведения TMC, что может быть интересным в плане изучения процессов восстановления поврежденной нервной ткани [13–15].

В целом, на сегодняшний день прогностическая ценность биохимических маркеров при ХНС остается недостаточно изученной, так же как и их корреляции с процессами восстановления. Целью данной работы было изучить уровни нейротрофических факторов в крови и ликворе пациентов с ХНС и динамику их изменения на фоне применения курса ритмической TMC (pTMC).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критерии включения пациентов в исследование: возраст старше 18 лет; стабильная клиническая картина ХНС (вегетативное состояние или состояние минимального сознания); в сроках не менее трех месяцев при нетравматическом поражении головного мозга (постгипоксической, последствий инфекций ЦНС, последствий ОНМК и др.) или не менее 12 месяцев после черепно-мозговой травмы (ЧМТ); стабильное соматическое состояние; отсутствие инфекционных осложнений, недостаточности функций органов и систем, противопоказаний к проведению pTMC. Для обеспечения безопасности проведения pTMC у пациентов с органическим повреждением ЦНС проводился скрининг ЭЭГ [16]. Критерий исключения: обнаружение эпилептиформной активности при ЭЭГ.

При поступлении пациента проводили осмотр с применением валидированной на русский язык шкалы Coma Recovery Scale — Revised (CRS-R) [17], пункцию вены для получения крови и люмбальную пункцию по стандартному протоколу для получения ликвора, после чего выполняли курс высокочастотной pTMC левой ангулярной извилины [18]. Пациенты получали стандартные реабилитационные процедуры, в том числе занятия лечебной гимнастикой, массаж и вертикализацию. После проведения курса pTMC пациентов снова оценивали по шкале CRS-R и повторно производили сбор образцов сыворотки крови и ликвора в течение суток после последней сессии pTMC.

После сбора образцов биоматериалов кровь центрифугировали для получения сыворотки, далее сыворотку и ликвор замораживали при -71°C . Исследовали уровни BDNF, NSE, NGF, PDGF, GDNF, NT3. Определение проводили твердофазным иммуноферментным методом (ELISA) сэндвич-типа. Использовали наборы реагентов R&D Systems (США, Китай), «Вектор-Бест» (Россия). При всех исследованиях пользовались калибраторами фирм — производителей реагентов. Определение проводили в дублях на плашечном ридере VICTOR 2 (Perkin Elmer; США) с использованием лиофилизированных контрольных

сывороток/плазм с низким и высоким содержанием исследуемых параметров.

В контрольную группу вошли здоровые добровольцы, у которых брали образцы сыворотки крови.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием SPSS Statistics v23. Межгрупповое сравнение уровней биомаркеров проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, при сравнении значимости изменений после курса рТМС — с помощью парного *W*-критерия Уилкоксона (гипотезу о различиях между группами принимали при $p < 0,05$). Количественные данные представлены в виде медианы и квартилей (Me [LQ, UQ]).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 26 пациентов и 21 здоровый доброволец. Демографические характеристики и структура диагнозов включенных в исследование пациентов представлены в табл. 1. Соотношение здоровых добровольцев по полу составило (М/Ж) — 8/13, средний возраст составил 30 [27; 36] лет. При сравнении с выборкой пациентов статистически значимых различий по полу и возрасту выявлено не было.

Полученные результаты анализов крови и ликвора представлены в табл. 2 и 3. Согласно результатам, при сравнении общих исходных данных по уровням исследованных биомаркеров в крови у пациентов и здоровых добровольцев оказалось, что уровни BDNF, NSE, PDGF, GDNF, NT3 статистически значимо выше у пациентов с ХНС, нежели у здоровых добровольцев, а уровни NGF не различаются.

При сравнении уровней биомаркеров в группах оказалось, что концентрации BDNF, NSE, NGF, PDGF, GDNF, NT3 в сыворотке крови статистически значимо не различались ни при сравнении между группами ВС и СМС, ни при сравнении групп в зависимости от этиологии.

При анализе уровней биомаркеров в ликворе оказалось, что у пациентов с последствиями ЧМТ уровень BDNF статистически значимо выше, чем в группе с нетравматической этиологией ХНС. Уровни других исследованных маркеров в ликворе не различались между группами.

Далее нами был проведен анализ уровней биомаркеров в крови и ликворе до и после курса рТМС. Из набранной группы пациентов удалось получить образцы до и после рТМС только у 21 человека. Причиной был отзыв информированного согласия родственников, отказ от проведения повторной люмбальной пункции либо невозможность завершить полный курс рТМС. Среди пациентов было диагностировано ВС у 11, СМС — у 10

человек. В восьми случаях причиной ХНС была ЧМТ, нетравматическая природа ХНС отмечена в 13 случаях. При анализе однородности полученных выборок различия между оценкой по CRS-R до курса ТМС в группах по форме ХНС (ВС и СМС) и по этиологии обнаружено не было. Пациенты в группе посттравматических ХНС оказались статистически значимо более молодыми. По остальным показателям группы значимо друг от друга не отличались.

При анализе динамики уровней биомаркеров в сыворотке крови и ликворе после применения курса ТМС не было обнаружено статистически значимых изменений в общей выборке и при сравнении отдельно групп ВС и СМС, травматических и нетравматических ХНС. Но при этом у пациентов после ЧМТ было выявлено статистически значимое повышение BDNF в ликворе после проведения рТМС (рисунок).

После курса рТМС в группе пациентов с СМС было отмечено клиническое улучшение: оценка по CRS-R увеличилась в среднем на 2,1 балла независимо от этиологии, в группе ВС улучшений не было (подробное описание клинических результатов представлено в работе [18]). При анализе уровней биомаркеров до курса ТМС и сравнения их изменения с изменением оценки по CRS-R значимых корреляций выявлено не было.

Таким образом, показано, что у пациентов с ХНС в результате ЧМТ концентрация BDNF в ликворе значимо выше, нежели при ХНС нетравматической этиологии, и она повышается после курса рТМС в данной группе. Концентрации других исследованных биомаркеров в ликворе и сыворотке крови (NSE, NGF, PDGF, GDNF и NT3) не различались как в группах пациентов, так и после проведенного курса рТМС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение биохимических маркеров повреждения и восстановления центральной нервной системы может способствовать более глубокому пониманию этих процессов.

В нашем исследовании были измерены уровни BDNF, NSE, NGF, PDGF, GDNF, NT3. Выявлено, что у пациентов с посттравматическим ХНС концентрация BDNF в ликворе значимо выше, нежели при ХНС нетравматической этиологии, и она повышается после курса рТМС в данной группе. При сравнении концентрации факторов в крови пациентов и здоровых добровольцев оказалось, что все факторы, кроме NGF, были статистически значимо выше в группе пациентов, что говорит о длительно существующем повреждении нервной ткани и протекающих восстановительных процессах.

Таблица 1. Исходные характеристики пациентов, включенных в исследование биохимических маркеров при ХНС

Параметр	Общая группа ХНС	Форма ХНС			Этиология ХНС		
		ВС	СМС	<i>p</i>	ЧМТ	Нетравм.	<i>p</i>
Вид ХНС (ВС/СМС)	26	14	12		10	16	0,02
Возраст, лет	27 [23; 41]	25 [23; 33]	29 [24; 44]	0,86	24 [21; 25]	33 [25; 47]	0,01
Пол (М/Ж)	16/10	7/7	9/3	0,05	7/3	7/7	0,18
Этиология (ЧМТ/нетравм.)	10/16	3/11	7/5	0,06	10	16	
Время с момента повреждения головного мозга, месяцы	12 [8; 22]	12 [8; 19]	14 [9; 23]	0,63	14 [12; 21]	12 [7; 22]	0,7
Оценка по CRS-R до рТМС	7 [6; 11,75]	6 [6; 6]	13 [10; 17]	<0,01	12 [7; 15]	6 [6; 9]	0,03

Примечание: ВС — вегетативное состояние, нетравм. — нетравматическая, СМС — состояние минимального сознания, ХНС — хроническое нарушение сознания, ЧМТ — черепно-мозговая травма.

Таблица 2. Биомаркеры в сыворотке крови у пациентов с ХНС и здоровых добровольцев

Биомаркер	Общая группа			Форма ХНС			Этиология ХНС		
	ХНС, n = 26	Здоровые, n = 21	p	ВС, n = 14	СМС, n = 12	p	ЧМТ, n = 10	Нетравм., n = 16	p
BDNF, пг/мл	770 [640; 950]	54 [40; 62]	< 0,01	800 [510; 1010]	770 [675; 915]	1	750 [645; 875]	820 [560; 980]	0,9
NSE, нг/мл	53 [30; 64]	10 [9; 13]	< 0,01	40 [28; 54]	61 [51; 71]	0,13	55 [30; 63]	52 [30; 62]	0,86
NGF, пг/мл	222 [145; 267]	128 [103; 211]	0,54	219 [103; 261]	229 [184; 282]	0,35	229 [186; 260]	219 [144; 313]	1
PDGF, пг/мл	223 [200; 267]	72 [64; 90]	< 0,01	243 [191; 282]	213 [200; 246]	0,86	205 [200; 239]	235 [198; 289]	0,45
GDNF, пг/мл	5,3 [3,7; 6,4]	1,1 [1; 1,5]	< 0,01	4,6 [3,6; 5,7]	5,8 [4,1; 6,5]	0,3	5,8 [4,5; 6,4]	4,6 [3,6; 5,9]	0,39
NT 3, пг/мл	365 [329; 504]	89 [69; 103]	< 0,01	360 [322; 472]	388 [356; 518]	0,43	388 [332; 524]	362 [339; 491]	0,78

Примечание: ВС — вегетативное состояние, нетравм. — нетравматическая, СМС — состояние минимального сознания, ХНС — хроническое нарушение сознания, ЧМТ — черепно-мозговая травма.

Таблица 3. Биомаркеры в ликворе у пациентов с ХНС

Биомаркер	Общая группа ХНС, n = 26	Форма ХНС			Этиология ХНС		
		ВС, n = 14	СМС, n = 12	p	ЧМТ, n = 10	Нетравм., n = 16	p
BDNF, нг/мл	18 [11; 30]	14 [11; 31]	21 [12; 27]	0,49	28 [21; 38]	13 [11; 20]	0,04
NSE, нг/мл	96 [81; 131]	95 [78; 104]	98 [90; 156]	0,27	110 [94; 154]	95 [79; 101]	0,2
NGF, нг/мл	178 [137; 233]	178 [120; 210]	189 [143; 242]	0,53	177 [137; 233]	178 [144; 219]	0,82
GDNF, пг/мл	170 [135; 250]	160 [135; 240]	193 [140; 258]	0,56	235 [158; 261]	145 [123; 215]	0,17
NT 3, нг/мл	163 [111; 215]	145 [110; 199]	195 [145; 240]	0,19	195 [128; 219]	153 [110; 211]	0,34

Примечание: ВС — вегетативное состояние, нетравм. — нетравматическая, СМС — состояние минимального сознания, ХНС — хроническое нарушение сознания, ЧМТ — черепно-мозговая травма.

В данном контексте нужно понимать, что, вероятно, на синтез и уровень нейротрофических белков у пациентов с тяжелым повреждением ЦНС влияют и непосредственная причина заболевания, его длительность и возраст пациентов, поэтому для такой гетерогенной группы, какую представляют собой пациенты с ХНС, достаточно трудно получить какие-то однородные показатели. Тем не менее можно предполагать, что тотальное повреждение головного мозга и механизмы восстановления нервной ткани у всех пациентов с ХНС будут схожими.

Известно, что нейротрофины в нервной системе участвуют в процессах выживания нейронов и их восстановления [6], поэтому у пациентов с грубым повреждением нервной ткани выявляется их повышение, которое связывают с повреждением гематоэнцефалического барьера и которое может свидетельствовать об их нейропротективной роли [19–21]. При анализе пациентов в группах статистически значимые различия обнаружены только для концентрации BDNF в ликворе. Для остальных исследованных факторов не было показано значимых различий как между ВС и СМС, пациентами с травматической и нетравматической этиологией заболевания, так и до и после курса рТМС.

Что касается BDNF, то в литературе широко обсуждают его роль как нейропротективного фактора, способствующего восстановлению нервной ткани. Так, идет активное изучение его роли в восстановлении поврежденного спинного мозга, описано повышение его уровня после травматического повреждения [22, 23]. В экспериментах на крысах были сделаны попытки восстановления спинного мозга путем введения BDNF в место травмы [7]. Описано также повышение BDNF, пропорциональное тяжести пареза после инсульта [21]; в другом исследовании описано его увеличение после ЧМТ средней степени тяжести, пропорциональное неврологическому дефициту [19]. Интересные данные опубликованы о пациентах в критическом состоянии, не имеющих повреждений головного мозга: описано

повышение BDNF, которое не коррелировало с другими нейротрофинами, как и в нашем случае [24]. Авторами было сделано заключение о связи повышения данного маркера с летальностью пациентов. В другом исследовании пациентов после ЧМТ был сделан противоположный вывод — авторы не получили никакой связи между тяжестью травмы и уровнем BDNF [25].

Таким образом, данные литературы содержат противоречивые сведения о роли BDNF и изменении его уровня при разных заболеваниях. В отличие от других исследований, мы обнаружили изменение концентрации данного фактора в ликворе, а не в сыворотке крови. Этот факт может говорить о том, что у наших пациентов в хронических сроках уже восстановился гематоэнцефалический барьер, но процессы нейропластичности продолжают идти. Интересен факт, что изменения наиболее активны у пациентов после ЧМТ. Это может быть вызвано несколькими факторами. Во-первых, восстановительный период у посттравматических пациентов проходит дольше, поэтому срок, после которого нарушение сознания считают хроническим, в случае ЧМТ составляет 12 месяцев, а в случае нетравматического ХНС — три месяца [3]. Во-вторых, известно, что прогноз для восстановления у этих пациентов также более благоприятный, нежели после гипоксии [26]. Поэтому можно предполагать, что процессы восстановления протекают более активно и продолжительно, на что косвенно указывают наши результаты. Интересно, что среди пациентов из группы ЧМТ у трех человек было диагностировано ВС, а у восьми — СМС. На первый взгляд, логично предположить, что повышение уровня BDNF и связанные с ним восстановительные процессы выявлены в группе ЧМТ именно из-за большей представленности в ней пациентов с СМС, но сравнение групп ВС/КАБ и СМС в нашей популяции не показало различий в концентрации BDNF, поэтому можно сделать вывод о том, что именно этиология, а не форма ХНС, обуславливает более высокий уровень BDNF в ликворе.

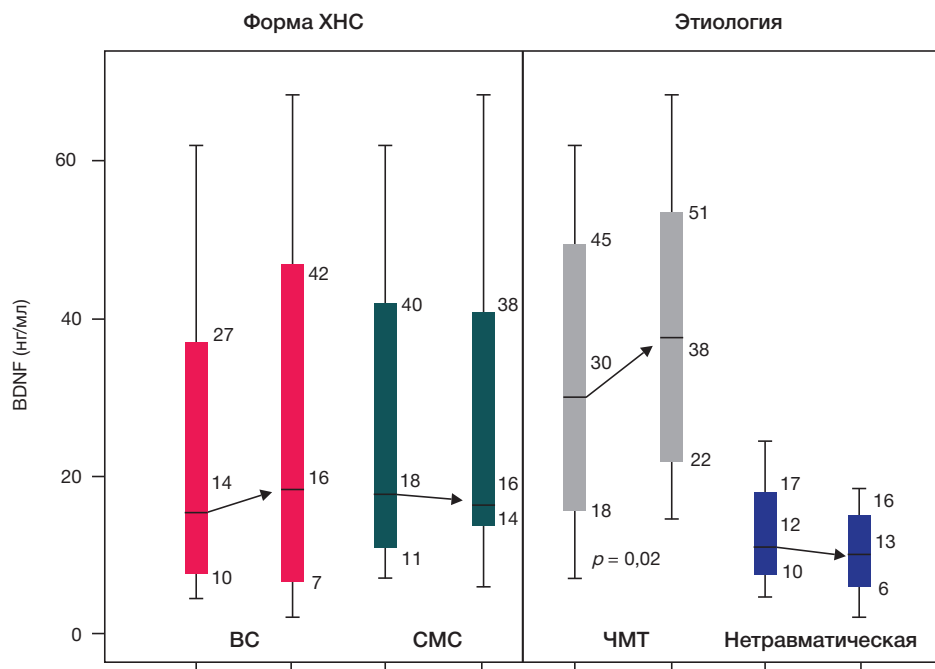


Рис. Изменение уровня BDNF после курса рТМС в ликворе у пациентов с ХНС по группам в зависимости от формы и этиологии. BC — вегетативное состояние, CMC — состояние минимального сознания, ХНС — хроническое нарушение сознания, ЧМТ — черепно-мозговая травма

Выявленные изменения уровня BDNF после курса рТМС представляют особый интерес. В литературе существуют противоречивые сведения об этом явлении: описаны повышение уровня BDNF в плазме крови после проведения рТМС [27, 28], повышение уровня мРНК BDNF в гиппокампе и париетальной коре при курсовом длительном применении рТМС [29]. Считается, что магнитное поле высокочастотной рТМС может стимулировать активность глутаматергических рецепторов и запускать синтез BDNF, а низкочастотная рТМС, наоборот, ингибирует его [30]. Тем не менее проведенный метаанализ работ, касающихся изменения уровня BDNF при применении рТМС, показал противоречивые результаты [30]. Авторы отмечают, что изменение уровня BDNF может быть также связано с этиологией заболевания и возрастом пациентов, поэтому данный биомаркер, несомненно, требует более подробных исследований.

В нашем случае было зарегистрировано повышение концентрации BDNF в ликворе после курса рТМС только у пациентов с посттравматическим ХНС. Учитывая нейропротективные свойства этого белка, данный факт можно связать с механизмами, лежащими в основе более выраженного восстановления, характерного для пациентов после ЧМТ.

В числе ограничений исследования необходимо отметить небольшой размер группы пациентов, а также отсутствие контрольной группы здоровых добровольцев для оценки концентрации нейротрофических факторов в ликворе. Для получения более точных результатов, особенно для группового сравнения, необходимо

дальнейшее изучение нейротрофинов с включением большего количества пациентов.

ВЫВОДЫ

В результате изучения концентраций нейротрофических факторов у пациентов с тяжелым повреждением головного мозга было показано, что уровень BDNF, NSE, PDGF, GDNF, NT3 в сыворотке крови пациентов с ХНС статистически значимо выше, чем у здоровых добровольцев. При этом уровень BDNF в ликворе пациентов с ХНС оказался выше в группе посттравматических больных, и он статистически значимо повышался после проведения курса высокочастотной рТМС в данной группе.

В целом, полученные в проведенной работе данные подтверждают имеющиеся ранее сведения о лучшем восстановлении и более благоприятном прогнозе у пациентов после ЧМТ, чем у пациентов с другой этиологией. Полученные сведения о концентрации нейротрофических факторов в ликворе пациентов с ХНС могут косвенно указывать на то, что процессы нейропластичности даже при тяжелых повреждениях головного мозга на отдаленных сроках продолжают активно происходить. Это можно считать одним из аргументов в сторону рекомендаций проведения реабилитационных мероприятий у пациентов после тяжелой ЧМТ в течение длительного времени, даже при установлении диагноза хронического нарушения сознания, так как потенциал на улучшение у данной группы может сохраняться спустя год и более.

Литература

1. Giacino JT, Ashwal S, Childs N, Cranford R, Jennett B, Katz DI, et al. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. *Neurology*. 2002; 58 (3): 349–53. DOI: 10.1212/WNL.58.3.349.
2. Turner-Stokes L, Wade D, Playford D, Kitzinger J, Allanson J, Pundole A, et al. Prolonged disorders of consciousness guidelines. London, 2020.
3. Giacino JT, Katz DI, Schiff ND, Whyte J, Ashman EJ, Ashwal S, et al. Practice guideline update recommendations summary: Disorders of consciousness. *Neurology*. 2018; 91 (10): 450–60. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005926.

4. Пирадов М. А., Супонева Н. А., Вознюк И. А., Кондратьев А. Н., Щёголев А. В., Белкин А. А., и др. Хронические нарушения сознания: терминология и диагностические критерии. Результаты первого заседания Российской рабочей группы по проблемам хронических нарушений сознания. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2020; 14 (1): 5–16. DOI: 10.25692/ACEN.2020.1.1.
5. Thibaut A, Schiff N, Giacino J, Laureys S, Gosseries O. Therapeutic interventions in patients with prolonged disorders of consciousness. *The Lancet Neurology*. 2019; 18 (6): 600–14. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30031-6.
6. Skaper SD. Neurotrophic factors: An overview. *Methods in Molecular Biology*. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
7. Ye JH, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Experimental Neurology*. 1997. DOI: 10.1006/exnr.1996.6353.
8. Chen Q, Zhou L, Shine HD. Expression of neurotrophin-3 promotes axonal plasticity in the acute but not chronic injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*. 2006. DOI: 10.1089/neu.2006.23.1254.
9. Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2011. DOI: 10.1530/JME-10-0125.
10. Sil S, Periyasamy P, Thangaraj A, Chivero ET, Buch S. PDGF/PDGF-R axis in the neural systems. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.mam.2018.01.006.PMID:29409855.
11. Daubin C, Quentin C, Allouche S, Etard O, Gaillard C, Seguin A, et al. Serum neuron-specific enolase as predictor of outcome in comatose cardiac-arrest survivors: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2011; 11: 48. DOI: 10.1186/1471-2261-11-48.
12. Pfeifer R, Borner A, Krack A, Sigusch HH, Surber R, Figulla HR. Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow Coma Scale. *Resuscitation*. 2005; 65 (1): 49–55. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2004.10.011.
13. Gaede G, Hellweg R, Zimmermann H, Brandt AU, Dorr J, Bellmann-Strobl J, et al. Effects of deep repetitive transcranial magnetic stimulation on brain-derived neurotrophic factor serum concentration in healthy volunteers. *Neuropsychobiology*. 2014; 69 (2): 112–9. DOI: 10.1159/000358088.
14. Lee JY, Park HJ, Kim JH, Cho BP, Cho SR, Kim SH. Effects of low- and high-frequency repetitive magnetic stimulation on neuronal cell proliferation and growth factor expression: A preliminary report. *Neurosci Lett*. 2015; 604: 167–72. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.07.038.
15. Takahashi T. Monoamines, monoamine metabolites, neuron specific enolase and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid of resuscitated patients. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 1997; 17 (1): 7–16.
16. Супонева Н. А., Бакулин И. С., Пойдашева А. Г., Пирадов М. А. Безопасность транскраниальной магнитной стимуляции: обзор международных рекомендаций и новые данные. *Нервно-мышечные болезни*. 2017; 7 (2): 21–36.
17. Iazeva EG, Legostaeva LA, Zimin AA, Sergeev DV, Domashenko MA, Samorukov VY, et al. A Russian validation study of the Coma Recovery Scale-Revised (CRS-R). *Brain Injury*. 2019. DOI: 10.1080/02699052.2018.1539248.
18. Legostaeva L, Poydasheva A, Iazeva E, Sinitsyn D, Sergeev D, Bakulin I, et al. Stimulation of the angular gyrus improves the level of consciousness. *Brain Sciences*. 2019; 9 (5). DOI: 10.3390/brainsci9050103.
19. Каракулова Ю. В., Селянина Н. В. Мониторирование нейротрофических факторов и когнитивных функций у пациентов с черепно-мозговой травмой. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2017; 117 (10): 34–37.
20. Mokhtarzade M, Motl R, Negaresh R, Zimmer P, Khodadoost M, Baker JS, et al. Exercise-induced changes in neurotrophic factors and markers of blood-brain barrier permeability are moderated by weight status in multiple sclerosis. *Neuropeptides*. 2018. DOI: 10.1016/j.npep.2018.05.010.PMID:29880392.
21. King M, Kelly LP, Wallack EM, Hasan SMM, Kirkland MC, Curtis ME, et al. Serum levels of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor as potential recovery biomarkers in stroke. *Neurological Research*. 2019. DOI: 10.1080/01616412.2018.1564451.
22. Xu L, Zhang Y, Zhang R, Zhang H, Song P, Ma T, et al. Elevated plasma BDNF levels are correlated with NK cell activation in patients with traumatic spinal cord injury. *International Immunopharmacology*. 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105722.PMID:31255880.
23. Sasaki M, Radtke C, Tan AM, Zhao P, Hamada H, Houkin K, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2769-09.2009.
24. Ritter C, Miranda AS, Giombelli VR, Tomasi CD, Comim CM, Teixeira AL, et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. *Critical Care*. 2012. DOI: 10.1186/cc11902.
25. Simon D, Do Nascimento RIM, Filho EMR, Bencke J, Regner A. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels after severe traumatic brain injury. *Brain Injury*. 2016. DOI: 10.3109/02699052.2015.1077993.
26. Giacino JT, Katz DI, Schiff ND, Whyte J, Ashman EJ, Ashwal S, et al. Comprehensive systematic review update summary: Disorders of consciousness: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology; The American Congress of Rehabilitation Medicine; and the National Institute on Disability, Independent Living, and Assistive Technology. *Neurology*. 2018; 91 (10): 461–470. DOI: 10.1016/j.apmr.2018.07.002.
27. Yukimasa T, Tamagawa A, Uozumi T, Shinkai K, Ueda N, Tsuji S, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry*. 2006. DOI: 10.1055/s-2006-931542.
28. Zanardini R, Gazzoli A, Ventriglia M, Perez J, Bignotti S, Maria Rossini P, et al. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients. *Journal of Affective Disorders*. 2006. DOI: 10.1016/j.jad.2005.12.029.
29. Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neurotrophin tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2000. DOI: 10.1016/S0893-133X(00)00099-3.
30. Jiang B, He D. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) fails to increase serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurophysiologie Clinique*. 2019; 49 (4): 295–300. DOI: 10.1016/j.neucli.2019.05.068.

References

1. Giacino JT, Ashwal S, Childs N, Cranford R, Jennett B, Katz DI, et al. The minimally conscious state: definition and diagnostic criteria. *Neurology*. 2002; 58 (3): 349–53. DOI: 10.1212/WNL.58.3.349.
2. Turner-Stokes L, Wade D, Playford D, Kitinger J, Allanson J, Pundole A, et al. Prolonged disorders of consciousness guidelines. London, 2020.
3. Giacino JT, Katz DI, Schiff ND, Whyte J, Ashman EJ, Ashwal S, et al. Practice guideline update recommendations summary: Disorders of consciousness. *Neurology*. 2018; 91 (10): 450–60. DOI: 10.1212/WNL.00000000000005926.
4. Piradov MA, Suponeva NA, Vosnyuk IA, Kondratyev AN, Shchegolev AV, Belkin AA, et al. Chronic disorders of consciousness: terminology and diagnostic criteria. The results of the first meeting of the Russian Working Group for Chronic Disorders of Consciousness. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2020; 14 (1): 5–16. DOI: 10.25692/ACEN.2020.1.1.

- Russian.
5. Thibaut A, Schiff N, Giacino J, Laureys S, Gosseries O. Therapeutic interventions in patients with prolonged disorders of consciousness. *The Lancet Neurology*. 2019; 18 (6): 600–14. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30031-6.
6. Skaper SD. Neurotrophic factors: An overview. *Methods in Molecular Biology*. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.
7. Ye JH, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Experimental Neurology*. 1997. DOI: 10.1006/exnr.1996.6353.
8. Chen Q, Zhou L, Shine HD. Expression of neurotrophin-3 promotes axonal plasticity in the acute but not chronic injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*. 2006. DOI: 10.1089/neu.2006.23.1254.
9. Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2011. DOI: 10.1530/JME-10-0125.
10. Sil S, Periyasamy P, Thangaraj A, Chivero ET, Buch S. PDGF/PDGR axis in the neural systems. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018. DOI: 10.1016/j.mam.2018.01.006.PMID:29409855.
11. Daubin C, Quentin C, Allouche S, Etard O, Gaillard C, Seguin A, et al. Serum neuron-specific enolase as predictor of outcome in comatose cardiac-arrest survivors: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2011; 11: 48. DOI: 10.1186/1471-2261-11-48.
12. Pfeifer R, Borner A, Krack A, Sigusch HH, Surber R, Figulla HR. Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow Coma Scale. *Resuscitation*. 2005; 65 (1): 49–55. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2004.10.011.
13. Gaede G, Hellweg R, Zimmermann H, Brandt AU, Dorr J, Bellmann-Strobl J, et al. Effects of deep repetitive transcranial magnetic stimulation on brain-derived neurotrophic factor serum concentration in healthy volunteers. *Neuropsychobiology*. 2014; 69 (2): 112–9. DOI: 10.1159/000358088.
14. Lee JY, Park HJ, Kim JH, Cho BP, Cho SR, Kim SH. Effects of low- and high-frequency repetitive magnetic stimulation on neuronal cell proliferation and growth factor expression: A preliminary report. *Neurosci Lett*. 2015; 604: 167–72. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.07.038.
15. Takahashi T. Monoamines, monoamine metabolites, neuron specific enolase and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid of resuscitated patients. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 1997; 17 (1): 7–16.
16. Suponeva NA, Bakulin IS, Pojdasheva AG, Piradov MA. Bezopasnost' transkraniyal'noy magnitnoy stimulatsii: obzor mezhdunarodnykh rekomendatsiy i novye dannye. *Nervno-myshechnye bolezni*. 2017; 7 (2): 21–36.
17. Iazeva EG, Legostaeva LA, Zimin AA, Sergeev DV, Domashenko MA, Samorukov VY, et al. A Russian validation study of the Coma Recovery Scale-Revised (CRS-R). *Brain Injury*. 2019. DOI: 10.1080/02699052.2018.1539248.
18. Legostaeva L, Poydasheva A, Iazeva E, Sinitsyn D, Sergeev D, Bakulin I, et al. Stimulation of the angular gyrus improves the level of consciousness. *Brain Sciences*. 2019; 9 (5). DOI: 10.3390/brainsci9050103.
19. Karakulova YV, Selyanina NV. Monitoring of neurotrophic factors and cognitive function in patients with traumatic brain injury. *Zh Nevrol Psikhiatr im S. S. Korsakova*. 2017;117(10):34–37. doi:10.17116/jnevro201711710134-37.
20. Mokhtarzade M, Motl R, Negaresh R, Zimmer P, Khodadoost M, Baker JS, et al. Exercise-induced changes in neurotrophic factors and markers of blood-brain barrier permeability are moderated by weight status in multiple sclerosis. *Neuropeptides*. 2018. DOI: 10.1016/j.npep.2018.05.010.PMID:29880392.
21. King M, Kelly LP, Wallack EM, Hasan SMM, Kirkland MC, Curtis ME, et al. Serum levels of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor as potential recovery biomarkers in stroke. *Neurological Research*. 2019. DOI: 10.1080/01616412.2018.1564451.
22. Xu L, Zhang Y, Zhang R, Zhang H, Song P, Ma T, et al. Elevated plasma BDNF levels are correlated with NK cell activation in patients with traumatic spinal cord injury. *International Immunopharmacology*. 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105722.PMID:31255880.
23. Sasaki M, Radtke C, Tan AM, Zhao P, Hamada H, Houkin K, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2009. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2769-09.2009.
24. Ritter C, Miranda AS, Giombelli VR, Tomasi CD, Comim CM, Teixeira AL, et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. *Critical Care*. 2012. DOI: 10.1186/cc11902.
25. Simon D, Do Nascimento RIM, Filho EMR, Bencke J, Regner A. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels after severe traumatic brain injury. *Brain Injury*. 2016. DOI: 10.3109/02699052.2015.1077993.
26. Giacino JT, Katz DI, Schiff ND, Whyte J, Ashman EJ, Ashwal S, et al. Comprehensive systematic review update summary: Disorders of consciousness: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology; The American Congress of Rehabilitation Medicine; and the National Institute on Disability, Independent. 2018; 91 (10): 461–470. DOI: 10.1016/j.apmr.2018.07.002.
27. Yukimasa T, Tamagawa A, Uozumi T, Shinkai K, Ueda N, Tsuji S, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry*. 2006. DOI: 10.1055/s-2006-931542.
28. Zanardini R, Gazzoli A, Ventriglia M, Perez J, Bignotti S, Maria Rossini P, et al. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients. *Journal of Affective Disorders*. 2006. DOI: 10.1016/j.jad.2005.12.029.
29. Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2000. DOI: 10.1016/S0893-133X(00)00099-3.
30. Jiang B, He D. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) fails to increase serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurophysiologie Clinique*. 2019; 49 (4): 295–300. DOI: 10.1016/j.neucli.2019.05.068.

ВЛИЯНИЕ РОБОТИЗИРОВАННЫХ ТРЕНИРОВОК НА БИОМЕХАНИКУ ГОЛЕНОСТОПНОГО СУСТАВА У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТИНСУЛЬТНЫМ ПАРЕЗОМ

А. С. Клочков , А. А. Зимин, А. Е. Хижникова, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Ключевым фактором нарушений походки после острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) является нарушение движений в голеностопном суставе (ГС), приводящее к формированию патологической синергии. В настоящее время при роботизированных тренировках ходьбы используют приводы тазобедренного и коленного суставов. Однако по данным литературы нет единого мнения об их влиянии на движения в ГС. Целью исследования было изучить влияние роботизированных тренировок ходьбы на движения ГС у пациентов с постинсультным парезом. В исследовании приняло участие 22 пациента с ОНМК полушарной локализации. Для оценки двигательной функции применяли клинические шкалы и видеоанализ ходьбы. Всем пациентам проводили курс из 11 роботизированных тренировок ходьбы. На фоне тренировок выявлено увеличение общего балла по шкале Фугл-Майера со 146,5 до 152 баллов ($p < 0,05$) и отдельно для нижней конечности с 18 до 20,5 баллов ($p < 0,05$), а также снижение мышечного тонуса разгибателей ГС с 2,5 до 2,0 баллов по модифицированной шкале Эшворта ($p < 0,05$). На фоне роботизированных тренировок отмечено увеличение длительности фазы опоры пациентов с 28,0 до 33,5% от цикла шага (ЦШ). Кроме того, основным различием структуры ЦШ до и после курса тренировок стало наличие трех частей шага вместо пяти, что подтверждает консолидацию гониограмм пациентов в периоде от 1 до 61% ЦШ. Сравнение значений углов до и после показало достоверные различия только по межквартильному интервалу ($p < 0,05$). Авторы пришли к выводу, что роботизированные тренировки с применением активных приводов для тазобедренного и коленного суставов опосредованно способствуют изменениям кинематических параметров ГС за счет приближения показателей паттерна к некоему усредненному шаблону движений.

Ключевые слова: инсульт, нейрореабилитация, нарушения ходьбы, роботизированная терапия, биомеханика движений, видеоанализ движений

Финансирование: в рамках государственной НИР.

Вклад авторов: А. С. Клочков — планирование исследования, набор пациентов, проведение исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Зимин — статистическая обработка, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. Е. Хижникова — анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи; Н. А. Супонева, М. А. Пирадов — подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 14/09 от 23 декабря 2009 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Антон Сергеевич Клочков
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; klochkov@neurology.ru

Статья получена: 28.09.2020 **Статья принята к печати:** 14.10.2020 **Опубликована онлайн:** 29.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.066

EFFECT OF ROBOT-ASSISTED GAIT TRAINING ON BIOMECHANICS OF ANKLE JOINT IN PATIENTS WITH POST-STROKE HEMIPARESIS

Klochkov AS , Zimin AA, Khizhnikova AE, Suponeva NA, Piradov MA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The key factor promoting post-stroke gait disturbances is motor impairment of the ankle joint (AJ) which results in pathological synergies. Robotic devices used for gait training are equipped with hip and knee joint actuators. However, there is no consensus in the literature on their effect on AJ movements. The aim of this study was to investigate the effect of robot-assisted gait training on AJ movements in patients with post-stroke paresis. The study recruited 22 hemispheric stroke survivors. They motor function was assessed using clinical scales and motion capture analysis. All patients received 11 robot-assisted gait training session. After rehabilitation, the total score on the Fugl-Meyer Assessment scale increased from 146.5 to 152 points ($p < 0.05$); for the lower limb, the score increased from 18 to 20.5 points ($p < 0.05$). The muscle tone of ankle extensors decreased from 2.5 to 2.0 points on the modified Ashworth scale ($p < 0.05$). The duration of the stance phase increased from 28.0 to 33.5% relative to the total gait cycle (GC). The main difference in the GC structure before and after rehabilitation is the presence of 3 GC parts instead of 5, suggesting consolidation of patients' goniograms at 1-61% of GC. Comparison of joint angles before and after rehabilitation revealed that only the interquartile ranges (IR) were different ($p < 0.05$). The authors conclude that robot-assisted training with knee and hip joint actuators indirectly affects the kinematic parameters of AJ by promoting a shift towards the average gait kinematics.

Keywords: stroke, neurorehabilitation, adaptation, gait disturbances, robot-assisted therapy, movement biomechanics, motion analysis

Funding: this study was state-funded.

Author contribution: Klochkov AS — study planning, patient recruitment, literature analysis, data interpretation, manuscript preparation; Zimin AA — statistical analysis, data interpretation, manuscript preparation; Khizhnikova AE — literature analysis, data interpretation, manuscript preparation; Suponeva NA, Piradov MA — manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (Protocol № 14/09 dated December 23, 2009). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton S. Klochkov
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; klochkov@neurology.ru

Received: 28.09.2020 **Accepted:** 14.10.2020 **Published online:** 29.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.066

Нарушение функции ходьбы — одно из наиболее инвалидизирующих последствий острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) [1, 2]. До внедрения роботизированных тренировок в рутинную практику после курса реабилитации более 30% пациентов могли

ходить только с постоянной опорой или оставались обездвиженными [3]. Последние исследования показали, что включение в реабилитацию электромеханических устройств для локомоторных тренировок значительно повышает шансы на восстановление независимой ходьбы

[4]. По мнению многих авторов, нарушение биомеханики движений голеностопного сустава является ключевым фактором нарушения стереотипа ходьбы, приводящим к изменениям движений таза, корпуса и тазобедренного сустава, способствующим большим энергозатратам и негативно влияющим на скорость и качество ходьбы, что приводит к вынужденному формированию компенсаторных синергий [5–8]. Двигательное восстановление пациентов происходит последовательно и компенсаторные стратегии, которые формируются на ранних этапах реабилитации, в дальнейшем закрепляются, и затем под влиянием слабости и спастичности в отдельных мышечных группах приобретают патологический характер [9].

В настоящее время роботизированные тренировки ходьбы являются золотым стандартом восстановления локомоции для пациентов с последствиями инсульта. Данные мета-анализов подтвердили эффективность электромеханических устройств в восстановлении ходьбы, особенно у пациентов, неспособных к самостоятельному передвижению на момент начала тренировок [4, 10]. В современной нейрореабилитации применяют два основных вида роботизированных устройств: экзоскелетные конструкции и эндеффлекторы, устройства, осуществляющие движения посредством фиксации стопы (от англ. *end-effector*). При этом различают два основных вида экзоскелетов — носимые и стационарные. К носимым устройствам относят такие конструкции, как «Экзоатлет», «HAL», «Bionic leg» и др., хорошо зарекомендовавшие себя в клинической реабилитации [11, 12]. В обзор литературы не были включены публикации об использовании мобильных экзоскелетов, в связи с используемым в этой технологии стереотипом ходьбы, отличным от физиологического, а именно локомоторной модели, использующей алгоритм нулевого момента, применяемый в роботизированной локомоции, при которой сумма всех сил направлена в сторону поверхности для обеспечения безопасного передвижения, а следовательно, ограничивающий крутящий момент в голеностопном суставе [13–16]. Несмотря на растущее число мобильных экзоскелетов в рутинной клинической практике чаще используют стационарные экзоскелетные устройства «Lokomat», «ReoGo» и др. На сегодняшний день для восстановления ходьбы после инсульта доказана клиническая эффективность как экзоскелетных, так и эндеффлекторных типов устройств, и недостаточность данных о преимуществах воздействия на биомеханику движений какого-либо из них [17, 18]. Исследования показывают, что при тренировках на системах эндеффлекторного типа основные изменения происходят в силовых и кинетических характеристиках голеностопного сустава, а также объеме движений коленного сустава и ассоциированы с улучшениями степени мобильности, скорости и симметрии ходьбы [19, 20]. Преимущество стационарных экзоскелетов заключается в точном контроле над биомеханикой совершаемого и ассистированного движений, что позволяет гарантировать физиологичность тренируемого двигательного паттерна и возможность коррекции патологического стереотипа ходьбы [21].

Авторы расходятся во мнениях о механизме воздействия роботизированных устройств с активной тренировкой тазобедренного и коленного суставов на изменения биомеханики голеностопного сустава, который активно в тренировке обычно не участвует. В ранних работах, посвященных воздействию на биомеханику произвольных движений при ходьбе, тренировок в экзоскелете с обратной связью и роботизированной ассистенцией, было

показано, что кинематика тазобедренного и коленного суставов практически не отличается от физиологической — «навязываемой» приводами робота, в то время как паттерн угловых скоростей в суставах не изменяется и остается патологическим, что косвенно подтверждает неспособность навязанного роботом стереотипа ходьбы подавить собственный стереотип движений пациента [22].

Необходимость роботизированной тренировки всех суставов, включая голеностопный, а также гипотезы о преимуществе роботизированных воздействий на проксимальные или дистальные суставы ноги являются частым предметом дискуссий. В настоящее время существуют серийные модели экзоскелетов с роботизированным приводом для голеностопного сустава. Однако они менее распространены, чем модели с приводами для тазобедренного и коленного суставов и имеют ряд недостатков. В целом, нет единого мнения о том, нужно ли в роботизированные устройства для тренировки ходьбы добавлять активный привод голеностопного сустава и достаточно ли для коррекции стереотипа ходьбы воздействовать только на проксимальные отделы паретичной ноги.

В то же время известно, что локомоторные движения обладают высокой степенью автоматизма и синергичности, и логично предположить, что тренировка с коррекцией паттерна посредством биологической обратной связи (БОС) и роботизированной ассистенции лишь части движений, входящих в состав синергии, оказывает опосредованное воздействие не только на компоненты, активно тренируемые с помощью робота и БОС, но и на те, что непосредственно в этом движении не участвуют.

Таким образом, целью настоящего исследования было изучить возможность опосредованной коррекции движений голеностопного сустава, с помощью тренировки с навязанным стереотипом движений коленного и тазобедренного суставов при постинсультном парезе.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании, проведенном с 2010 по 2017 г., приняли участие 22 пациента (18 мужчин и 4 женщины) с последствиями подтвержденного нарушения мозгового кровообращения полушарной локализации. Медиана возраста составила 50,5 года (41; 56,5), медиана давности инсульта — 6,0 лет (2,8; 12,9). Подробная характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Критерии включения пациентов в исследование: наличие первичного нарушения мозгового кровообращения полушарной локализации; наличие гемипареза; нарушение ходьбы.

Критерии исключения (противопоказания к тренировкам на системе «Lokomat»): вес пациента меньше 50 и больше 135 кг; рост пациента меньше 160 и больше 185 см; наличие контрактур нижних конечностей; незаживающие поражения кожи нижних конечностей и торса; ортостатическая гипотензия; тяжелая кардиальная патология; тяжелые когнитивные расстройства; искусственная вентиляция легких; сопутствующие заболевания и поражения опорно-двигательного аппарата (в том числе асимметрия длины ног, превышающая 3 см); тромбозы вен нижних конечностей; артродез тазобедренного, коленного или голеностопного суставов; остеопороз и несросшиеся переломы костей ног; предписанный постельный режим.

Пациентам проводили курс тренировок ходьбы в комплексе с частичной разгрузкой веса и активными

Таблица 1. Характеристика пациентов

Пол		Тип инсульта		Сторона		Локализация очага	
Мужчины	18 (82%)	Ишемический	16 (72,7%)	Правая	13 (59,1%)	Корково-подкорковая	8 (36,4%)
Женщины	4 (18%)	Геморрагический	6 (27,3%)	Левая	9 (40,9%)	Глубокие отделы	14 (63,6%)

роботизированными приводами для сгибания/разгибания тазобедренного и коленного суставов и пассивной поддержкой стопы «Lokomat» (Hocoma; Швейцария). Курс состоял из 11 тренировок, из которых первая включала 15 мин, необходимых для настройки экзоскелета и стереотипа ходьбы, и 30 мин активной ходьбы со сниженной интенсивностью для адаптации пациента к роботизированному паттерну. Последующие 10 сессий включали 45 мин тренировки ходьбы. Все тренировки проводили в формате индивидуальных занятий с инструктором-методистом, с индивидуально подбираемой комфортной для пациента скоростью ходьбы и биологической обратной связью по данным потенциометров тазобедренного и коленного суставов, интегрированных в конструкцию экзоскелета. Разгрузку веса тела подбирали индивидуально для каждого пациента и меняли во время каждой тренировки для обеспечения ходьбы с минимально возможным весом разгрузки, не допуская спотыкания пациента. Поддержку стопы против провисания осуществляли с помощью пружинных тяг, крепящихся в области дистальной части плюсны, что также предусмотрено конструкцией устройства «Lokomat». Степень натяжения пружин инструктор подбирал индивидуально во время каждой тренировки для обеспечения ассистенции произвольному усилию пациента при тыльном сгибании стопы.

Биологическую обратную связь реализовывали следующим образом: во время тренировок пациентам демонстрировали графики степени активности и синхронизации тазобедренных и коленных суставов с физиологическими движениями экзоскелета. Задачей пациентов во время тренировки было совершать активные движения в тазобедренном и коленном суставах синхронно с движениями экзоскелета, при этом на графиках БОС отображались активные движения пациента (при отсутствии активных движений или при несинхронном с экзоскелетом движении графически отображаемые значения уменьшались). Всем пациентам помимо роботизированных тренировок проводили курс массажа паретичных конечностей, а также занятия с инструктором ЛФК (10 занятий по 30 мин), направленные на восстановление функции руки, равновесия и ходьбы; в течение часа до и после тренировок на «Lokomat» никаких реабилитационных процедур пациентам не проводили.

Клиническую оценку эффективности проводимого курса реабилитации с использованием роботизированного экзоскелета проводили до начала курса тренировок и на следующий день после его окончания. Применяли валидированные русскоязычные версии шкалы Фугл-Мейера (ШФМ), модифицированной шкалы Эшворта (МШЭ), по которой оценивали спастичность икроножной и камбаловидной мышц, а также модифицированную шкалу Рэнкина (modified Rankin scale, MRS) и шкалу функциональных амбулаторных категорий (functional ambulation categories, FAC) [23, 24].

Оценку биомеханики ходьбы проводили с помощью системы видеоанализа движений («Биософт-3Д»; Россия) [25, 26].

Для фиксации движений использовали световозвращающие маркеры и две синхронизированные цифровые камеры с инфракрасной подсветкой маркеров. Регистрацию проводили в течение 30 с во время двухминутной сессии ходьбы на беговой дорожке с комфортной для пациента скоростью до и после курса тренировок. Световозвращающие маркеры диаметром 2 см располагались с латеральной стороны тела в области проекции центров вращения в суставах: на уровне ключовидного отростка, в области проекции наиболее выступающей части большого вертела, над нижним краем латеральной лодыжки, пятке, а также на дистальной части стопы в области головки пятой плюсневой кости. Кинематические параметры локомоций рассчитывали в оси координат x, y, z . Ось z — вертикаль, ось y — продольная ось, направлена справа налево; ось x — поперечная ось. Регистрировали следующие кинематические параметры:

- координаты маркеров в системе координат x, y, z и траектории их перемещения;
- углы наклона звеньев тела к осям x, y, z ;
- межзвенные углы.

Для сглаживания применяли низкочастотный фильтр Баттерворта 2-го порядка. Кинематические параметры вычисляли на основе данных трехмерных координат маркеров и составляемой кинетогаммой модели тела человека. В качестве первично оцениваемых с помощью видеоанализа параметров использовали временные параметры шага (длительность фаз опоры и переноса), которые размечали на основании локального максимума вертикального ускорения маркеров, расположенных на латеральной лодыжке и на пятке, а также локального максимума горизонтального ускорения маркера в области головки пятой плюсневой кости. Также в качестве первичных кинематических параметров были выбраны (амплитуды и максимумы углов и угловых скоростей в сагиттальной плоскости голеностопного сустава). Для вторичного анализа использовали кластерный анализ и непараметрический анализ десятипроцентильных интервалов. Метод кластерного анализа широко применяют для изучения ходьбы в целом и цикла шага, в частности, как у здоровых, так и у лиц, страдающих различными заболеваниями [27–35]. В данной работе кластерный анализ использовали для определения структуры цикла шага, а также сравнения полученных характеристик до и после тренировок.

Непараметрический анализ десятипроцентильных интервалов цикла шага проводили для более детального изучения его характеристик и последующего сравнения до и после тренировок.

В соответствии с характеристикой данных их статистическую обработку проводили с помощью непараметрических методов: критериев Манна-Уитни (при сравнении независимых выборок) и Уилкоксона (при сравнении зависимых выборок). При проведении множественных сравнений применяли поправку Бонферони. Анализ качественных величин выполняли с помощью точного критерия Фишера. Для выявления структуры данных применяли кластерный анализ. В

частности, для разделения цикла шага на части, а также для распределения пациентов на подгруппы использовали кластерный анализ по методу Уорда с последующим сравнением подгрупп по критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферони. С целью определения взаимосвязей рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Описательную статистику результатов представляли в виде медианы, а также нижнего и верхнего квартилей. Пороговым уровнем статистической достоверности считали $p < 0,05$. Анализ данных проводили на персональном компьютере с применением пакета прикладных программ Statistica v. 7.0 (StatSoft Inc; Россия) и SPSS 22 (IBM; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая оценка эффективности проводимого курса реабилитации

Анализ клинических данных показал улучшение мобильности на фоне тренировок, а также незначительное, но достоверное увеличение объема активных движений и функции нижней конечности и снижение спастичности в икроножной и камбаловидной мышцах у всех пациентов при сохранении исходного уровня инвалидизации по шкале Рэнкина. Увеличился также процент пациентов, способных к самостоятельному передвижению без посторонней помощи, что соответствует 3-й, 4-й и 5-й категориям при

оценке функциональных амбулаторных категорий (FAC) (рис. 1).

На фоне тренировок было отмечено увеличение активных движений и по ШФМ. Общий балл двигательной активности возрос с 146,5 (128; 163,5) до 152 (134,3; 176,8) ($p < 0,05$) и отдельно для нижней конечности с 18 (16; 21) до 20,5 (18; 24,3) ($p < 0,05$).

Статистический анализ изменений мышечного тонуса комплекса икроножной и камбаловидной мышц показал достоверное снижение с 2,5 (1; 3) до 2,0 (0; 2) баллов по МШЭ ($p < 0,05$). Подробное распределение показателей мышечного тонуса пациентов представлено на рис. 2.

Результаты оценки биомеханики ходьбы

На фоне проводимого реабилитационного курса с тренировками в роботизированном экзоскелете отмечено изменение пространственно-временных показателей шага: у пациентов увеличилась ($p = 0,0001$) длительность фазы опоры с 28,0% (25; 36) до 33,5% (30; 42) от цикла шага (ЦШ).

При анализе кинематических показателей не было выявлено достоверных различий максимальных показателей сгибания и разгибания голеностопного сустава во время цикла шага на фоне курса тренировок. Максимальные значения амплитуды углов до и после тренировок составили 59,12° и 45,30° соответственно

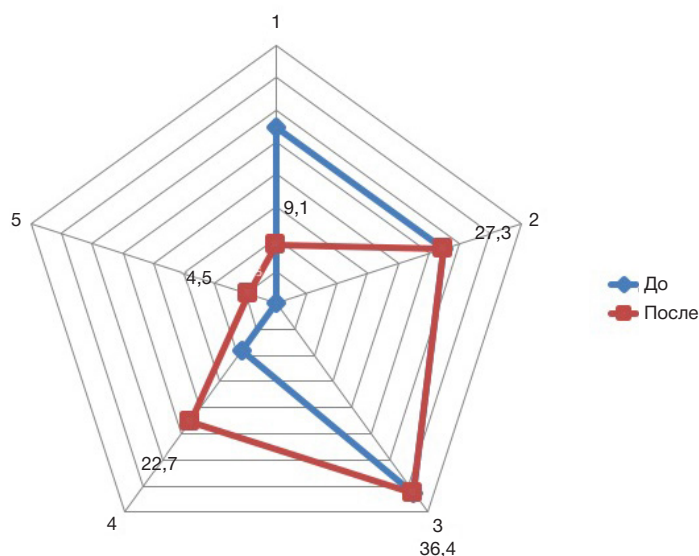


Рис. 1. Перераспределение пациентов в соответствии с амбулаторными категориями (FAC) на фоне курса тренировок

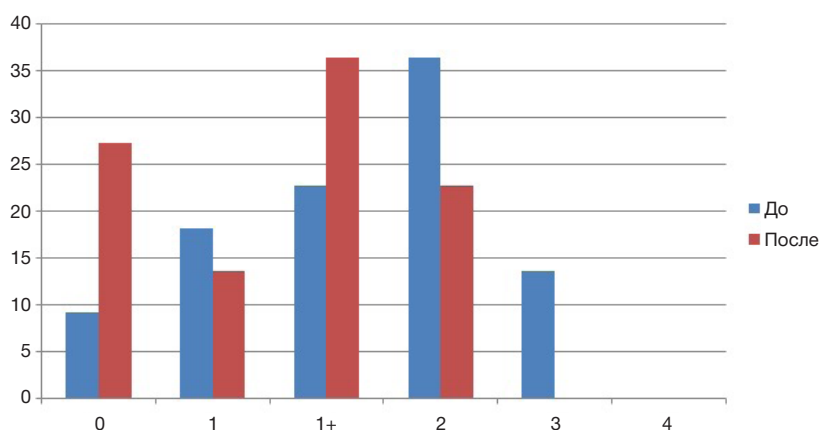


Рис. 2. Распределение доли пациентов в соответствии с баллами по модифицированной шкале Эшворта

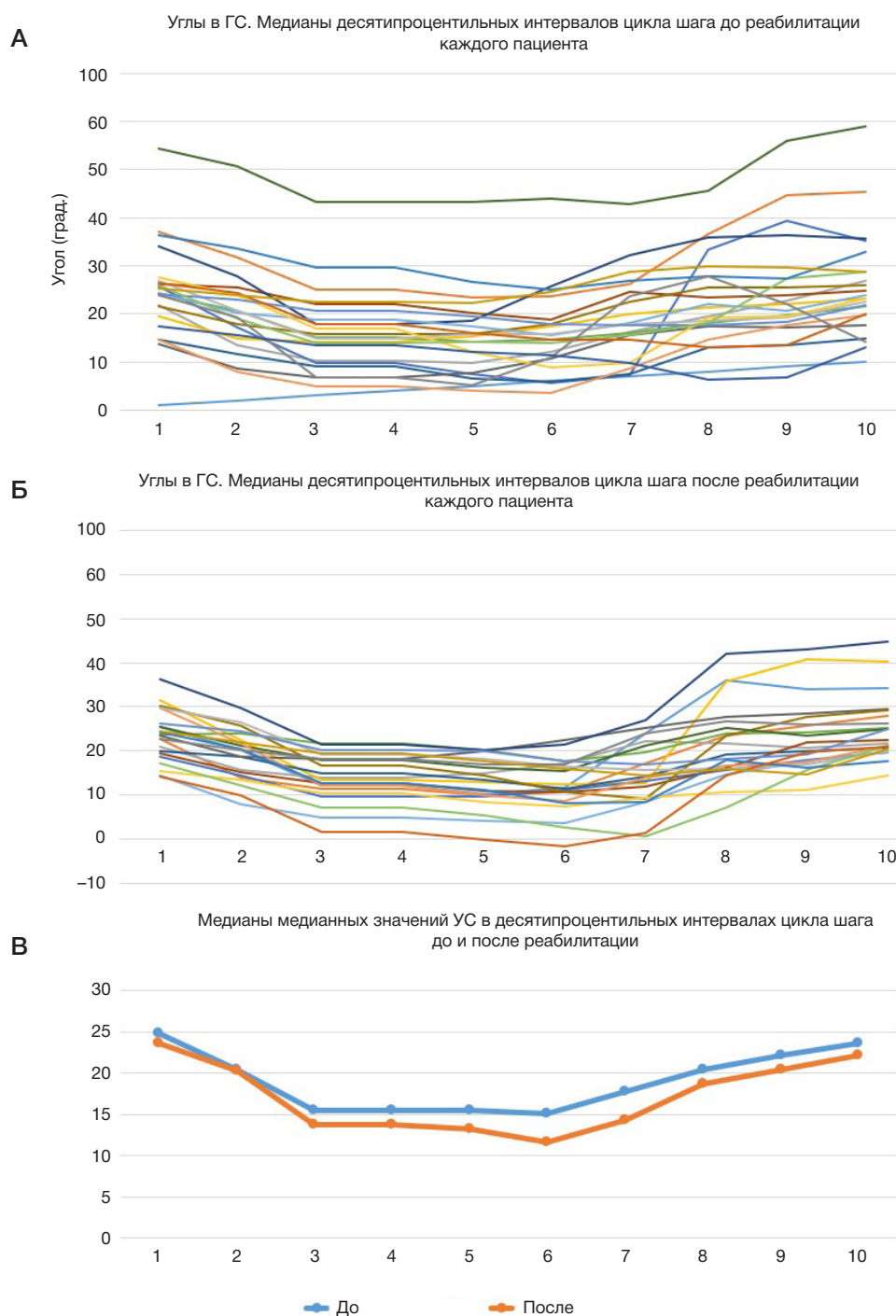


Рис. 3. Показатели гониограмм сгибания/разгибания голеностопного сустава десятипроцентных интервалов ЦШ до курса тренировок (А), после курса тренировок (Б); сравнение медианных значений до и после тренировок (В)

и различались недостоверно ($p = 0,228$), минимальные значения составили $3,33^\circ$ и $-1,79^\circ$ соответственно ($p = 0,072$), разница максимальных и минимальных значений составила $55,79^\circ$ и $47,09^\circ$ соответственно ($p = 0,190$). Тем не менее рассмотрение медиан десятипроцентных интервалов цикла шага до и после курса реабилитации показало, что первоначально различавшиеся гониограммы пациентов стали больше похожи друг на друга (рис. 3А–В).

С учетом отсутствия достоверных изменений первичных кинематических показателей был проведен подробный анализ вариабельности гониограмм и угловых скоростей (табл. 2).

Для определения степени вариабельности данных на первом этапе был проведен анализ коэффициентов корреляции углов между каждым последующим процентом

ЦШ. На основании графика (рис. 4) был сделан вывод, что на отрезке с 51 по 58% и с 65 по 82% от ЦШ различия между пациентами наиболее выражены.

Для более подробного анализа гониограмм голеностопного сустава до и после курса тренировок было произведено разделение ЦШ на части с помощью кластерного анализа временных точек ЦШ, а также по коэффициентам корреляции значений между каждым последующим значением углов. С помощью кластеризации по методу Уорда цикл шага до курса тренировок был разделен на пять частей (1–7%; 8–19%; 20–55%; 56–74%; 75–100% от ЦШ). Таким образом, первая часть соответствовала времени контакта стопы с поверхностью дорожки и началу фазы опоры, вторая часть — середине

Таблица 2. Сравнение частей цикла шага до и после реабилитации

Часть цикла шага, градусы		Медиана, градусы		1-й квартиль, градусы		3-й квартиль, градусы		МКИ, градусы	
до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
1–7	1–61	25,1	16,1	22,2	12,7	27,4	19,6	5,2	6,9*
8–19		21,0		16,1		24,6		8,5	
20–55		15,6		10,9		19,7		8,8	
56–74	62–75	16,9	16,6	14,2	13,1	22,5	20,8	8,3	7,7
75–97	76–97	22,1	20,1	18,8	18,7	27,4	24,7	8,6	6*

Примечание: сравнение данных произведено при помощи критерия Манна–Уитни с поправкой Тьюки. * — при $p < 0,05$.

фазы опоры, третья часть — концу фазы опоры и началу фазы переноса, четвертая часть — середине фазы переноса и пятая часть — концу фазы переноса. К каждой из частей цикла шага был применен кластерный анализ. Описательная статистика частей ЦШ до разделения пациентов на кластеры представлена в табл. 3.

После того как в ЦШ были выявлены пять частей, для каждой из них проводили разделение пациентов на подгруппы с помощью кластерного анализа. В результате, в первой части цикла шага (1–7%) было выделено два кластера пациентов. Во второй части цикла шага (8–19%) выделено три кластера, которые взаимно различаются по медиане. В третьей (20–55%) и четвертой (56–74%) частях выделено три и четыре кластера соответственно, которые взаимно различаются по медиане. В пятой части (75–97%) выделено три кластера. С помощью метода кластеризации Уорда ЦШ по данным гониограмм после курса тренировок был разделен на три части: 1–61%; 62–75%; 76–97%. При этом в первой части было выделено три кластера, во второй два кластера и в третьей три. Таким образом, основным различием структуры ЦШ до и после курса тренировок является наличие трех частей шага вместо пяти, что подтверждает консолидацию гониограмм пациентов на фоне курса тренировок в периоде от 1 до 61% ЦШ. Сравнение значений углов до и после показало достоверные различия только по МКИ ($p < 0,05$).

Анализ медиан угловых скоростей (УС) десятипроцентильных интервалов ЦШ до и после реабилитации также выявил консолидацию показателей на фоне тренировок, причем наиболее существенные изменения угловых скоростей были отмечены при тыльном сгибании голеностопного сустава, во время фазы переноса (рис. 5А–В).

Сравнение медиан УС в десятипроцентильных интервалах ЦШ каждого пациента до и после курса, показало, что после реабилитации паттерны угловых скоростей стали более схожими. Имеется общий практически для всех пациентов пик УС на седьмом процентильном интервале ЦШ (71–80% ЦШ), соответствующий середине фазы переноса и меньший по выраженности пик на 10-м процентильном интервале ЦШ (91–97% ЦШ), соответствующий концу фазы переноса. Статистический анализ показал, что наблюдаемые изменения обусловлены в первую очередь изменениями третьего квартиля и максимальных показателей угловых скоростей. Во второй половине ЦШ в показателях УС до реабилитации были выявлены три пика: на 55%, 75% (абсолютный максимум) и на 95%; после реабилитации в показателях УС выявлено также три пика, однако первый и второй «сливаются», образуя практически единый пик, при этом показатели после реабилитации были ниже, третьи пики до и после реабилитации практически полностью совпадают (рис. 6).

Таким образом, на фоне курса реабилитации с применением роботизированных тренировок у пациентов с постинсультным гемипарезом наблюдается увеличение уровня произвольной активности нижней конечности (по ШФМ), снижение спастичности в комплексе камбаловидной и икроножной мышц (по МШЭ), улучшается функциональный статус пациента (по FAC).

Проведенный детальный анализ биомеханики движений позволил выявить изменения структуры ЦШ (увеличение длительности фазы опоры), а также паттернов углов и угловых скоростей в голеностопном суставе (уменьшение вариативности, слияние пиков угловой скорости).

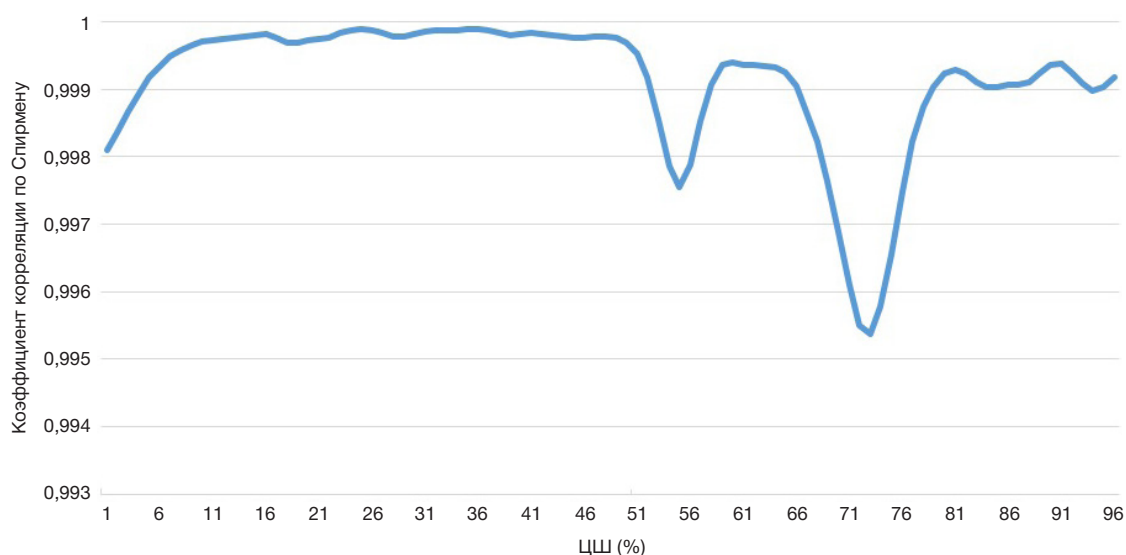


Рис. 4. Коэффициент корреляции амплитуды в голеностопном суставе для каждых двух последующих временных интервалов ЦШ гониограмм

Таблица 3. Статистические характеристики частей цикла шага

Часть цикла шага, градусы	Медиана, градусы	1-й квартиль, градусы	3-й квартиль, градусы	МКИ, градусы
1–7%	25,1	22,2	27,4	5,2
8–19%	21	16,1	24,6	8,5
20–55%	15,6	10,9	19,7	8,8
56–74%	16,9	14,2	22,5	8,3
75–100%	22,1	18,8	27,4	8,6

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из частых проявлений нарушения ходьбы у постинсультных пациентов, наряду с уменьшением скорости ходьбы и длины шага, является асимметрия ЦШ, а именно укорочение длительности фазы опоры и увеличение длительности фазы переноса паретичной ноги, что можно видеть в значениях временных параметров шага до курса тренировок [2]. Увеличение длительности фазы опоры на фоне курса тренировок с 28,0% (25; 36) до 33,5% (30; 42) от всего ЦШ может быть следствием как увеличения силы опорной мускулатуры паретичной ноги и улучшения функции переноса веса, так и снижения спастичности, а также улучшения межсуставной координации. Известно, что высокий мышечный тонус сгибателей ГС препятствует переходу стопы к тыльному сгибанию, вследствие чего тело останавливает свое движение вперед, центр тяжести остается позади линии ГС, что приводит к вынужденному укорочению фазы переноса здоровой ноги, и, следовательно, укорочению шага. Как показывают результаты отдельных исследований [36], роботизированные тренировки могут способствовать снижению спастичности в мышцах — разгибателях ГС, и опосредованно влиять на восстановление симметрии шага, что находит подтверждение в полученных и нами данных о снижении мышечного тонуса в икроножной и камбаловидной мышцах. Уменьшение мышечного тонуса могло способствовать увеличению тыльного сгибания ГС в момент фазы опоры, тем не менее достоверного изменения объема движений во время фазы опоры обнаружено не было, что можно объяснить ограниченной амплитудой тыльного сгибания в ГС в середине фазы опоры (в момент переноса центра масс за точку опоры объем не превышает 10°) [37]. В то же время консолидация гониограмм ГС в промежутке до 61% ЦШ, включающем период опоры, и начало фазы переноса косвенно свидетельствуют о положительном влиянии навязанного физиологического паттерна переноса центра масс на кинематику ГС в фазу опоры.

В физиологичном ЦШ помимо фаз опоры и переноса исследователи разделяют локомоторный цикл на шесть биомеханических фаз, разграниченных экстремальными значениями динамических параметров [38, 39]. Среди выделяемых фаз шага интервал 60–73% ЦШ соответствует фазе ускорения, начало которой совпадает с уходом ноги с опоры, а конец — с тем моментом, когда переносимая нога находится напротив опорной. В данной фазе происходит активный набор скорости для продвижения ноги вперед. В интервале 73–87% ЦШ происходит фаза продвижения, во время которой осуществляется дальнейшее пассивное продвижение ноги вперед. Начало фазы соответствует моменту, когда выносимая вперед нога находится напротив опорной, конец — когда эта нога выведена вперед, а голень находится в вертикальном положении [2, 40].

Согласно полученным нами данным, у пациентов с постинсультным парезом на фоне тренировок происходило изменение биомеханики ГС, проявлявшееся его стабилизацией во время фазы опоры, а также увеличением скорости и плавности тыльного сгибания во время фазы продвижения стопы для обеспечения достаточного клиренса стопы. Эти изменения могут быть следствием навязываемой роботизированными тренировками синергии тазобедренного и коленного суставов и отсутствия возможности использовать компенсаторные синергии для увеличения клиренса стопы. По-видимому, роботизированные тренировки оказывают определенный универсальный, выравнивающий эффект на движение в голеностопном суставе посредством навязанного изменения привычной для пациента синергии тазобедренного и коленного суставов, что проявляется в уменьшении вариативности данных ($p < 0,05$; критерий Манна–Уитни), уменьшении количества выделяемых кластеров и сглаживании показателей медиан среди пациентов после курса тренировок. Тем не менее до и после тренировок кластеры пациентов почти полностью различаются; это позволяет предположить, что поскольку пациенты на фоне тренировок переходят в другие кластеры, эффект достигается разными путями, несмотря на оказываемое тренировками «общее выравнивающее» воздействие на паттерн ходьбы.

Сравнение общей суммы значений углов за весь цикл шага показывает, что исчезли «пики» значений, которые компенсировались выравниванием значений к уровню медианы у других пациентов. Это позволило сделать заключение об отсутствии достоверного изменения общей суммы углов в голеностопном суставе после реабилитации ($p = 0,521$; критерий Манна–Уитни). Это позволяет предположить, что структурные изменения в паттерне ходьбы происходят прежде всего не за счет количественных показателей, а за счет приближения показателей паттерна к некоему усредненному шаблону движений. Отдельные исследования показали изменение в угловых параметрах голеностопного сустава, в частности увеличение тыльного сгибания на фоне роботизированных тренировок, однако данные изменения были характерны для пациентов с умеренным дефицитом движений в голеностопном суставе [40].

Можно предположить, что при сформировавшейся компенсаторной локомоторной синергии можно воздействовать не на всю синергию в комплексе, а лишь на отдельную ее часть. Если компоненты синергии при этом обладают схожей значимостью, не имеет принципиального значения, на какую из них оказывается воздействие, в то время как для не до конца сформировавшейся компенсаторной синергии, наоборот, наибольший эффект может быть достигнут путем воздействия на первично нарушенное движение, повлекшее за собой формирование компенсации.

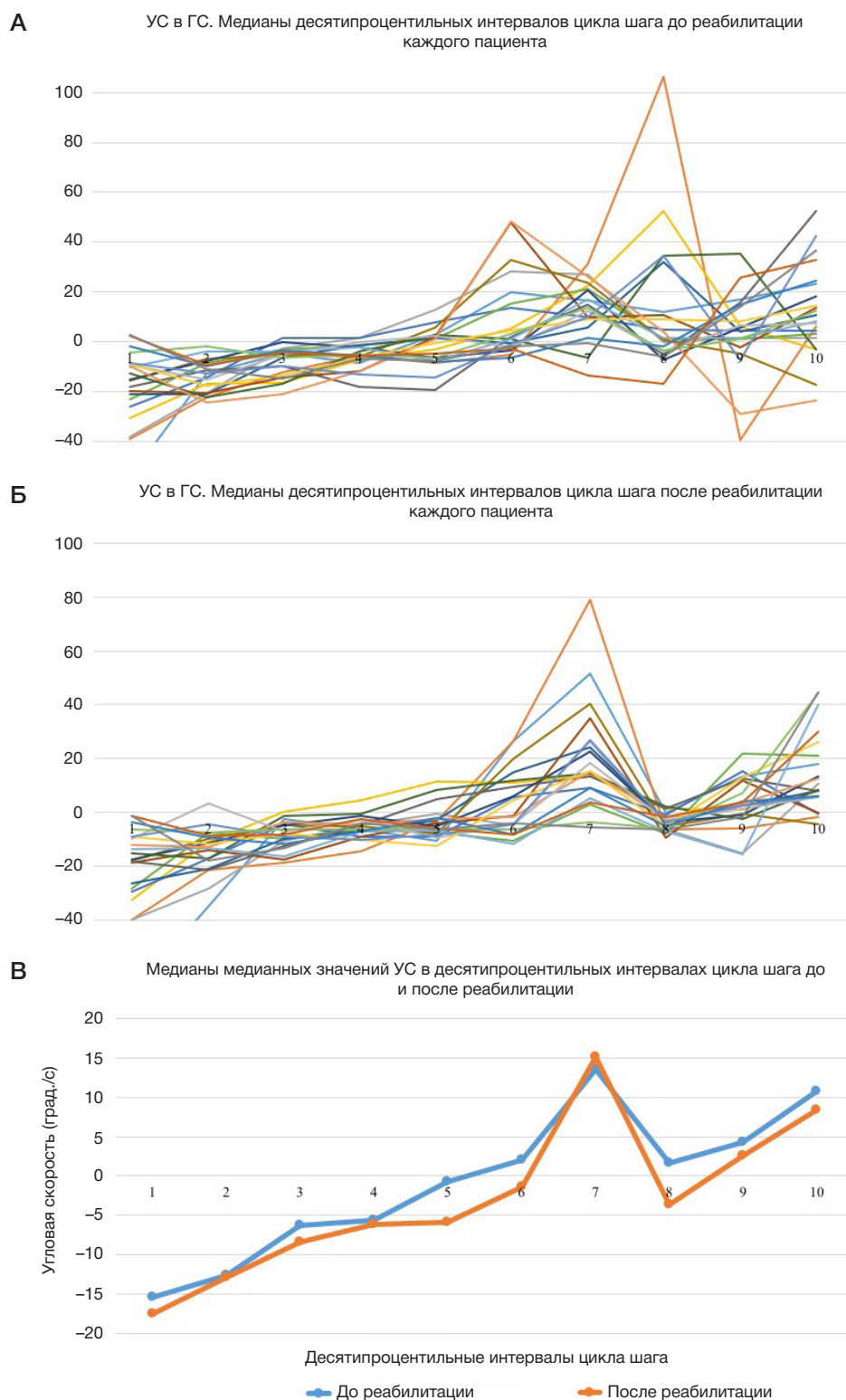


Рис. 5. Показатели десятипроцентильных интервалов цикла шага в голеностопном суставе паретичной конечности до курса тренировок (**А**), после курса тренировок (**Б**); сравнение медианных значений до и после тренировок (**В**)

Проведенное исследование обладает рядом ограничений. В силу того, что видеоанализ движений проводили на беговой дорожке, не оснащенной встроенными силовыми платформами, не удалось провести анализ и корреляцию данных силы реакции опоры. Для более полного понимания биомеханических процессов дальнейшие исследования должны включать сравнение с сопоставимой здоровой популяцией, данные катамнеза, а также оценку ЭМГ активности мышц.

ВЫВОДЫ

В рамках сформировавшейся компенсаторной локомоторной синергии роботизированные тренировки тазобедренного и коленного суставов могут приводить к изменениям гониограмм и угловых скоростей в голеностопном суставе, оказывая универсальное корректирующее воздействие на биомеханику ГС. Дальнейшие исследования должны быть направлены на

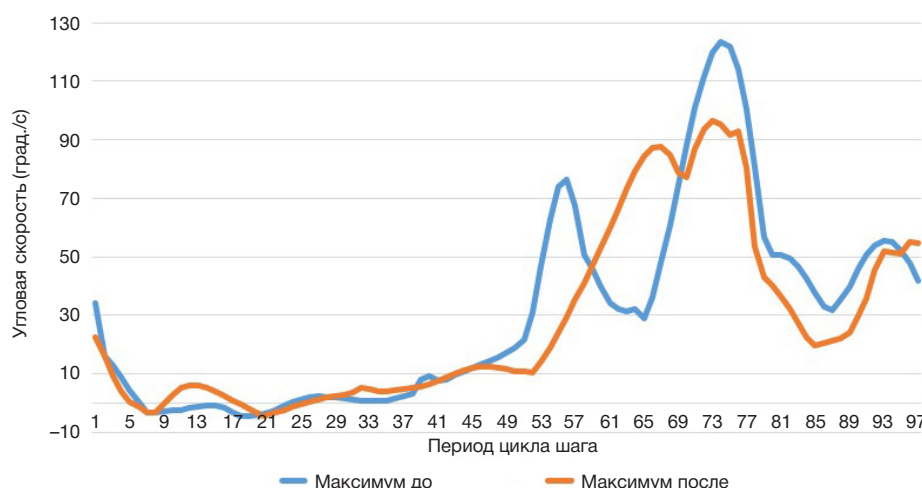


Рис. 6. Максимальные показатели угловой скорости сгибания/разгибания в голеностопном суставе паретичной конечности группы пациентов в разных периодах ЦШ до и после курса тренировок

более подробный анализ биомеханики ходьбы, включающий полный анализ движений как паретичной, так и здоровой ноги, а также движений таза и корпуса. Кроме того, для изучения механизмов изменений синергии протокол исследований должен включать группы с различающимся

воздействием. Последующее изучение эффекта локального воздействия роботизированных тренировок на комплексные движения позволит сформировать новые протоколы тренировок, учитывающие наличие и выраженность компенсаторных паттернов ходьбы.

Литература

- Balaban B, Tok F. Gait Disturbances in Patients With Stroke. *J PM&R*. 2014; 6 (7): 635–42.
- Beyaert C, Vasa R, Frykberg GE. Gait post-stroke: Pathophysiology and rehabilitation strategies. *J Neurophysiol Clin*. 2015; 45 (4–5): 335–55.
- Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou H, et al. Recovery of walking function in stroke patients: The copenhagen stroke study. *J Arch Phys Med Rehabil*. 1995; 76 (1): 27–32.
- Mehrholz J, Thomas S, Werner C, et al. Electromechanical-assisted training for walking after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 5.
- Скворцов Д. В. Клинический анализ движений. Анализ походки. Иваново: Стимул, 1996; 344 с.
- Kim CM, Eng JJ. Magnitude and pattern of 3D kinematic and kinetic gait profiles in persons with stroke: relationship to walking speed. *Gait Posture*. 2004; 20 (2): 140–6.
- Milot M-H, Nadeau S, Gravel D. Muscular utilization of the plantarflexors, hip flexors and extensors in persons with hemiparesis walking at self-selected and maximal speeds. *J Electromyogr Kinesiol*. 2007; 17 (2): 184–193.
- Sadeghi H, Allard P, Duhaime M. Muscle power compensatory mechanisms in below-knee amputee gait. *Am J Phys Med Rehabil*. 2001; 80 (1): 25–32.
- Brunnstrom S. Movement Therapy in Hemiplegia: A Neurophysiological Approach. Harper & Row. 1970; 192.
- Bruni MF, Corrado M, De Cola MC, et al. What does best evidence tell us about robotic gait rehabilitation in stroke patients: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci*. 2018; 48: 11–17.
- Tan CH, Kadone H, Watanabe H, Marushima A, et al. Lateral Symmetry of Synergies in Lower Limb Muscles of Acute Post-stroke Patients After Robotic Intervention. *Frontiers in Neuroscience*. 2018; 12: 276.
- Письменная Е. В., Петрушанская К. А., Котов С. В. и др. Клинико-биомеханическое обоснование применения экзоскелета «Экзоатлет» при ходьбе больных с последствиями ишемического инсульта. *Российский журнал биомеханики*. 2019; 23 (2): 204–30.
- Vukobratović M, Borovac B. Zero-moment point-thirty five years of its life. *International Journal of Humanoid Robotics*. 2004; 1 (1): 157–73.
- Mokhtari M, Taghizadeh M, Mazare M. Hybrid Adaptive Robust Control Based on CPG and ZMP for a Lower Limb Exoskeleton. *Robotica*. 2020: 1–19.
- Al-Shuka H, Corves B, Vanderborcht B, et al. Zero-Moment Point-Based Biped Robot with Different Walking Patterns. *International Journal of Intelligent Systems and Applications (IJISA)*. 2015; 7: 31–41.
- Erbatur K, Kurt O. Natural ZMP Trajectories for Biped Robot Reference Generation. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*. 2009; 56 (3): 835–45.
- Schwartz I, Meiner Z. Robotic-Assisted Gait Training in Neurological Patients: Who May Benefit? *Ann Biomed Eng*. 2015; 43 (5): 1260–9.
- Moucheboeuf G, Griffier R, Gasq D. Effects of robotic gait training after stroke: a meta-analysis. *Ann Phys Rehabil Med*. 2020; S.1877–0657(20)30065-8. DOI: 10.1016/j.rehab.2020.02.008.
- Aprile I, Iacovelli C, Goffredo M, et al. Efficacy of end-effector Robot-Assisted Gait Training in subacute stroke patients: Clinical and gait outcomes from a pilot bi-centre study. *NeuroRehabilitation*. 2019; 45 (2): 201–12.
- De Luca A, Vernetti H, Capra C, et al. Recovery and compensation after robotic assisted gait training in chronic stroke survivors. *Disabil Rehabil Assist Technol*. 2019; 14 (8): 826–38.
- Клочков А. С., Теленков А. А., Черникова Л. А. Влияние тренировок на системе «Lokomat» на выраженность двигательных нарушений у пациентов, перенесших инсульт. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011; 5 (3): 20–25.
- Neckel ND, Blonien N, Nichols D, et al. Abnormal joint torque patterns exhibited by chronic stroke subjects while walking with a prescribed physiological gait pattern. *J Neuroeng Rehabil*. 2008; 5 (1): 1–13.
- Супонева Н. А., Юсупова Д. Г., Жирова Е. С. и др. Валидация модифицированной шкалы Ранкина (The Modified Rankin Scale, MRS) в России. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2018; 10 (4): 36–39.
- Супонева Н. А., Юсупова Д. Г., Ильина К. А. и др. Валидация

- модифицированной шкалы Эшворта (modified ashworth scale) в России. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020; 14 (1): 89–96.
25. Шпаков А. В., Артамонов А. А., Орлов Д. О. и др. Новые подходы в обработке биомеханических характеристик локомоций человека, полученных с использованием видеоанализа движений. *Управление движением Motor Control 2020 материалы VIII Российской с международным участием конференции по управлению движением*. 2020; 65–66.
 26. Доценко В. И., Воронов А. В., Титаренко Н. Ю. и др. Компьютерный видеоанализ движений в спортивной медицине и нейрореабилитации. *Медицинский алфавит*. 2005; 3: 12–14.
 27. Ferrarin M, Bovi G, Rabuffetti M, et al. Gait pattern classification in children with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Gait and Posture*. 2012; 35: 131–7.
 28. Kaczmarczyk K, Wit A, Krawczyk M, et al. Gait classification in poststroke patients using artificial neural networks. *Gait and Posture*. 2009; 30 (2): 207–10.
 29. Toro B, Nester CJ, Farren PC. Cluster analysis for the extraction of sagittal gait patterns in children with cerebral palsy. *Gait and Posture*. 2007; 25: 157–65.
 30. Giacomozzi C, Martelli F, Nagel A, et al. Cluster analysis to classify gait alterations in rheumatoid arthritis using peak pressure curves. *Gait and Posture*. 2009; 29: 220–4.
 31. Fong-Chin S, Wen-Lan W, Yuh-Min C, et al. Fuzzy clustering of gait patterns of patients after ankle arthrodesis based on kinematic parameters. *Med Eng Phys*. 2001; 23: 83–90.
 32. Rozumalski A, Schwartz M. Crouch gait patterns defined using k-means cluster analysis are related to underlying clinical pathology. *Gait and Posture*. 2009; 30: 155–60.
 33. Mulroy S, Gronley J, Weiss W, et al. Use of cluster analysis for gait pattern classification of patients in the early and late recovery phases following stroke. *Gait and Posture*. 2003; 18: 114–25.
 34. Phinyomark A, Osis S, Hettinga BA, Ferber R. Kinematic gait patterns in healthy runners: A hierarchical cluster analysis. *J Biomech*. 2015; 48 (14): 3897–904.
 35. Watari R, Osis ST, Phinyomark A, Ferber R. Runners with patellofemoral pain demonstrate sub-groups of pelvic acceleration profiles using hierarchical cluster analysis: an exploratory cross-sectional study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2018; 19: 120.
 36. Trompetto C, Marinelli L, Mori L, et al. Postactivation depression changes after robotic-assisted gait training in hemiplegic stroke patients. *Gait Posture*. 2013; 38 (4): 729–33.
 37. Скворцов Д. В. Диагностика двигательной патологии инструментальными методами: анализ походки стабилومتрия. М., 2007; 640 с.
 38. Витензон А. С., Петрушанская К. А. К фазовому анализу ходьбы и некоторых ритмических движений человека. *Российский журнал биомеханики*. 2005; 9 (1): 7–26.
 39. Воронцова О. И., Лозовская М. В. Структура шагового цикла по данным анализа кинетических и кинематических параметров походки человека. *Вестник новых медицинских технологий*. 2017; 3: 9–15.
 40. Bonnyaud C, Zory R, Boudarham J, et al. Effect of a robotic restraint gait training versus robotic conventional gait training on gait parameters in stroke patients. *Exp Brain Res*. 2014; 232 (1): 31–42.

References

1. Balaban B, Tok F. Gait Disturbances in Patients With Stroke. *J PM&R*. 2014; 6 (7): 635–42.
2. Beyaert C, Vasa R, Frykberg GE. Gait post-stroke: Pathophysiology and rehabilitation strategies. *J Neurophysiol Clin*. 2015; 45 (4–5): 335–55.
3. Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou H, et al. Recovery of walking function in stroke patients: The copenhagen stroke study. *J Arch Phys Med Rehabil*. 1995; 76 (1): 27–32.
4. Mehrholz J, Thomas S, Werner C, et al. Electromechanical-assisted training for walking after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 5.
5. Skvortsov DV. *Klinicheskiy analiz dvizheniy. Analiz pokhodki*. Ivanovo: Stimul, 1996; 344 s. Russian.
6. Kim CM, Eng JJ. Magnitude and pattern of 3D kinematic and kinetic gait profiles in persons with stroke: relationship to walking speed. *Gait Posture*. 2004; 20 (2): 140–6.
7. Milot M-H, Nadeau S, Gravel D. Muscular utilization of the plantarflexors, hip flexors and extensors in persons with hemiparesis walking at self-selected and maximal speeds. *J Electromyogr Kinesiol*. 2007; 17 (2): 184–193.
8. Sadeghi H, Allard P, Duhaime M. Muscle power compensatory mechanisms in below-knee amputee gait. *Am J Phys Med Rehabil*. 2001; 80 (1): 25–32.
9. Brunnstrom S. *Movement Therapy in Hemiplegia: A Neurophysiological Approach*. Harper & Row. 1970; 192.
10. Bruni MF, Corrado M, De Cola MC, et al. What does best evidence tell us about robotic gait rehabilitation in stroke patients: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci*. 2018; 48: 11–17.
11. Tan CH, Kadone H, Watanabe H, Marushima A, et al. Lateral Symmetry of Synergies in Lower Limb Muscles of Acute Post-stroke Patients After Robotic Intervention. *Frontiers in Neuroscience*. 2018; 12: 276.
12. Pismennaya EV, Petrushanskaya KA, Kotov SV, et al. Clinical and biomechanical foundation of application of the exoskeleton exoatlet at walking of patients with poststroke disturbances. *Russian Journal of biomechanics*. 2019; 23 (2): 204–30. Russian.
13. Vukobratovic M, Borovac B. Zero-moment point-thirty five years of its life. *International Journal of Humanoid Robotics*. 2004; 1 (1): 157–73.
14. Mokhtari M, Taghizadeh M, Mazare M. Hybrid Adaptive Robust Control Based on CPG and ZMP for a Lower Limb Exoskeleton. *Robotica*. 2020: 1–19.
15. Al-Shuka H, Corves B, Vanderborght B, et al. Zero-Moment Point-Based Biped Robot with Different Walking Patterns. *International Journal of Intelligent Systems and Applications (IJISA)*. 2015; 7: 31–41.
16. Erbatur K, Kurt O. Natural ZMP Trajectories for Biped Robot Reference Generation. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*. 2009; 56 (3): 835–45.
17. Schwartz I, Meiner Z. Robotic-Assisted Gait Training in Neurological Patients: Who May Benefit? *Ann Biomed Eng*. 2015; 43 (5): 1260–9.
18. Moucheboeuf G, Griffier R, Gasq D. Effects of robotic gait training after stroke: a meta-analysis. *Ann Phys Rehabil Med*. 2020; S.1877–0657(20)30065-8. DOI: 10.1016/j.rehab.2020.02.008.
19. Aprile I, Iacovelli C, Goffredo M, et al. Efficacy of end-effector Robot-Assisted Gait Training in subacute stroke patients: Clinical and gait outcomes from a pilot bi-centre study. *NeuroRehabilitation*. 2019; 45 (2): 201–12.
20. De Luca A, Vernetti H, Capra C, et al. Recovery and compensation after robotic assisted gait training in chronic stroke survivors. *Disabil Rehabil Assist Technol*. 2019; 14 (8): 826–38.
21. Klochkov AS, Telenkov AA, Chernikova LA. Effect of Lokomat trainings on the severity of gait disorders in patients after stroke. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2011; 5 (3): 20–25.
22. Neckel ND, Blonien N, Nichols D, et al. Abnormal joint torque patterns exhibited by chronic stroke subjects while walking with a prescribed physiological gait pattern. *J Neuroeng Rehabil*. 2008; 5 (1): 1–13.
23. Suponeva NA, Yusupova DG, Zhironova ES, et al. Validation of the modified Rankin Scale in Russia. *J Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2018; 10 (4): 36–39.
24. Suponeva NA, Yusupova DG, Ilyina KA, et al. Validation of the Modified Ashworth scale in Russia. *J Annals of clinical and experimental neurology*. 2020; 14 (1): 89–96.
25. Shpakov AV, Artamonov AA, Orlov DO, i dr. Novye podhody v obrabotke biomehanicheskikh harakteristik lokomocij cheloveka,

- poluchennyh s ispol'zovaniem videoanaliza dvizhenij. Upravlenie dvizheniem Motor Control 2020 materialy VIII Rossijskoj s mezhdunarodnym uchastiem konferencii po upravleniju dvizheniem. 2020; 65–66.
26. Docenko VI, Voronov AV, Titarenko NYu, i dr. Komp'juternyj videoanaliz dvizhenij v sportivnoj medicine i nejroreabilitacii. Medicinskij alfavit. 2005; 3: 12–14.
 27. Ferrarin M, Bovi G, Rabuffetti M, et al. Gait pattern classification in children with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Gait and Posture*. 2012; 35: 131–7.
 28. Kaczmarczyk K, Wit A, Krawczyk M, et al. Gait classification in poststroke patients using artificial neural networks. *Gait and Posture*. 2009; 30 (2): 207–10.
 29. Toro B, Nester CJ, Farren PC. Cluster analysis for the extraction of sagittal gait patterns in children with cerebral palsy. *Gait and Posture*. 2007; 25: 157–65.
 30. Giacomozzi C, Martelli F, Nagel A, et al. Cluster analysis to classify gait alterations in rheumatoid arthritis using peak pressure curves. *Gait and Posture*. 2009; 29: 220–4.
 31. Fong-Chin S, Wen-Lan W, Yuh-Min C, et al. Fuzzy clustering of gait patterns of patients after ankle arthrodesis based on kinematic parameters. *Med Eng Phys*. 2001; 23: 83–90.
 32. Rozumalski A, Schwartz M. Crouch gait patterns defined using k-means cluster analysis are related to underlying clinical pathology. *Gait and Posture*. 2009; 30: 155–60.
 33. Mulroy S, Gronley J, Weiss W, et al. Use of cluster analysis for gait pattern classification of patients in the early and late recovery phases following stroke. *Gait and Posture*. 2003; 18: 114–25.
 34. Phinyomark A, Osis S, Hettinga BA, Ferber R. Kinematic gait patterns in healthy runners: A hierarchical cluster analysis. *J Biomech*. 2015; 48 (14): 3897–904.
 35. Watari R, Osis ST, Phinyomark A, Ferber R. Runners with patellofemoral pain demonstrate sub-groups of pelvic acceleration profiles using hierarchical cluster analysis: an exploratory cross-sectional study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2018; 19: 120.
 36. Trompetto C, Marinelli L, Mori L, et al. Postactivation depression changes after robotic-assisted gait training in hemiplegic stroke patients. *Gait Posture*. 2013; 38 (4): 729–33.
 37. Skvortsov DV. Diagnostika dvigatel'noy patologii instrumental'nymi metodami: analiz pokhodki stabilometriya. M., 2007; 640 s.
 38. Vitenson AS, Petrushanskaya KA. Physiological foundations of a method of artificial correction of movements by means of programmable electrical stimulation of muscles during walking. *Russian Journal of biomechanics*. 2005; 9 (1): 7–26.
 39. Vorontcova OI, Lozovskaya MV. Structure of gait cycle based on kinetic and kinematical parameters. *Journal of new medical technologies*. 2017; 3: 9–15.
 40. Bonnyaud C, Zory R, Boudarham J, et al. Effect of a robotic restraint gait training versus robotic conventional gait training on gait parameters in stroke patients. *Exp Brain Res*. 2014; 232 (1): 31–42.

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ ДИСБИОЗ МИКРОБИОТЫ И СЫВОРОТОЧНЫЕ БИОМАРКЕРЫ КАК ОТРАЖЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Е. А. Черневская , А. Ю. Меглей, И. В. Буякова, Н. Ю. Ковалева, К. М. Горшков, В. Е. Захарченко, Н. В. Белобородова

Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

Синдром «хронического критического состояния» (ХКС) объединяет пациентов с длительной зависимостью от жизнеобеспечивающих методов терапии. У значительной доли пациентов пусковым фактором ХКС служат тяжелые повреждения головного мозга. Число исследований по изучению микробиоты при различных патологических состояниях растет с каждым годом, однако особенности микробиоты кишечника при ХКС все еще недостаточно изучены. Целью работы было выявить связь изменений таксономического состава микробиоты кишечника, воспалительных и неврологических сывороточных биомаркеров с тяжестью поражения центральной нервной системы у пациентов в ХКС. В сравнительном проспективном исследовании у 29 пациентов с поражением ЦНС в ХКС методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) обнаружены изменения таксономического состава микробиоты. Корреляционный анализ уровней биомаркеров и представителей микробиоты кишечника выявил статистически значимые корреляции: кортизола с *F. prausnitzii* ($r = -0,62$; $p < 0,05$) и *B. thetaiotaomicron* ($r = -0,57$; $p < 0,05$) в группе пациентов в вегетативном состоянии; коэффициента СРБ/альбумин с *S. aureus* ($r = 0,72$; $p < 0,05$), *B. fragilis group/F. prausnitzii* с S100 ($r = 0,45$; $p < 0,05$) в группе пациентов с сохраненным сознанием; результатов по шкале комы Глазго с уровнем *Enterococcus spp.* ($r = -0,77$; $p < 0,05$) в обеих группах. Таким образом, комплексная диагностика с применением метода ПЦР-РВ и современных биомаркеров позволяет оценить связь таксономических изменений состава микробиоты кишечника со степенью неврологического дефицита. Данный подход позволит оптимизировать использование антибактериальных препаратов и/или разработать альтернативные стратегии для менее агрессивного воздействия на микробиоту кишечника.

Ключевые слова: микробиота кишечника, ось «кишечник – мозг», хроническое критическое состояние, биомаркеры, прокальцитонин, кортизол, коэффициент СРБ/альбумин, ПЦР в реальном времени, *Feacalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterococcus spp.*

Вклад авторов: Е. А. Черневская, А. Ю. Меглей — оценка таксономического состава микробиоты и уровня биомаркеров, анализ полученных данных, написание текста рукописи; Н. В. Белобородова — дизайн исследования, редактирование рукописи; И. В. Буякова, Н. Ю. Ковалева, К. М. Горшков — отбор и работа с пациентами, сбор клинических данных; В. Е. Захарченко — получение данных для анализа, редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили рукопись.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 2/19/2 от 20 июня 2019 г.). Все пациенты или их законные представители подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Александровна Черневская
ул. Петровка, д. 25, с. 2, г. Москва, 127051; echernevskaya@fnkcr.ru

Статья получена: 20.08.2020 **Статья принята к печати:** 03.09.2020 **Опубликована онлайн:** 16.09.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.053

TAXONOMIC DYSBIOSIS OF GUT MICROBIOTA AND SERUM BIOMARKERS REFLECT SEVERITY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM INJURY

Chernevskaya EA , Meglei AY, Buyakova IV, Kovaleva NYu, Gorshkov KM, ZakharchenkoVE, Beloborodova NV


Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russian

The term “chronic critical illness” (CCI) refers to patients with prolonged dependence on intensive care. In most patients, CCI is triggered by severe brain injury. Ever more studies researching the microbiota in pathologic conditions are published every year, but a lot is yet to be elucidated about the composition of the gut microbiota in CCI. The aim of this study was to investigate possible correlations between changes in the taxonomic abundance of the gut microbiota, levels of proinflammatory and neurological serum biomarkers and the severity of central nervous system injury in patients with CCI. Our prospective observational pilot study included 29 patients with CCI. Using real-time PCR allowed us to detect changes in the taxonomic abundance of the gut microbiota. The correlation analysis of serum biomarkers and the taxonomic composition of the gut microbiota revealed statistically significant correlations between cortisol levels and the abundance of *F. prausnitzii* ($r = -0,62$; $p < 0,05$) and *B. thetaiotaomicron* ($r = -0,57$; $p < 0,05$) in vegetative state patients; between the CRP/albumin ratio and the abundance of *S. aureus* ($r = 0,72$; $p < 0,05$); between the abundance of *B. fragilis group/F. prausnitzii* and S100 levels ($r = 0,45$; $p < 0,05$) in conscious patients; between Glasgow coma scale scores and the abundance of *Enterococcus spp.* ($r = -0,77$; $p < 0,05$) in both groups. Thus, the association between the changes in the taxonomic composition of the gut microbiota and the severity of neurologic deficit can be evaluated using PCR-based diagnostic techniques and blood serum biomarkers. This approach will help to optimize antibacterial treatment regimens and/or develop alternative strategies to minimize the aggressive effect of antibiotics on the gut microbiota.

Keywords: gut microbiota, gut-brain axis, chronic critical illness, biomarkers, procalcitonin, cortisol, CRP/albumin ratio, real-time PCR, *Feacalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterococcus spp.*

Author contribution: Chernevskaya EA, Meglei AY — taxonomic microbiota profiling, serum biomarker tests, data analysis, manuscript preparation; Beloborodova NV — study design, final version of the manuscript; Buyakova IV, Kovaleva NYu, Gorshkov KM — patient recruitment and treatment, clinical data collection; ZakharchenkoVE — sample collection, final version of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology (Protocol № 2/19/2 dated June 20, 2019). Informed consent was obtained from all study participants or their legal representatives.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Chernevskaya
Petровка, 25, s. 2, Moscow, 127051; echernevskaya@fnkcr.ru

Received: 20.08.2020 **Accepted:** 03.09.2020 **Published online:** 16.09.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.053

Достижения в области интенсивной терапии за последние десятилетия значительно снизили смертность пациентов при острых критических состояниях, но вместе с тем увеличили долю пациентов, оставшихся длительно зависимыми от методов интенсивной терапии. Это привело к появлению понятия ХКС [1]. Среди критериев ХКС: пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) не менее двух недель; необходимость проведения интенсивной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) более 14–28 дней; стойкое воспаление; иммуносупрессия; синдром гиперметаболизма-гиперкатаболизма; повышенная восприимчивость к инфекциям [2–4].

Большинство пациентов, перенесших тяжелые органические повреждения головного мозга, отвечают критериям ХКС. Первичная патология утяжеляет неврологическую дисфункцию, которая может быть и самостоятельным элементом ХКС как результат функционально-метаболических нарушений, опосредованных воспалительными и невоспалительными компонентами: чрезмерная активация микроглии; нарушение перфузии головного мозга; нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ); изменение нервной передачи [3]. Такие аномальные процессы определяют по повышенным уровням маркеров воспаления/повреждения головного мозга [5]. На сегодняшний день не существует универсального биомаркера, способного отразить сложные патофизиологические процессы, характерные для критического состояния, поэтому для мониторинга пациентов в ХКС необходима комплексная оценка биомаркеров. Наиболее востребованы среди них белок S100 и нейронспецифичная энзолаза (NSE) [6–8], свидетельствующие о повреждении нервной ткани, а также неспецифические маркеры воспаления — интерлейкин-6 (IL6) [9] и С-реактивный белок (СРБ) [10].

Важную роль в развитии ХКС может играть изменение состава микробиоты кишечника пациентов. Интерес к изучению микробиоты при критических состояниях обусловлен возможностью ее влияния на функции ЦНС человека [11, 12]. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) может играть роль в возникновении и прогрессировании органной недостаточности при критических состояниях [13, 14]. Пациенты в ХКС имеют метаболические нарушения, приводящие к развитию белково-энергетической недостаточности [15], коморбидные заболевания ЖКТ, вызванные в том числе питанием через назогастральный зонд [16], что может служить причиной дисбиотических нарушений при ХКС [17]. Число исследований, посвященных изучению микробиоты при критических состояниях, растет с каждым годом, однако особенности микробиоты кишечника при ХКС все еще недостаточно изучены [18].

Существует целый ряд методов для изучения микробиоты человека: от традиционного культивирования микроорганизмов до современных технологий секвенирования ДНК следующего поколения (NGS). Перспективной альтернативой классическим культуральным методам в изучении микробиоты является метод ПЦР-РВ, позволяющий в кратчайшие сроки не только качественно, но и количественно оценить основные группы бактерий микробиоты кишечника [19].

Целью данного исследования было выявить связь изменений таксономического состава микробиоты кишечника, воспалительных и неврологических сывороточных биомаркеров с тяжестью поражения ЦНС у пациентов в ХКС.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В сравнительное проспективное исследование включены пациенты с поражением ЦНС различной этиологии ($n = 29$), находящиеся в ХКС в одном из ОРИТ Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦРР) в период с июня 2019 г. по март 2020 г.

Критерии включения в исследование: пациенты с поражением ЦНС различной этиологии, соответствующие критериям ХКС (пребывание в ОРИТ не менее двух недель и/или необходимость проведения ИВЛ более чем 14–28 дней) в возрасте от 18 до 75 лет включительно, поступающие в ОРИТ ФНКЦРР для интенсивной нейрореабилитации. Критерии исключения: возраст старше 75 лет; химиотерапия/лечение гормональными (стероидными) препаратами; диагностированная нейроинфекция; прием антибактериальных, про-/пре- и метаболитических препаратов на момент поступления в ОРИТ.

Возраст пациентов составил от 20 до 75 лет (медиана 56 (32–63) лет), из них 17 женщин (58,6%) и 12 мужчин (41,4%). По нозологическим формам в исследование включены 15 пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), семь пациентов после перенесенных тяжелых черепно-мозговых травм (ЧМТ), четыре пациента с осложненным течением послеоперационного периода после нейрохирургических вмешательств, три — с аноксическим поражением головного мозга после успешных реанимационных мероприятий при клинической смерти. На ИВЛ находились 10 пациентов и 19 пациентов (на самостоятельном дыхании через трахеостомическую трубку). Все пациенты находились на энтеральном питании, больше половины из них ($n = 15$) получали питание через назогастральный зонд или гастростому. В связи с инфекционными осложнениями (уреоинфекция, инфекция нижних дыхательных путей) антибактериальную терапию получал 21 пациент (табл. 1). Кроме того, всем пациентам назначали комплексный препарат (метаболит), содержащий в своем составе активные метаболиты *Bacillus subtilis*, сорбент и пребиотический компонент.

У пациентов оценивали уровень сознания (вегетативное состояние, сохранное сознание), неврологический статус по шкале комы Глазго (ШКГ) (15 баллов — ясное сознание, 14–13 баллов — оглушение, 12–9 баллов — сопор, 8–6 баллов — кома), назначение антибактериальных препаратов в день отбора биоматериала.

Отбор образцов клинического материала

По одному образцу кишечного содержимого и венозной крови собирали в день поступления (до начала антибактериальной терапии) и затем на каждые седьмые сутки в динамике до момента перевода из ОРИТ (2–7 образцов от одного пациента). Сбор, транспортирование и хранение клинического материала проводили в строгом соответствии с методическими рекомендациями [20]. Взятие кишечного содержимого производили в одноразовый стерильный контейнер. Контейнеры доставляли в лабораторию и хранили до начала исследования при +2–8 °С. Время от взятия материала до начала исследования не превышало 24 ч. Для выделения ДНК использовали супернатант: 0,1 г кишечного содержимого смешивали с 800 мкл изотонического раствора и перемешивали на вортексе до получения гомогенной суспензии; полученную смесь центрифугировали в течение 30 с при 12 045 g.

Таблица 1. Обследуемые пациенты. ИВЛ — искусственная вентиляция легких, ТСТ — трахеостомическая трубка, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ЧМТ — черепно-мозговая травма

Пациенты в вегетативном состоянии (n = 10)					
Пациент	Возраст/пол	Диагноз	Дыхание	Антибактериальная терапия	ШКГ
1	40 / ж	Аноксическое повреждение головного мозга	ИВЛ	Оксазолидинон (линезолид), цефалоспорины, карбапенемы	9
2	64 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, гликопептиды (ванкомицин)	10
3	32 / ж	Послеоперационные осложнения	ИВЛ, ТСТ	Фосфомицины (монурал), карбапенемы, аминогликозиды, гликопептиды (ванкомицин)	12–15
4	61 / ж	ОНМК	ТСТ	Нитрофураны (макмирор), карбапенемы, гликопептиды, рифампицин	13
5	38 / ж	ОНМК	ИВЛ	Карбапенемы	6
6	31 / ж	ЧМТ	ТСТ	–	13–15
7	69 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Карбапенемы, аминогликозиды, тетрациклины	9–12
8	51 / м	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, гликопептиды (ванкомицин), тетрациклины	13
9	62 / м	Послеоперационные осложнения	ИВЛ, ТСТ	Гликопептиды (ванкомицин), аминогликозиды, цефалоспорины, фосфомицины (монурал)	9–14
10	26 / ж	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, тетрациклины, гликопептиды (ванкомицин), сульфаниламиды	10–12
Пациенты с сохранным сознанием (n = 19)					
1	26 / м	ОНМК	ТСТ	Макролиды, гликопептиды	15
2	56 / м	Аноксическое повреждение головного мозга	ТСТ	–	15
3	58 / ж	ОНМК	ТСТ	–	15
4	60 / м	ОНМК	ТСТ	Нитрофураны, энтерол	15
5	22 / ж	ЧМТ	ТСТ	–	15
6	42 / ж	ОНМК	ТСТ	–	–
7	20 / м	ЧМТ	ТСТ	Цефалоспорины	–
8	63 / ж	ОНМК	ТСТ	Карбапенемы, аминогликозиды	12–14
9	74 / м	ОНМК	ТСТ	–	14
10	32 / м	Послеоперационные осложнения	ТСТ	–	15
11	44 / м	Аноксическое повреждение головного мозга	ТСТ	Карбапенемы, тетрациклины	15
12	69 / ж	ЧМТ	ИВЛ	–	13
13	58 / м	ОНМК	ТСТ	Фторхинолоны, аминогликозиды	14–15
14	74 / м	ОНМК	ИВЛ	Аминогликозиды, сульфаниламиды, нитрофураны, тетрациклины, цефалоспорин, противогрибковые	10
15	76 / м	ОНМК	ТСТ	Цефалоспорины, гликопептиды, фосфомицины	10–14
16	72 / ж	Послеоперационные осложнения	ИВЛ	Карбапенемы, гликопептиды, противогрибковые	14
17	23 / ж	ЧМТ	ТСТ	Карбапенемы, гликопептиды	15
18	51 / ж	ОНМК	ИВЛ, ТСТ	Цефалоспорины, гликопептиды, аминогликозиды	11–15
19	57 / м	ОНМК	ТСТ	Тетрациклины, карбапенемы, гликопептиды	10

Дальнейшее исследование проводили согласно протоколу, представленному в наборе тест-системы Колонофлор-16 («АльфаЛаб»; Россия). Взятие крови производили из венозного катетера в пробирку без антикоагулянта. Образцы сыворотки получали путем центрифугирования венозной крови при 1500 g в течение 10 мин. Сыворотку разливали по 500 мкл в одноразовые пробирки типа эппендорф, замораживали и хранили до начала исследования при –20 °С.

Оценка таксономического состава микробиоты кишечника

Для оценки использовали отечественную тест-систему «Колонофлор-16» («АльфаЛаб»; Россия), которая включает

реагенты для выделения ДНК, смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для ДНК всех бактерий (общая бактериальная масса), смеси для амплификации, специфичные для каждого выявленного вида (или группы) бактерий. Измерения проводили на амплификаторе планшетного типа CFX 96 (BioRad; США).

Определение биомаркеров сыворотки крови

Образцы сыворотки крови в объеме 200 мкл использовали для определения концентраций: NSE, белка S100, прокальцитонина (PCT), IL6 и кортизола с использованием соответствующих наборов реактивов (Roche Diagnostics; Швейцария). Измерение биомаркеров проводили на

Таблица 2. Сравнение таксономического состава микробиоты кишечника в группах пациентов в зависимости от антибиотикотерапии (АБТ) на момент взятия биоматериала

Показатель	Референсные значения	Пациенты, медиана (25%-й квартиль; 75%-й квартиль)	
		Получали АБТ (<i>n</i> = 19)	Не получали АБТ (<i>n</i> = 21)
Общая бактериальная масса	$< 10^{12}$	2×10^{12} (3×10^{11} – 8×10^{12})	$2,5 \times 10^{12}$ (2×10^{11} – 10^{13})
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^7 – 10^8	4×10^7 (2×10^6 – 10^9)	3×10^7 (7×10^6 – $6,5 \times 10^9$)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^9 – 10^{10}	4×10^8 (3×10^8 – 3×10^{10})	9×10^8 ($9,5 \times 10^7$ – $8,5 \times 10^9$)
<i>Escherichia coli</i>	10^7 – 10^8	5×10^8 (7×10^7 – 3×10^9)	3×10^8 ($4,5 \times 10^7$ – $3,5 \times 10^9$)
<i>Bacteroides fragilis group</i>	10^9 – 10^{12}	$1,5 \times 10^{12}$ (2×10^{11} – 8×10^{12})	4×10^{12} (3×10^{11} – 10^{13})
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8 – 10^{11}	5×10^7 ($9,5 \times 10^6$ – 6×10^9)	10^8 (10^7 – 3×10^{10})
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$< 10^4$	3×10^6 (2×10^5 – 10^8)	6×10^5 (2×10^5 – 10^9)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$< 10^4$	$1,5 \times 10^{11}$ (2×10^6 – 10^{13})	2×10^{14} ($1,1 \times 10^6$ – $4,5 \times 10^{14}$)
<i>Candida spp.</i>	$< 10^4$	2×10^7 (6×10^6 – 5×10^7)	2×10^7 (7×10^6 – 2×10^7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 10^4$	4×10^8 (3×10^7 – 6×10^{11})	2×10^8 (3×10^7 – 10^9)
<i>Enterococcus spp.</i>	$< 10^8$	8×10^5 (7×10^5 – 9×10^6)	$1,2 \times 10^6$ (2×10^5 – 2×10^6)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	10^9 – 10^{12}	6×10^8 (2×10^7 – 4×10^9)	$2,5 \times 10^8$ ($2,5 \times 10^7$ – 2×10^9)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$< 10^{11}$	8×10^8 (10^7 – 3×10^9)	$5,1 \times 10^8$ ($5,1 \times 10^7$ – $5,5 \times 10^9$)
<i>Clostridium difficile</i>	–	2×10^8 (10^7 – 2×10^9)	4×10^7 (2×10^5 – 10^9)
<i>Clostridium perfringens</i>	–	–	6×10^5 (6×10^5 – 2×10^6)
<i>Proteus spp.</i>	$< 10^4$	10^9 ($2,5 \times 10^8$ – 2×10^{10})	$6,5 \times 10^8$ (10^8 – 10^{10})
<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Citrobacter spp.</i>	$< 10^4$	$4,5 \times 10^7$ ($6,5 \times 10^6$ – $6,5 \times 10^8$)	5×10^8 (2×10^7 – 4×10^9)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	–	2×10^7 (5×10^6 – 2×10^8)	$1,95 \times 10^6$ (3×10^5 – $4,5 \times 10^7$)
<i>Parvimonas micra</i>	–	$2,55 \times 10^8$ ($7,5 \times 10^6$ – 10^{14})	10^7 (2×10^5 – 2×10^{12})
Отношение <i>Bacteroides fragilis group</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,1–100	5000 (100–100 000)	667 (100–15 000)

автоматическом электрохемилюминисцентном анализаторе Cobas e411 (Roche; Швейцария).

Определение концентраций альбумина и СРБ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе AU 480 (Beckman Coulter; США) с применением оригинальных реагентов.

Данные представлены в виде медианы, 25 и 75%-го квартилей. При сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни; корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Все полученные различия в группах считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием Statistica 13.0 (Stat Soft Inc.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 29 пациентов (см. табл. 1). Особенности течения ХКС, независимо от первичной нозологической формы, позволили объединить разнородных пациентов с тяжелым поражением ЦНС в общую группу исследования. Анализ микробиоты кишечника пациентов в зависимости от проводимой антибактериальной терапии (АБТ) не выявил статистически значимых различий между группами пациентов (табл. 2). Поэтому в дальнейшем при сопоставлении групп пациентов мы ориентировались на неврологическую оценку.

По уровню сознания пациентов разделили на две группы (см. табл. 1) согласно общепринятым критериям [21]: пациенты в вегетативном состоянии или с минимальным сознанием ($n = 10$); пациенты в сознании, имевшие грубые когнитивные и психические нарушения ($n = 19$), что является одним из признаков ХКС. Группы были сопоставимы по возрасту (табл. 3).

При исследовании таксономического состава микробиоты кишечника в группах пациентов в ХКС методом ПЦР-РВ обнаружены следующие особенности (рис. 1):

- общая бактериальная масса сопоставима с референсными значениями, рекомендованными производителем;

- в составе микробиоты пациентов присутствуют *Clostridium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, которых в норме не обнаруживают;

- логарифмы концентраций (lg КОЕ/г) шести видов микроорганизмов (*Klebsiella spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* / *Citrobacter spp.*) значительно превышают референсные значения в 1,5–2 раза;

- уровень *Bacteroides thetaiotaomicron* снижен по сравнению с референсными значениями;

- достоверные различия между группами пациентов по уровню сознания выявлены для *F. prausnitzii* ($p = 0,015$).

Значения таких сывороточных биомаркеров, как кортизол, СРБ, альбумин и коэффициент СРБ/альбумин, статистически значимо различались в двух исследуемых группах (см. табл. 3). Уровень РСТ не превышал референсные значения ни у пациентов с сохранным сознанием, ни у пациентов в вегетативном состоянии, но различия между двумя этими группами были достоверными ($p = 0,009$) (см. табл. 3).

При оценке степени нарушения сознания по ШКГ образцы пациентов были разделены на три группы, в соответствии с балльной оценкой: 15 баллов — ясное сознание ($n = 37$), 14–13 баллов — оглушение ($n = 33$), 12–6 баллов — сопор/кома ($n = 40$). Выявлены статистически значимые различия в уровнях коэффициента СРБ/альбумин (см. рис. 2), кортизола и IL6 (рис. 3).

Таблица 3. Сравнение показателей у пациентов в ХКС

Показатель, единица измерения	Референсные значения	Пациенты, медиана (25%-й квартиль; 75%-й квартиль)		p
		С сохранным сознанием (n = 19)	В вегетативном состоянии (n = 10)	
Возраст, лет	–	57 (32–69)	51 (38–62)	0,82
PCT, нг/мл*	<0,25	0,058 (0,039–0,095)	0,107 (0,08–0,177)	0,009
Кортизол, нмоль/л*	166–507	367 (244–623)	682 (492–816)	0,001
ИЛ-6, пг/мл	<7	31 (15–47)	35 (14–67)	0,293
S100, мкг/л	<0,1	0,097 (0,05–0,16)	0,105 (0,06–0,19)	0,423
NSE, нг/мл	15,7–17	17,8 (12,8–23)	15,2 (9,7–22)	0,248
СРБ, мг/л*	<5	35 (18–78)	76 (33–147)	0,004
Альбумин, г/л*	35–55	33 (28–35)	28 (25–35)	0,038
СРБ/альбумин, отн. ед.*	<1	1,2 (0,5–2,2)	2,5 (0,9–5,8)	0,003

Примечание: * — статистически значимые различия.

Для выявления связи в системе «кишечник–мозг» провели корреляционный анализ уровней сывороточных биомаркеров и представителей микробиоты кишечника. В группе пациентов в вегетативном состоянии выявили статистически значимые обратные корреляции кортизола с *F. prausnitzii* ($r = -0,62$) и с *B. thetaiotaomicron* ($r = -0,57$). В группе пациентов с сохранным сознанием обнаружены прямые корреляции коэффициента СРБ/альбумин с *S. aureus* ($r = 0,72$), *B. fragilis* group/*F. prausnitzii* с S100 ($r = 0,45$).

С помощью корреляционного анализа была выявлена сильная обратная связь уровня *Enterococcus spp.* со значениями ШКГ ($r = -0,77$; $p \leq 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования подтвердили, что состав микробиоты кишечника у пациентов в ХКС существенно отличается от референсных значений независимо от неврологического статуса. Дисбиотические нарушения у пациентов в ХКС выражены повышенными уровнями представителей типа *Proteobacteria*, грибов рода *Candida spp.*, условно-патогенных видов *Firmicutes* и *Bacteroides*, а также сокращением численности комменсальной микробиоты

(см. рис. 1), являющейся продуцентом низкомолекулярных метаболитов (*F. prausnitzii*), что соотносится с результатами работ, проведенных с использованием технологий секвенирования микробиоты кишечника по 16S РНК у пациентов, находящихся в ОРИТ [22], а также у пациентов с повреждением головного мозга в критическом состоянии [23]. Так, у перенесших инсульт пациентов выраженный дисбиоз с преобладанием продуцентов короткоцепочечных жирных кислот, включая *Odoribacter* и *Akkermansia*, коррелировал с исходом заболевания [24]. Однако в указанном исследовании оценивали состав микробиоты в первые 48 ч после инсульта, и нами не найдено источников, в которых детально описан состав микробиоты при хронизации процесса, что подчеркивает новизну полученных результатов.

Анализ биомаркеров показал статистически значимые различия в уровнях кортизола, СРБ, альбумина и значении коэффициента СРБ/альбумин в группе пациентов с сохранным сознанием по сравнению с группой в вегетативном состоянии (см. табл. 3). Обнаружены статистически значимые корреляции биомаркеров с уровнем некоторых представителей микробиоты кишечника, что подтверждает концепцию о наличии

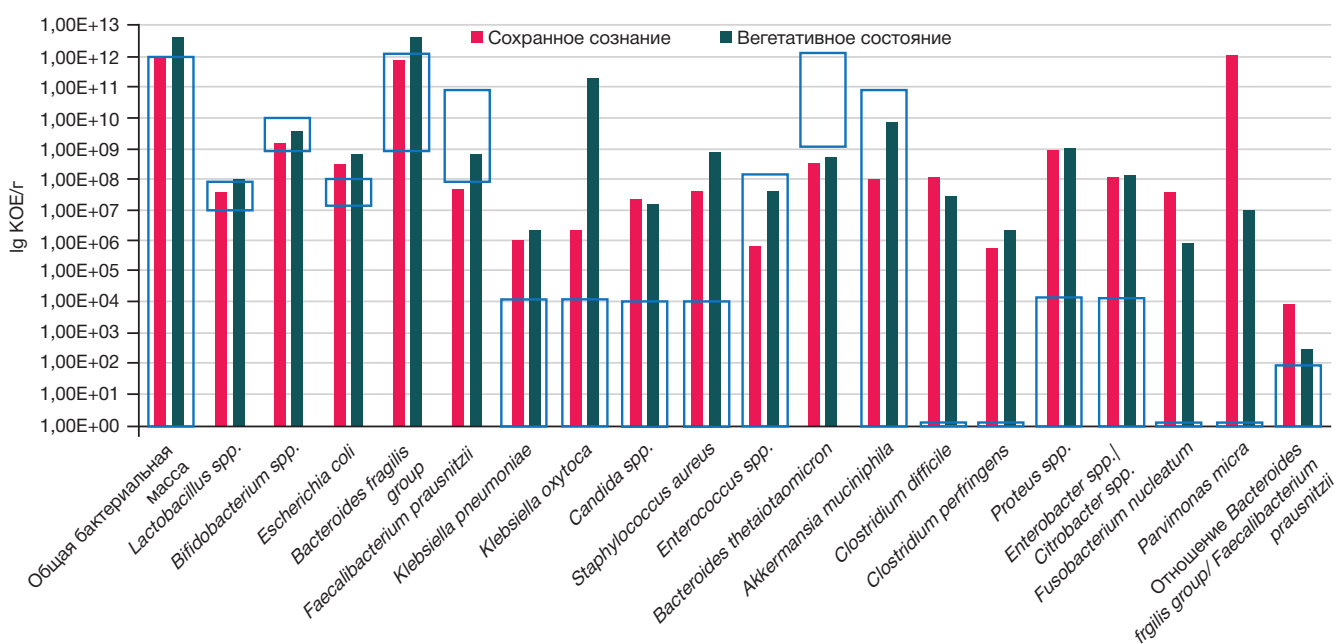


Рис. 1. Сравнение таксономического состава микробиоты кишечника между группами пациентов в сознании (n = 19) и в вегетативном состоянии (n = 10) с референсными значениями (синие рамки), рекомендованными производителем, по 20 показателям

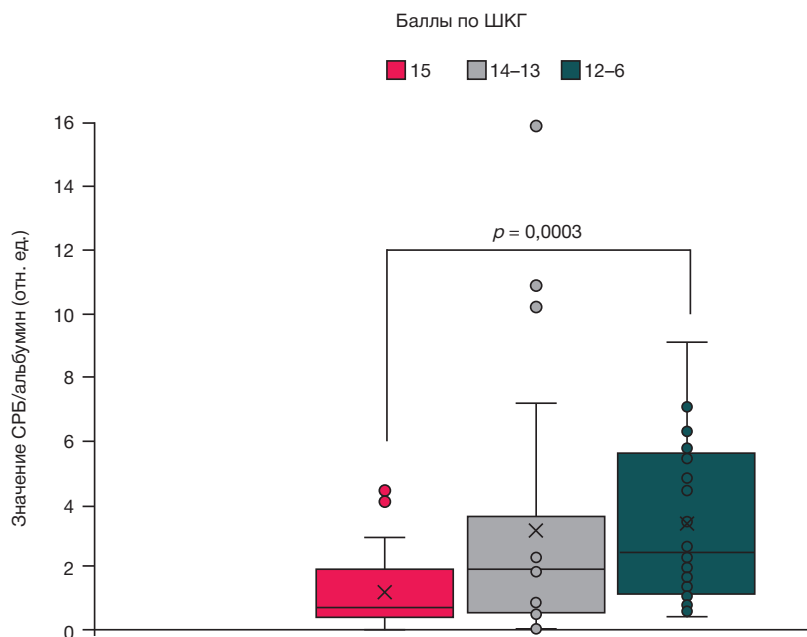


Рис. 2. Значение коэффициента СРБ/альбумин в зависимости от баллов ШКГ ($p < 0,05$ при сравнении между группами в 15 и 12–6 баллов по ШКГ)

связи состава и численности микробиоты кишечника с поражением ЦНС. Выявленные обратные корреляции уровня кортизола с уровнем *F. prausnitzii* и *B. thetaiotaomicron* у пациентов в вегетативном состоянии согласуются с данными более ранних исследований, в которых обнаружено, что сокращение численности указанных таксонов приводит к уменьшению нейропротективных функций микробиоты и, как следствие, повреждению нервной ткани [25], смещению иммунореактивности в сторону развития воспаления и аутоиммунных процессов [26]. Повышение уровня кортизола, в свою очередь, отрицательно сказывается на метаболических процессах в организме пациентов в критическом состоянии, смещая равновесие в сторону катаболизма и способствуя развитию синдрома гиперметаболизма-гиперкатаболизма [27, 28].

В проведенном нами исследовании уровни кортизола, СРБ и значение коэффициента СРБ/альбумин у пациентов в вегетативном состоянии были практически вдвое выше, а уровень альбумина — ниже, что свидетельствует о более выраженных воспалительных и катаболических явлениях у этой группы больных. Несмотря на

статистически значимые различия, уровень РСТ не превышал референсных значений в обеих группах, что может свидетельствовать об асептическом воспалении, не связанном с системной бактериальной инфекцией (см. табл. 3).

Коэффициент СРБ/альбумин широко изучают в последнее время как комбинацию маркеров, отражающих системное воспаление и нутритивный статус, и как независимый прогностический маркер у пациентов с инфекцией, злокачественными новообразованиями, в том числе и у пациентов ОРПТ [10, 29, 30]. Нами показано, что у пациентов в ХКС коэффициент СРБ/альбумин отражает степень нарушения сознания по ШКГ (см. рис. 2) и коррелирует с уровнем условно-патогенного представителя микробиоты *S. aureus*. Биомаркеры S100 и NSE принято рассматривать как маркеры острого повреждения нервной ткани [31]. У пациентов в ХКС их уровни изменялись незначительно, не выходя за пределы референсного интервала, что может отражать хронический характер повреждения ткани головного мозга. Обнаруженная прямая корреляция S100 с отношением *Bacteroides fragilis* к *Faecalibacterium prausnitzii*

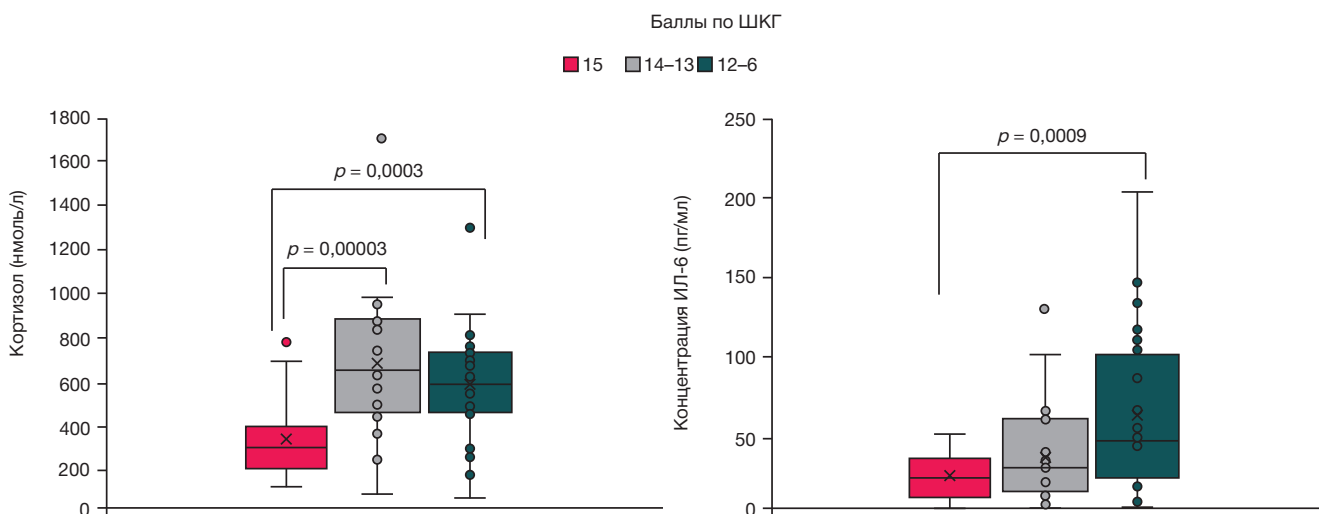


Рис. 3. Концентрация ИЛ-6 и кортизола в сыворотке крови пациентов в зависимости от баллов по ШКГ ($p < 0,05$ при сравнении между группами в 15 и 14–13, 15 и 12–6 баллов по ШКГ)

как потенциального биомаркера дисбиоза кишечника провоспалительного типа и сильная обратная корреляция ШКГ с уровнем *Enterococcus spp.* подтверждают связь дисбиотических нарушений с дисфункцией головного мозга. Однако связь между изученными таксонами микробиоты кишечника, неврологическими маркерами и степенью неврологического дефицита до конца не ясна и требует углубленного изучения. В опубликованной литературе нам не встретились данные о корреляционной связи между изучаемыми таксонами микробиоты и сывороточными биомаркерами при ХКС.

Таким образом, у пациентов с дисфункцией мозга в ХКС микробиота кишечника подвергается изменениям, позволяющим считать ее «поврежденным органом». Небольшое число наблюдений не позволило оценить вклад антибактериальных препаратов в развитие нарушений таксономического состава микробиоты кишечника ввиду выраженных различий индивидуальных схем АБТ у обследованных пациентов. Однако комплексный подход с применением современных технологий может

способствовать оптимизации АБТ, что является задачей дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов в ХКС выявлены выраженные нарушения таксономического состава микробиоты кишечника независимо от тяжести поражения ЦНС.
2. Обнаруженные статистически значимые корреляции биомаркеров с ШКГ и некоторыми представителями микробиоты свидетельствуют в пользу концепции о связи между численностью и составом микробиоты кишечника и поражением ЦНС.
3. Применение комплексной ПЦР-диагностики позволяет проводить динамическую оценку таксономического состава микробиоты кишечника в кратчайшие сроки.
4. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения важной роли микробиоты кишечника в патогенезе неврологического дефицита. Целенаправленная коррекция микробиоты может повысить эффективность нейрореабилитации даже у пациентов с тяжелыми повреждениями головного мозга.

Литература

1. Nelson JE, Cox C.E., Hope A.A., Carson S.S. Chronic critical illness. Am J Respir Crit Care Med. 2010; 182 (4): 446–54.
2. Белобородова Н. В. Метаболизм микробиоты при критических состояниях (обзор и постулаты). Общая реаниматология. 2019; 15 (6): 62–79.
3. Парфёнов А. Л., Петрова М. В., Соловьёва Н. Н., Степанюк Т. А., Зачепилова К. О., Саидов Ш. Х., и др. Белково-энергетическая недостаточность и структура летальности у пациентов в хроническом критическом состоянии. Здоровье и образование в XXI веке. 2018; 20 (8): 55–60.
4. Cox CE. Persistent systemic inflammation in chronic critical illness. Respir Care. 2012; 57 (6): 859–66.
5. Duda I, Krzych Ł, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Serum levels of the S100B protein and neuron-specific enolase are associated with mortality in critically ill patients. Acta Biochimica Polonica. 2017; 64 (4): 681–52.
6. Белобородова Н. В., Острова И. В. Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (обзор). Общая реаниматология. 2017; 13 (5): 121–39.
7. Thomas PAW, Moffatt CE, Rudd D, Marshman LAG. S-100 β in chronic subdural haematoma: Prospective cohort study. J Clin Neurosci. 2019; 67: 145–50.
8. Shaik AJ, Reddy K, Mohammed N, Tandra SR, Rukmini MK, Baba KS. Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury. Neurochem Int. 2019; 131: 104509.
9. Kiiski H, Långsjö J, Tenhunen J, Ala-Peijari M, Huhtala H, Hämäläinen M, et al. Time-courses of plasma IL-6 and HMGB-1 reflect initial severity of clinical presentation but do not predict poor neurologic outcome following subarachnoid hemorrhage. eNeurologicalSci. 2017; 6: 55–62.
10. Park JE, Chung KS, Song JH, Kim SY, Kim EY, Jung JY, et al. The C-reactive protein/albumin ratio as a predictor of mortality in critically ill patients. J Clin Med. 2018; 7 (10): 333.
11. Giau VV, Wu SY, Jamerlan A, Soo SA, Kim AN, Sang YK, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in Alzheimer's disease. 2018; 10 (11): 1765.
12. Kohler J, Borchers F, Endres M, Weiss B, Spies C, Emmrich JV. Cognitive deficits following intensive care. Dtsch Arztebl Int. 2019; 116 (38): 627–34.
13. Meng M, Klingensmith NJ, Coopersmith CM. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. Curr Opin Crit Care. 2017; 23 (2): 143–8.
14. Otani S, Coopersmith CM. Gut integrity in critical illness. J Intensive Care. 2019; 20 (7): 7.
15. Парфёнов А. Л., Петрова М. В., Пичугина И. М., Лугинина Е. В. Формирование коморбидности у пациентов с тяжелым повреждением мозга и исходом в хроническое критическое состояние (обзор). Общая реаниматология. 2020; 16 (4): 72–89.
16. Levy H, Hayes J, Boivin M, Tomba T. Transpyloric feeding tube placement in critically ill patients using electromyogram and ery-thromycin infusion. Chest. 2004; 125 (2): 587–91.
17. Луфт В. М. Современные возможности нутриционной поддержки больных в интенсивной медицине. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2010; 7 (5): 42–51.
18. Cherevskaya E, Beloborodova N, Klimenko N, Pautova A, Shilkin D, Gusarov V, et al. Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study. Crit Care. 2020; 24: 312.
19. Kurina I, Popenko A, Klimenko N, Koshechkin S, Chuprikova L, Filipenko M, et al. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. Mol Cell Probes. 2020; 52: 101570.
20. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09. Москва, 2009. Доступно по ссылке: <http://docs.cntd.ru/document/1200077791>.
21. Кондратьева Е. А., Авдюнина И. А., Кондратьев А. Н., Улитин А. Ю., Иванова Н. Е., Петрова М. В., и др. Определение признаков сознания и прогнозирования исхода у пациентов в вегетативном состоянии. Вестник ПАМН. 2016; 71 (4): 273–80.
22. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsher B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. mBio. 2014; 5 (5): e01361–14.
23. Ravi A, Halstead FD, Bamford A, Casey A, Thomson NM, Schaik W, et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. Microb Genom. 2019; 5 (9): e000293.
24. Li N, Wang X, Sun C, Wu X, Lu M, Si Y, et al. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients. BMC Microbiol. 2019; 19 (1): 191.
25. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. Nature Medicine. 2016; 22 (5): 516–23.
26. Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Демьянова Е. В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. Альманах клинической медицины. 2018; 46 (5): 396–425.

27. Селиванова А. В., Яковлев В. Н., Мороз В. В., Марченков Ю. В., Алексеев В. Г. Изменения гормонально-метаболических показателей у пациентов, находящихся в критическом состоянии. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (5).
 28. Рябов Г. А. Энергетический метаболизм при неотложных состояниях. В книге: Ермолова А. С., Абакумова М. М., редакторы. Искусственное питание в неотложной хирургии и травматологии. Москва: НИИ СП им. Н. В. Склифосовского, 2001; с. 21–82.
 29. Llop-Talaveron J, Badia-Tahull MB, Leiva-Badosa E. An inflammation-based prognostic score, the C-reactive protein/albumin ratio predicts the morbidity and mortality of patients on parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2018; 37 (5): 1575–83.
 30. Oh TK, Song IA, Lee J.H. Clinical usefulness of C-reactive protein to albumin ratio in predicting 30-day mortality in critically ill patients: A retrospective analysis. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14977.
 31. Голубев А. М., Петрова М. В., Гречко А. В., Захарченко В. Е., Кузовлев А. Н., Ершов А. В. Молекулярные маркеры ишемического инсульта. *Общая реаниматология*. 2019; 15 (5): 11–22.
- References**
1. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic critical illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182 (4): 446–54.
 2. Beloborodova NV. Metabolizm mikrobioty pri kriticheskikh sostojaniyah (obzor i postulaty). *Obshhaja reanimatologija*. 2019; 15 (6): 62–79. Russian.
 3. Parfjonov AL, Petrova MV, Solovjova NN, Stepanjuk TA, Zachepilova K O, Saidov ShH, i dr. Belkovo-jenergeticheskaja nedostatochnost' i struktura letal'nosti u pacientov v hronicheskom kriticheskom sostojanii. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2018; 20 (8): 55–60. Russian.
 4. Cox CE. Persistent systemic inflammation in chronic critical illness. *Respir Care*. 2012; 57 (6): 859–66.
 5. Duda I, Krzych Ł, Jędrzejowska-Szypułka H, Lewin-Kowalik J. Serum levels of the S100B protein and neuron-specific enolase are associated with mortality in critically ill patients. *Acta Biochimica Polonica*. 2017; 64 (4): 681–52.
 6. Beloborodova NV, Ostrova IV. Sepsis-associirovannaja jencefalopatiya (obzor). *Obshhaja reanimatologija*. 2017; 13 (5): 121–39. Russian.
 7. Thomas PAW, Moffatt CE, Rudd D, Marshman LAG. S-100β in chronic subdural haematoma: Prospective cohort study. *J Clin Neurosci*. 2019; 67: 145–50.
 8. Shaik AJ, Reddy K, Mohammed N, Tandra SR, Rukmini MK, Baba KS. Neuron specific enolase as a marker of seizure related neuronal injury. *Neurochem Int*. 2019; 131: 104509.
 9. Kiiski H, Långsjö J, Tenhunen J, Ala-Peijari M, Huhtala H, Hämäläinen M, et al. Time-courses of plasma IL-6 and HMGB-1 reflect initial severity of clinical presentation but do not predict poor neurologic outcome following subarachnoid hemorrhage. *eNeurologicalSci*. 2017; 6: 55–62.
 10. Park JE, Chung KS, Song JH, Kim SY, Kim EY, Jung JY, et al. The C-reactive protein/albumin ratio as a predictor of mortality in critically ill patients. *J Clin Med*. 2018; 7 (10): 333.
 11. Giau VV, Wu SY, Jamerlan A, Soo SA, Kim AN, Sang YK, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in Alzheimer's disease. 2018; 10 (11): 1765.
 12. Kohler J, Borchers F, Endres M, Weiss B, Spies C, Emmrich JV. Cognitive deficits following intensive care. *Dtsch Arztebl Int*. 2019; 116 (38): 627–34.
 13. Meng M, Klingensmith NJ, Coopersmith CM. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. *Curr Opin Crit Care*. 2017; 23 (2): 143–8.
 14. Otani S, Coopersmith CM. Gut integrity in critical illness. *J Intensive Care*. 2019; 20 (7): 7.
 15. Parfenov AL, Petrova MV, Pichugina IM, Luginina EV. Comorbidity Development in Patients with Severe Brain Injury Resulting in Chronic Critical Condition (Review). *General Reanimatology*. 2020; 16 (4): 72–89.
 16. Levy H, Hayes J, Boivin M, Tomba T. Transpyloric feeding tube placement in critically ill patients using electromyogram and erythromycin infusion. *Chest*. 2004; 125 (2): 587–91.
 17. Luft V. M. Sovremennye vozmozhnosti nutricionnoj podderzhki bol'nyh v intensivnoj medicine. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2010; 7 (5): 42–51.
 18. Chernetskaya E, Beloborodova N, Klimenko N, Pautova A, Shilkin D, Gusarov V, et al. Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study. *Crit Care*. 2020; 24: 312.
 19. Kurina I, Popenko A, Klimenko N, Koshechkin S, Chuprikova L, Filipenko M, et al. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Mol Cell Probes*. 2020; 52: 101570.
 20. Metodicheskie ukazaniya «Organizacija raboty laboratorij, ispol'zujushih metody amplifikacii nukleinovyh kislot pri rabote s materialom, soderzhashhim mikroorganizmy I-IV grupp patogenosti» MU 1.3.2569-09. Moskva, 2009. Available from: <http://docs.cntd.ru/document/1200077791>. Russian.
 21. Kondratyeva EA, Avdjunina IA, Kondratyev AN, Ulitin AYU, Ivanova NE, Petrova MV, i dr. Opredelenie priznakov soznaniya i prognozirovaniya ishoda u pacientov v vegetativnom sostojanii. *Vestnik RAMN*. 2016; 71 (4): 273–80. Russian.
 22. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsher B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio*. 2014; 5 (5): e01361–14.
 23. Ravi A, Halstead FD, Bamford A, Casey A, Thomson NM, Schaik W, et al. Loss of microbial diversity and pathogen domination of the gut microbiota in critically ill patients. *Microb Genom*. 2019; 5 (9): e000293.
 24. Li N, Wang X, Sun C, Wu X, Lu M, Si Y, et al. Change of intestinal microbiota in cerebral ischemic stroke patients. *BMC Microbiol*. 2019; 19 (1): 191.
 25. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal γδ T cells. *Nature Medicine*. 2016; 22 (5): 516–23.
 26. Sitkin SI, Vahitov TYa, Demjanova EV. Mikrobiom, disbioz tolstoj kishki i vospalitel'nye zabolevaniya kishhechnika: kogda funkciya vazhnee taksonomii. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2018; 46 (5): 396–425. Russian.
 27. Selivanova AV, Yakovlev VN, Moroz VV, Marchenkov YuV, Alekseev VG. Izmeneniya gormonal'no-metabolicheskikh pokazatelej u pacientov, nahodjashchih'sja v kriticheskom sostojanii. *Obshhaja reanimatologija*. 2012; 8 (5). Russian.
 28. Ryabov GA. Jenergeticheskij metabolizm pri neotlozhnyh sostojaniyah. V knige: Ermolova AS, Abakumova MM, redaktory. *Iskusstvennoe pitanie v neotlozhnoj hirurgii i travmatologii*. Moskva: NII SP im. NV Sklifosovskogo, 2001; c. 21–82. Russian.
 29. Llop-Talaveron J, Badia-Tahull MB, Leiva-Badosa E. An inflammation-based prognostic score, the C-reactive protein/albumin ratio predicts the morbidity and mortality of patients on parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2018; 37 (5): 1575–83.
 30. Oh TK, Song IA, Lee J.H. Clinical usefulness of C-reactive protein to albumin ratio in predicting 30-day mortality in critically ill patients: A retrospective analysis. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14977.
 31. Golubev AM, Petrova MV, Grechko AV, Zaharchenko VE, Kuzovlev AN, Ershov AV. Molekuljarnye markery ishemicheskogo insul'ta. *Obshhaja reanimatologija*. 2019; 15 (5): 11–22. Russian.

МИКРОБИОТА ЭЯКУЛЯТА: КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Е. С. Ворошилина^{1,2}✉, Д. Л. Зорников¹, А. В. Иванов^{3,4}, Д. Г. Почерников⁵, Е. А. Паначева^{1,2}

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

⁴ Институт математики и механики имени Н. Н. Красовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

⁵ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

Микробиота эякулята до сих пор недостаточно изучена, а клиническая значимость выявления отдельных групп микроорганизмов окончательно не установлена. Целью работы было провести кластерный анализ микробиоты эякулята, выявленной методом ПЦР-РВ. С помощью теста «Андрофлор» («ДНК-Технология») исследовали 634 образца эякулята мужчин репродуктивного возраста. Микробную ДНК в количестве не менее 10³ ГЭ/мл обнаружили в 460 (72,5%) образцов. В 350 (55,2%) пробах выявили от 1 до 14 групп микроорганизмов в надпороговых значениях (частота выявления отдельных групп составила 3,3–21,0%). Среди 350 образцов выделили четыре устойчивых кластера микробиоты, в каждом из которых преобладала определенная группа микроорганизмов: облигатных анаэробов (кластер 1, $n = 172$; частота выявления — 49,1%), *Lactobacillus* spp. (кластер 2, $n = 78$; частота выявления — 22,3%), грамположительных факультативных анаэробов (кластер 3, $n = 62$; частота выявления — 17,7%), *Enterobacteriaceae*/*Enterococcus* (кластер 4, $n = 38$; частота выявления — 10,9%). Кластер 1 характеризовался меньшей устойчивостью и большим видовым разнообразием в сравнении с другими кластерами.

Ключевые слова: микробиота эякулята, ПЦР-РВ, кластерный анализ, спермограмма

Благодарности: авторы благодарят директора медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург) В. Н. Хаятина за возможность выполнения исследования на базе центра.

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — организация исследования, анализ данных, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ данных, написание статьи; А. В. Иванов — статистическая обработка, анализ данных, написание статьи; Д. Г. Почерников — клиническая характеристика пациентов, сбор клинических данных, анализ данных, написание статьи; Е. А. Паначева — анализ литературы, проведение ПЦР, анализ данных, написание статьи.

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

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

Статья получена: 21.09.2020 Статья принята к печати: 08.10.2020 Опубликована онлайн: 27.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.064

SEMEN MICROBIOTA: CLUSTER ANALYSIS OF REAL-TIME PCR DATA

Voroshilina ES^{1,2}✉, Zornikov DL¹, Ivanov AV³, Pochernikov DG⁵, Panacheva EA^{1,2}

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

³ Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

⁴ Krasovskii Institute of Mathematics and Mechanics, Yekaterinburg, Russia

⁵ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia

To this day semen microbiota is still poorly understood, and clinical significance of detecting specific microorganism groups has not been clearly determined. The aim of this work was to conduct cluster analysis of semen microbiota detected using real-time PCR. 634 semen samples of reproductive age men were analyzed using the Androflor kit. Microbial DNA in the quantity of no less than 10³ GE/ml was detected in 460 samples (72.5%). From 1 to 14 microorganism groups were detected in 350 samples (55.2%) in the quantities that exceeded the threshold values (the detection rate of specific groups: 3.3–21.0%). In these 350 samples 4 stable microbiota clusters were determined. Each of the clusters was characterized by the prevalence of a specific microorganism group: obligate anaerobes (cluster 1; $n = 172$; detection rate — 49.1%), *Lactobacillus* spp. (cluster 2; $n = 78$; detection rate — 22.3%), gram-positive facultative anaerobes (cluster 3; $n = 62$; detection rate — 17.7%), *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus* (cluster 4; $n = 38$; detection rate — 10.9%). Cluster 1 was less stable and was characterized by the larger species diversity compared to other clusters.

Keywords: semen microbiota, real-time PCR, cluster analysis, semen analysis

Acknowledgments: the authors would like to thank VN Khayutin, director of "Garmonia" Medical Center, for allowing them to conduct the study in the clinic's laboratory department.

Author contribution: Voroshilina ES — organization of the study, data analysis, article authoring; Zornikov DL — data analysis, article authoring; Ivanov AV — statistical processing, data analysis, article authoring; Pochernikov DG — patients' clinical profile, clinical data collection, data analysis, article authoring; Panacheva EA — literature review, data analysis, conducting PCR tests, article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol № 7 of September 20, 2019). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

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

Received: 21.09.2020 Accepted: 08.10.2020 Published online: 27.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.064

В сравнении с микробиотой других биотопов тела человека, микробиота урогенитального тракта (УГТ) мужчин, в том числе семенной жидкости, до сих пор остается недостаточно изученной [1]. Долгое время эякулят у здоровых мужчин считали стерильной жидкостью, а обнаружение микроорганизмов (МО) ассоциировали с наличием патологии. Тем не менее недавние исследования демонстрируют наличие микробиоты в эякуляте, в том числе у пациентов без воспалительной патологии УГТ и с нормальными показателями спермограммы [1–7]. Было показано, что микробиота эякулята может быть представлена полимикробными сообществами из представителей разных родов и даже филумов бактерий [1, 2, 5, 7]. Некоторые авторы делают сдержанные выводы об ассоциации отдельных групп МО с нормой и патологией [1, 2, 5]. Часть исследователей считают, что именно наличие определенных ассоциаций МО, а не отдельных их видов, связано с развитием воспалительной патологии УГТ [4].

Данные результаты были получены благодаря внедрению молекулярно-генетических методов исследования, так как многие обнаруживаемые в эякуляте МО являются трудно- или некультивируемыми (в том числе облигатно анаэробные бактерии, редко выявляемые при рутинном культуральном исследовании) [4, 7, 8]. Однако клиническая значимость выявления данных групп МО в эякуляте окончательно не установлена.

В подавляющем большинстве работ по изучению микробиоты эякулята использовали метод NGS (целевой участок бактериального генома — ген 16S рРНК) [1–5, 7]. При высокой информативности этот подход обладает рядом недостатков: сложной пробоподготовкой, трудностью контроля взятия материала, длительной продолжительностью анализа, сложностью интерпретации результатов, высокой стоимостью приборной базы и реагентов для исследования. Данные недостатки делают практически невозможным применение NGS в рутинной врачебной практике. Для этой цели гораздо более удобен метод количественной ПЦР (ПЦР в реальном времени, или ПЦР-РВ). В нескольких предыдущих исследованиях была показана возможность использования коммерческого набора «Андрофлор» (набор для проведения ПЦР-РВ на 24 группы МО) для оценки микробиоты эякулята [9–11], в том числе его большая информативность в сравнении с культуральным исследованием [10]. При очевидных преимуществах ПЦР-РВ исследования эякулята перед другими микробиологическими методами главным сдерживающим фактором для его внедрения в рутинную практику является сложность практической интерпретации полученных результатов.

При культуральном исследовании клинически значимым порогом выявления условно-патогенной флоры является количество 10^3 КОЕ в 1 мл [12]. Высокая чувствительность молекулярных методов и способность выявлять некультивируемые и нежизнеспособные формы МО затрудняют использование аналогичных пороговых значений при интерпретации результатов, полученных методом ПЦР-РВ. Необходимо установить, насколько типично присутствие некультивируемых МО в надпороговых значениях в эякуляте в норме и при патологии. При выявлении нескольких групп МО требуется определить устойчивые типы бактериальных сообществ, ассоциированные с нарушениями фертильности у мужчин.

Для ответа на эти вопросы необходимо проведение комплексного анализа результатов молекулярно-биологических и клинических исследований эякулята

пациентов с нарушением фертильности и здоровых мужчин. Целью исследования было провести кластерный анализ микробиоты эякулята, выявленной методом ПЦР-РВ (тест «Андрофлор»).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы обследованных пациентов

В период с января 2019 г. по март 2020 г. были исследованы образцы эякулята 634 мужчин (средний возраст — $34 \pm 6,7$ года). Пациенты обратились в указанный период в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург, $n = 429$) и в урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии (г. Иваново, $n = 205$) по поводу бесплодия или для прегравидарной подготовки.

Критерии включения пациентов в исследование: мужчины репродуктивного возраста; наличие бесплодия или проведение прегравидарной подготовки; все обследуемые пациенты в течение последних четырех недель не получали вещества, способные повлиять на микробиом эякулята, такие как гормональные, антибактериальные препараты, а также вещества с содержанием алкоголя более 30 мл в пересчете на чистый этанол.

Критерии исключения из исследования: наличие гипогонадотропного и гипергонадотропного гипогонадизма, сахарного диабета 1-го и 2-го типов, гипо- и гипертиреоза; наличие инфекций, передающихся половым путем (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*); клинические проявления простатита, такие как боль и дизурия; наличие аномалий кариотипа, мутаций в гене CFTR, микроделеций в AZF-локусе Y-хромосомы.

Техника получения эякулята

Подготовка к сбору эякулята: половое воздержание в течение 2–5 дней. Сбор эякулята пациенты осуществляли после мочеиспускания путем мастурбации в стерильный контейнер, избегая касания стенок и крышки контейнера руками.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛЮС («ДНК-Технология»; Россия). Образцы эякулята подвергали предварительной обработке по следующей методике: 1,0 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1,0 мл транспортной среды («Транспортная среда с муколитиком», «ИнтерЛабСервис»; Россия), встряхивали на вортексе до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге Mini-Spin (Eppendorf; Германия). После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК.

Оценка микробиоты эякулята

Исследование проводили с использованием набора реагентов «Андрофлор» («ДНК-Технология»; Россия) в детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» согласно инструкции производителя. После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения («ДНК-Технология»; Россия) проводили автоматический расчет

количества общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл и каждого из условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в представленном образце (выражали в геномэквивалентах на 1 мл (ГЭ/мл)). Спектр определяемых набором МО представлен следующими группами: грамположительные факультативно-анаэробные МО (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp.); грамотрицательные факультативно-анаэробные МО (*Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp. / *Burkholderia* spp.); группа *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus* spp.; облигатно-анаэробные микроорганизмы (*Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp., *Atopobium* cluster), микоплазмы (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*), группа *Lactobacillus* spp., грибы рода *Candida*.

В качестве отрицательного контрольного образца использовали стерильную деионизированную воду. В отрицательном контрольном образце положительные сигналы по некоторым группам МО в ПЦР-РВ фиксировали не ранее 35 цикла амплификации (что соответствовало микробной нагрузке менее 10^3 ГЭ/мл). На основании этого значимым считали количество МО не менее 10^3 ГЭ/мл, что соответствовало положительному сигналу в ПЦР-РВ до 35 цикла. Исключение составляли *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в отрицательном контрольном образце отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам МО расценивали как положительный. Грибы рода *Candida* в данном исследовании не учитывали.

Статистические методы

Анализ структурных особенностей микробиоты эякулята проводили с использованием модели кластеризации MSSC, минимизирующей сумму по всем кластерам

внутрикластерных сумм квадратов расстояний от элементов кластеров до их центроидов [13]. Решение задачи кластеризации проводили с использованием алгоритма *k-means++* [14], реализованного в библиотеке машинного обучения *scikit-learn*. Выбор оптимальной кластеризации проводили на основе внутренних оценок качества кластеризации: индекса силуэта [15] и индекса Дэвиса–Болдуина [16]. Для оптимальной кластеризации исследована устойчивость кластеров к изменению размера выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота выявления отдельных групп МО

ОБМ в надпороговом количестве (не менее 10^3 ГЭ/мл) определяли в 460 (72,5%) из 634 проб. Из них в 110 (17,4%) образцах число всех отдельных групп МО было ниже установленного порога. В 174 (27,5%) пробах бактериальная ДНК присутствовала в количестве менее 10^3 ГЭ/мл.

В 350 (55,2%) образцах одновременно выявляли от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях. Частота выявления отдельных групп МО представлена в табл. 1.

Разные группы МО встречались во множестве ассоциаций друг с другом. Поэтому было принято решение провести кластерный анализ с целью определения характерных для эякулята микробных сообществ.

Кластерный анализ микробиоты эякулята

Для проведения кластерного анализа были отобраны 350 проб, отвечающие следующим критериям: ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл, как минимум одна группа МО не менее 10^3 ГЭ/мл.

Для запуска алгоритма кластеризации *k-means++* каждый исследуемый образец был представлен в виде вектора $(p, s) \in R^{50}$, состоящего из вектора первичных признаков $p \in R^{19}$, взятых из данных исследований микробиоты эякулята методом ПЦР-РВ, и вектора

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп МО в надпороговых значениях ($n = 634$)*

Группа МО	<i>n</i>	%
<i>Corynebacterium</i> spp.	133	21,0
<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	131	20,7
<i>Lactobacillus</i> spp.	125	19,7
<i>Eubacterium</i> spp.	108	17,0
<i>Peptostreptococcus</i> spp. / <i>Parvimonas</i> spp.	107	16,9
<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	94	14,8
<i>Streptococcus</i> spp.	81	12,8
<i>Enterobacteriaceae</i> spp. / <i>Enterococcus</i> spp.	74	11,7
<i>Anaerococcus</i> spp.	68	10,7
<i>Gardnerella vaginalis</i>	67	10,6
<i>Ureaplasma parvum</i>	63	9,9
<i>Atopobium</i> cluster	57	9,0
<i>Staphylococcus</i> spp.	52	8,2
<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	41	6,5
<i>Haemophilus</i> spp.	36	5,7
<i>Mycoplasma hominis</i>	25	3,9
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	24	3,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia</i> spp. / <i>Burkholderia</i> spp.	21	3,3

Примечание: * — для групп *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* надпороговые значения > 0 , для остальных групп МО $\geq 10^3$ ГЭ/мл

вторичных признаков $s \in R^{31}$, рассчитываемых на основе первичных признаков.

Первичными признаками являлись абсолютные значения показателей, определяемых тестом «Андрофлор» (ОБМ и 18 групп МО).

На основе первичных признаков были рассчитаны следующие вторичные признаки: скорректированная ОБМ (СОБМ), равная суммарной массе 18 определяемых групп МО; массовые доли МО по отношению к СОБМ; массы укрупненных в соответствии с компоновкой теста «Андрофлор» групп МО: *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов (ГПФА), облигатных анаэробов (ОА), грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА), *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* (ЕЕ) и микоплазм; массовые доли укрупненных групп МО по отношению к СОБМ.

Определение оптимального количества кластеров в исследуемом наборе данных проводили на основе значений индексов силуэта и Дэвиса–Болдуина (табл. 2). Наилучшему качеству кластеризации соответствуют наибольшее значение индекса силуэта и наименьшее значение индекса Дэвиса–Болдуина. В соответствии с полученными значениями индексов оптимальным было выделение четырех основных кластеров микробиоты эякулята.

Каждый из полученных кластеров отличался преобладанием определенной укрупненной группы МО. На рис. 1 представлены диаграммы размаха признаков объектов, попавших в соответствующий кластер.

Кластер 1 — вариант с преобладанием ОА. Абсолютное количество всех ОА было сопоставимо с ОБМ и составило в центроиде $10^{4,3}$ ГЭ/мл (рис. 1А). Доля ОА в центроиде достигала 82,8% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты определяли в 172 (49,1%) из 350 образцов.

Кластер 2 — вариант с преобладанием *Lactobacillus spp.* В образцах, отнесенных к данному кластеру, абсолютное количество *Lactobacillus spp.* было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{4,0}$ ГЭ/мл (рис. 1Б). Доля *Lactobacillus spp.* в центроиде достигала 80,9% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята идентифицировали в 78 (22,3%) из 350 образцов.

Кластер 3 — вариант с преобладанием ГПФА. Абсолютное количество всех ГПФА было сопоставимо с СОБМ и в центроиде составило $10^{3,6}$ ГЭ/мл (рис. 1В). Доля ГПФА в центроиде составила 89,4% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты выявляли в 62 (17,7%) из 350 образцов.

Кластер 4 — вариант с преобладанием группы ЕЕ. Абсолютное количество всех ЕЕ было ниже количества СОБМ и составило в центроиде $10^{3,5}$ ГЭ/мл (рис. 1Г). Доля ЕЕ в центроиде составила 64,5% относительно СОБМ.

Данный вариант микробиоты эякулята был определен в 38 (10,9%) из 350 образцов.

Анализ устойчивости микробных кластеров

Для исследования устойчивости выделенных кластеров генерировали подвыборки образцов объема $f = 1,100\%$ от исходной выборки (1000 случайных подвыборок без возврата на каждое значение объема). Для сгенерированных подвыборок проводили процедуру разбиения на четыре кластера. Для каждой ($m = 1,1000$) сгенерированной подвыборки образцов объема f (обозначим такую подвыборку через X_m^f) рассчитывали индекс устойчивости кластера k по следующей формуле:

$$\text{Stability Index}(X_m^f, k) =$$

$$\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{\text{true}\}}([A(x_i), A(x_j) \in k] \wedge [\exists l A'_m(x_i), A'_m(x_j) \in l])}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{\text{true}\}}([A(x_i), A(x_j) \in k]) \cdot \mathbf{1}_{\{\text{true}, \text{false}\}}([\exists l A'_m(x_i), A'_m(x_j) \in l])} \cdot (1)$$

где n — количество образцов в подвыборке X_m^f ; $\mathbf{1}_{\{\text{true}\}}: \{\text{true}, \text{false}\} \rightarrow \{0, 1\}$ индикаторная функция логического аргумента; $x \in X_m^f$ — образец из подвыборки X_m^f , $A(x)$; $A'_m(x)$ — метка кластера, в который попал образец x в результате кластеризации исходного набора образцов и подвыборки X_m^f , соответственно; $k = \{1, 2, 3, 4\}$, $l = \{1, 2, 3, 4\}$ метки кластеров.

Дополнительно рассчитывали индекс устойчивости кластера k , общий для подвыборок объема f . Расчет проводили по следующей формуле:

$$\text{Stability Index}(k) =$$

$$\frac{\sum_{m=1}^{1000} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{\text{true}\}}([A(x_i), A(x_j) \in k] \wedge [\exists l A'_m(x_i), A'_m(x_j) \in l])}{\sum_{m=1}^{1000} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \mathbf{1}_{\{\text{true}\}}([A(x_i), A(x_j) \in k]) \cdot \mathbf{1}_{\{\text{true}, \text{false}\}}([\exists l A'_m(x_i), A'_m(x_j) \in l])} \cdot (2)$$

Графики индексов устойчивости кластеров, рассчитанных по формулам (1) и (2), представлены на рис. 2. Полученные четыре кластера устойчивы: на достаточно небольших объемах подвыборок вероятность отнесения двух произвольных наблюдений к одному и тому же кластеру при 4-кластеризации исходной выборки и произвольной подвыборки стремится к 1. Наиболее устойчивы кластеры с преобладанием *Lactobacillus spp.* (кластер 2; рис. 2Б), с преобладанием ГПФА (кластер 3; рис. 2В) и с преобладанием ЕЕ (кластер 4; рис. 2Г). Наименее устойчив кластер 1 с преобладанием ОА (рис. 2А).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая чувствительность метода ПЦР и присутствие бактериальной ДНК как в окружающей среде, так и в реагентах для проведения анализа (Kitome) являются ограничивающими факторами для интерпретации результатов исследования образцов с низкой микробной

Таблица 2. Значения показателей качества кластеризации

Количество кластеров	Индекс силуэта	Индекс Дэвиса–Болдуина
2	0,21606	1,88844
3	0,29118	1,55122
4	0,32952	1,27021
5	0,29094	1,642083
6	0,30307	1,51617
7	0,29392	1,58818
8	0,29052	1,51856
9	0,28759	1,43542
10	0,29666	1,48578

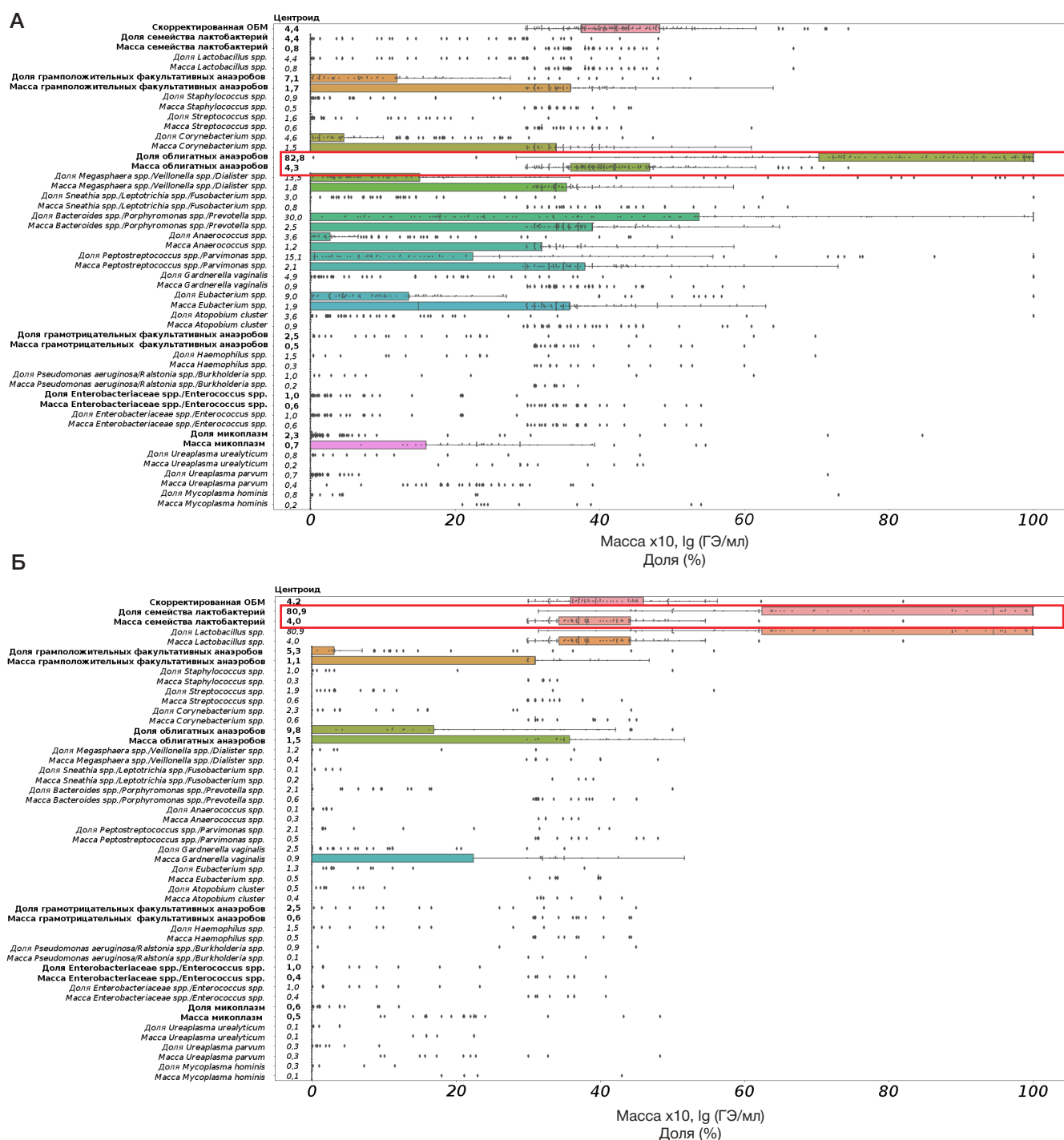


Рис. 1. Результаты кластерного анализа микробиоты эякулята, исследованного методом ПЦР-РВ ($n = 350$). По оси ординат приведены значения признаков в центриоде. Красными прямоугольниками обведены диаграммы размаха преобладающих групп микроорганизмов. Кластер 1 ($n = 172$; рис. А) характеризуется преобладанием облигатных анаэробов, кластер 2 ($n = 78$; рис. Б) — преобладанием *Lactobacillus* spp., кластер 3 ($n = 62$; рис. В) — преобладанием грамположительных факультативных анаэробов, кластер 4 ($n = 38$; рис. Г) — преобладанием *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp.

нагрузкой [17]. Учитывая, что при исследовании отрицательного контрольного образца для большинства групп МО после 35 цикла в ПЦР-РВ (что соответствовало микробной нагрузке менее 10^3 ГЭ/мл) были получены положительные сигналы, в качестве порогового значения был взят показатель 10^3 ГЭ/мл. Все остальные результаты рассматривали как отрицательные. Исключение составляли группы *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, по которым положительный сигнал в отрицательном контрольном образце отсутствовал. При получении сигнала на любом цикле амплификации результат ПЦР-РВ по этим группам МО расценивали как положительный.

Наличие микробной нагрузки выше порогового значения отмечали только в 460 (72,5%) пробах. При этом в 110 образцах число всех отдельных групп МО было ниже установленного порога. Почти половина образцов эякулята (44,8%) содержала бактериальную ДНК в подпороговых значениях (менее 10^3 ГЭ/мл), что принято рассматривать как вариант нормы [12].

В 350 (55,2%) образцах одновременно обнаруживали от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях, что согласуется с результатами других исследователей, отмечающих гетерогенность микробиоты эякулята [1, 2, 5, 7]. Чаще других выявляли следующие группы МО: *Corynebacterium* spp.

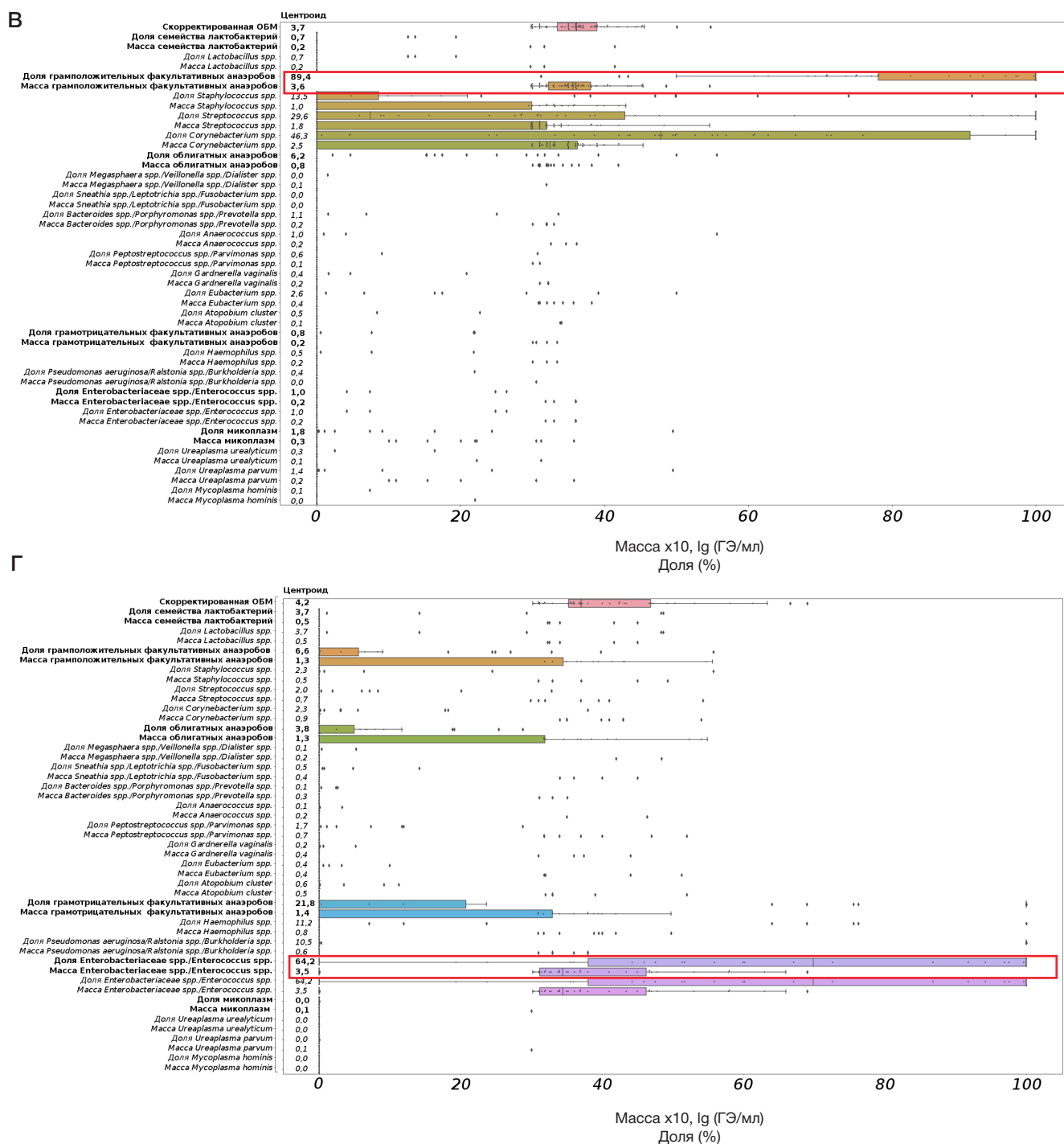


Рис. 1 (окончание). Результаты кластерного анализа микробиоты эякулята, исследованного методом ПЦР-РВ ($n = 350$). По оси ординат приведены значения признаков в центроиде. Красными прямоугольниками обведены диаграммы размаха преобладающих групп микроорганизмов. Кластер 1 ($n = 172$; рис. А) характеризуется преобладанием облигатных анаэробов, кластер 2 ($n = 78$; рис. Б) — преобладанием *Lactobacillus* spp., кластер 3 ($n = 62$; рис. В) — преобладанием грамположительных факультативных анаэробов, кластер 4 ($n = 38$; рис. Г) — преобладанием *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp.

(21,0%), *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp. (20,7%), *Lactobacillus* spp. (19,7%), *Eubacterium* spp. (17,0%), *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp. (16,9%). Реже обнаруживали другие группы МО с частотой 3,3–14,8%. Ранее проведенные исследования также показали, что при использовании молекулярно-биологических методов наряду с факультативными анаэробами в эякуляте часто выявляют облигатных анаэробов и *Lactobacillus* spp. [1, 2, 5, 7, 18].

Кластерный анализ микробиоты эякулята в образцах, содержащих надпороговые значения ОБМ и хотя бы одной из групп МО, показал, что оптимально разбиение на

четыре кластера. Для каждого кластера было характерно преобладание одной из укрупненных групп МО: для кластера 1 — ОА, для кластера 2 — *Lactobacillus* spp., для кластера 3 — ГПФА, для кластера 4 — ЕЕ. Схожие данные были получены в ранее проведенных исследованиях, использующих метод NGS для оценки состава микробиоты эякулята [1, 2]. Еще одни авторы при исследовании семенной жидкости здоровых мужчин и мужчин с бесплодием также выделили несколько кластеров МО, в том числе с преобладанием ГПФА, ОА, *Lactobacillus* spp. [2].

Кластер 2 (с преобладанием *Lactobacillus* spp.), кластер 3 (с преобладанием ГПФА) и кластер 4 (с преобладанием ЕЕ)

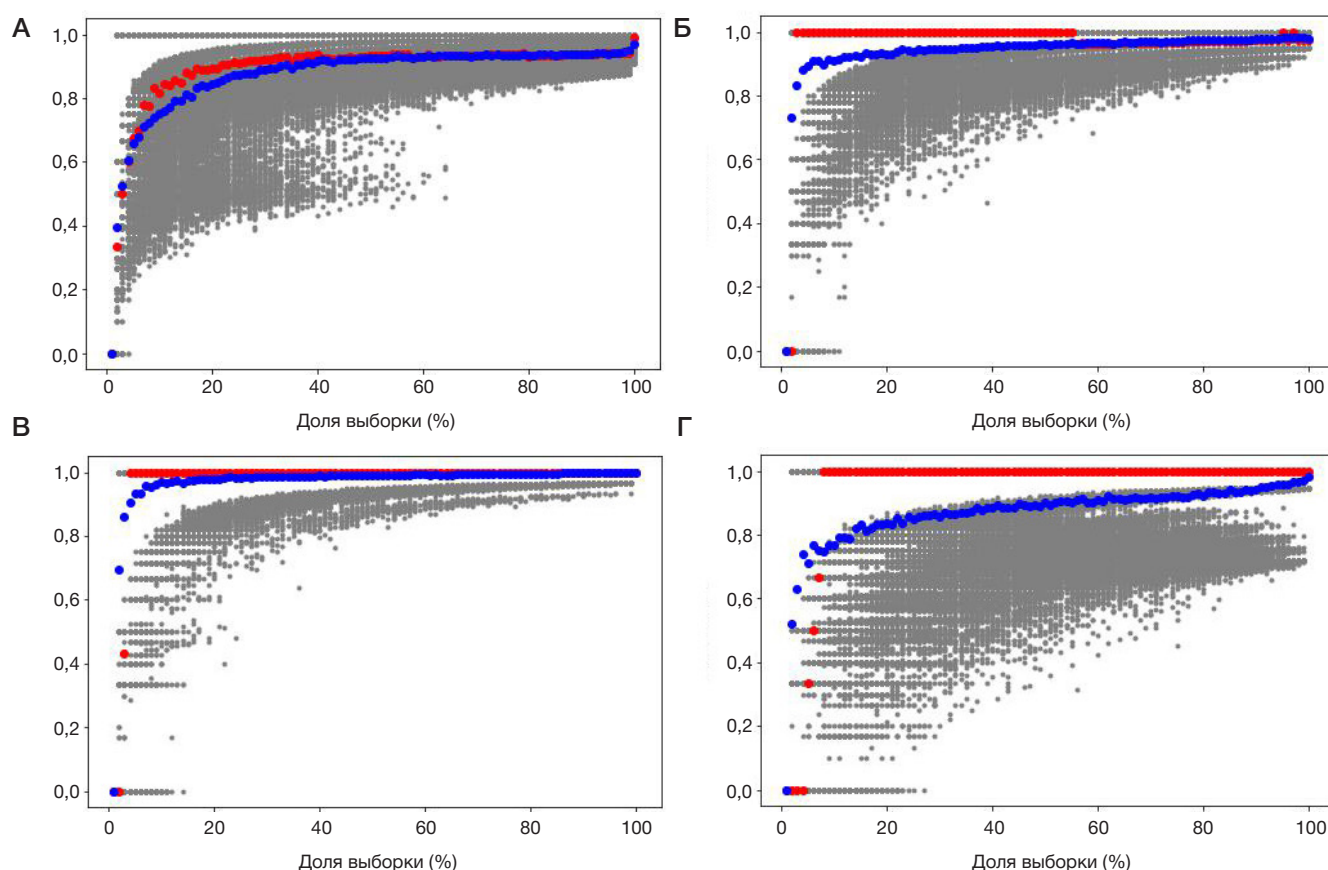


Рис. 2. Результаты исследования устойчивости кластеров 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и 4 (Г). Серым цветом обозначен индекс устойчивости кластера на случайной подвыборке, красным — медиана индексов устойчивости, рассчитанная на 1000 случайных подвыборках объема f , синим — индекс устойчивости кластера на множестве объема f

характеризовались высокой устойчивостью. При этом для кластеров 2 и 3 было нетипично присутствие других групп МО в количествах, сопоставимых с образующими кластер группами. Тогда как для кластера 4 было характерно присутствие наряду с ЕЕ других групп бактерий: ГПФА, ОА и грамотрицательных факультативных анаэробов.

Кластер 1 (с преобладанием ОА) характеризовался меньшей устойчивостью, что может быть обусловлено большим видовым разнообразием микробиоты в этих образцах эякулята.

Результаты настоящего исследования подтверждают наблюдения других авторов о гетерогенном составе микробиоты эякулята, которая может быть сгруппирована в ряд кластеров. Примененный нами подход подтвердил устойчивость выделенных четырех кластеров на случайно сгенерированных выборках разного размера.

Предметом дальнейших исследований может стать определение частоты выявления описанных в настоящей работе бактериальных кластеров в образцах эякулята, полученных от пациентов с нормоспермией и различными

вариантами патоспермии. Установление взаимосвязи между особенностями микробиоты эякулята и нарушениями фертильности у мужчин позволит выработать новые алгоритмы ведения пациентов с бесплодием в зависимости от состава микробиоты эякулята.

ВЫВОДЫ

1. Методом ПЦР-РВ бактериальную ДНК в количестве не менее 10^3 ГЭ/мл выявляли в 72,5% образцов эякулята; в 55,2% проб эякулята одновременно определяли от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях. 2. Выделили четыре устойчивых кластера микробиоты эякулята, каждый из которых отличался преобладанием определенной укрупненной группы микроорганизмов: ОА, *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов, *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus*. 3. В половине образцов эякулята микробиота была представлена кластером 1 (с преобладанием ОА), для которого характерны наименьшая стабильность и наибольшее видовое разнообразие.

Литература


1. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019; 10: 234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
2. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
3. Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
4. Mändar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–216. DOI: 10.1111/iju.13286.

5. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
6. Zozaya M, Ferris MJ, Siren JD, Lillis R, Myers L, Nsuami MJ, et al. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2016; 4: 16. DOI: 10.1186/s40168-016-0161-6.
7. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
8. Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril*. 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
9. Почерников Д. Г., Галкина И. С., Постовойтенко Н. Т., Герасимов А. М. Сравнительный анализ биотопа эякулята и цервикального канала методом ПЦР-РВ с тестами «Андрофлор» и «Фемофлор» в супружеских парах. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017; 2: 37–41.
10. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Паначева Е. А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2019; 1: 44–9.
11. Почерников Д. Г., Витвицкая Ю. Г., Болдырева М. Н., Галкина И. С. Информативность биоматериала для исследования микробиоты урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-РВ (пилотное исследование). *Экспериментальная и клиническая урология*. 2019; 2: 128–33.
12. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int*. 2017; 114 (19): 339–46.
13. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR)*. 1999; 31 (3): 264–323.
14. Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007). P. 1027–1035.
15. Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math*. 1987; 20: 53–65.
16. Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. PAMI-1. 1979; (2): 224–27.
17. de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol*. 2018 Aug; 3 (8): 851–3.
18. Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dyspermatozoon. *Sci Rep*. 2020; 10: 6876.

References

1. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol*. 2019; 10: 234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
2. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
3. Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog*. 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
4. Mändar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*. 2017; 24 (3): 211–216. DOI: 10.1111/iju.13286.
5. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
6. Zozaya M, Ferris MJ, Siren JD, Lillis R, Myers L, Nsuami MJ, et al. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2016; 4: 16. DOI: 10.1186/s40168-016-0161-6.
7. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
8. Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril*. 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
9. Pochernikov DG, Galkina IS, Postovoytenko NT, Gerasimov AM. A comparative analysis of seminal and vaginal microbiota of married couples by real-time PCR with Androflor and Femoflor reagent kits. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2017; 2: 34–39.
10. Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time PCR and culture-based technique. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2019; 1: 41–5.
11. Pochernikov DG, Vitvickaja JuG, Boldyreva MN, Galkina IS. Informativnost' biomateriala dlja issledovaniya mikrobioty urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR-RV (pilotoe issledovanie). *Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija*. 2019; 2: 128–33. Russian.
12. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int*. 2017; 114 (19): 339–46.
13. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR)*. 1999; 31 (3): 264–323.
14. Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007). P. 1027–1035.
15. Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math*. 1987; 20: 53–65.
16. Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. PAMI-1. 1979; (2): 224–27.
17. de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol*. 2018 Aug; 3 (8): 851–3.
18. Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dyspermatozoon. *Sci Rep*. 2020; 10: 6876.

СЕНСОМОТОРНЫЕ РИТМЫ ЭЭГ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

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

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

В настоящее время одной из причин нарушения социального взаимодействия у детей с расстройствами аутистического спектра (РАС) считают дисфункцию системы зеркальных нейронов (СЗН), ответственной за подражание, понимание намерений и эмоций других людей. Индикаторами активации СЗН принято считать десинхронизацию сенсомоторных ритмов. Целью работы было проанализировать особенности реактивности μ -ритма в индивидуально определенном частотном диапазоне и β -ритма ЭЭГ у детей с РАС, по сравнению с нормально развивающимися детьми, при осуществлении самостоятельных движений, наблюдении, имитации и слуховом восприятии аналогичных движений, выполняемых другим человеком. В исследовании приняли участие дети-правши 5–10 лет с РАС ($n = 10$) и нормально развивающиеся ($n = 10$). При наблюдении движений у детей с РАС десинхронизация β -ритма была более выражена, различия достигали уровня статистической значимости в локусе P4 ($p = 0,03$). В ситуации имитации движений значимые различия в индексах реактивности μ -ритма ЭЭГ выявлены в отведении C3 ($p = 0,03$). При слуховом восприятии движений значимые различия зарегистрированы в диапазоне как μ -ритма (локусы F3 и Fz ($p = 0,02$), F4 ($p = 0,04$), Cz ($p = 0,009$)), так и β -ритма (локусы Fz ($p = 0,01$), F4 ($p = 0,02$)). В данных ситуациях у детей с РАС происходила синхронизация сенсомоторных ритмов, в отличие от нормально развивающихся детей, демонстрировавших десинхронизацию. Предполагается, что обнаруженные особенности являются следствием нарушения функционирования СЗН и антитезеркальной системы мозга. Полученные данные могут быть использованы при разработке протоколов тренировок биологической обратной связи по ЭЭГ для детей с РАС.

Ключевые слова: дети, аутизм, ЭЭГ, μ -ритм, β -ритм, система зеркальных нейронов**Финансирование:** исследование выполнено в рамках поддержанного федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» гранта № ВГ08/2020.**Вклад авторов:** А. И. Кайда — набор и обработка данных, написание статьи; Е. В. Эйсмонт — планирование исследования, набор данных, написание статьи; А. А. Михайлова — обработка данных, написание статьи; В. Б. Павленко — планирование исследования, написание статьи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского (протокол № 6 от 04 июня 2020 г.). Получено добровольное информированное согласие родителей на участие детей в эксперименте.✉ **Для корреспонденции:** Анна Ивановна Кайда
ул. Ангарская, д. 38, г. Симферополь, 295001; kaydaanna@gmail.com**Статья получена:** 19.08.2020 **Статья принята к печати:** 11.09.2020 **Опубликована онлайн:** 22.09.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.055

EEG SENSORIMOTOR RHYTHMS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Kaida AI , Eismont EV, Mikhailova AA, Pavlenko VB

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

One of the currently assumed causes of impaired social interaction exhibited by children with autism spectrum disorders (ASD) is dysfunction of the mirror neuron system (MNS), which is responsible for imitation, understanding the intentions and emotions of other people. Desynchronization of sensorimotor rhythms is considered to be the indicator of MNS activation. This study aimed to analyze the specific patterns of reactivity of the μ -rhythm in an individually determined frequency range and β -rhythm on the EEG in children with ASD during independent movements, observation, imitation and auditory perception of similar movements performed by another person. The data collected were compared to those describing normally developing children. The study involved right-handed children with ASD aged 5–10 ($n = 10$) and normally developing children ($n = 10$). In the independent movements exercise, β -rhythm desynchronization was more pronounced in children with ASD, with difference becoming significant in the P4 locus ($p = 0.03$). In the movements imitation exercise, the groups showed significant differences in the EEG μ -rhythm in the locus C3 ($p = 0.03$). Auditory perception of movements revealed significant differences in the ranges of both μ -rhythm (loci F3 and Fz ($p = 0.02$), F4 ($p = 0.04$), Cz ($p = 0.009$)) and β -rhythm (loci Fz ($p = 0.01$), F4 ($p = 0.02$)). In these situations, children with ASD exhibited synchronization of sensorimotor rhythms, while normally developing children showed desynchronization. The assumption is that the specific patterns revealed are the consequences of disruption of functions of MNS and anti-mirror system. The data obtained can be used in development of EEG biofeedback training protocols for children with ASD.

Keywords: children, autism, EEG, μ -rhythm, β -rhythm, mirror neuron system**Funding:** the study received a grant #VG08/2020 supported by Vernadsky Crimean Federal University.**Author contribution:** Kaida AI — data collection and processing, article authoring; Eismont EV — research planning, data collection, article authoring; Mikhailova AA — data processing, article authoring; Pavlenko VB — research planning, article authoring.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Vernadsky Crimean Federal University ethics committee (Minutes #6 of June 04, 2020). Parents of the children submitted the informed consent forms allowing their children to participate in the experiment.✉ **Correspondence should be addressed:** Anna I. Kaida
Angarskaya, 38, Simferopol, 295001; kaydaanna@gmail.com**Received:** 19.08.2020 **Accepted:** 11.09.2020 **Published online:** 22.09.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.055

Расстройства аутистического спектра (РАС) представляют собой группу комплексных нарушений психического развития, проявляющих большую гетерогенность в отношении симптоматики и признаков. Нарушения характеризуются трудностями в социальном взаимодействии, освоении

речи, а также наличием ограниченного повторяющегося поведения. РАС проявляется в повышенной нервной возбудимости, смущении, избегании зрительного контакта [1]. Показатели распространенности аутизма в мире варьируют в зависимости от диагностических критериев, страны,

региона [2]. В среднем, по данным Всемирной организации здравоохранения, один ребенок из 160 детей в мире страдает РАС.

Следует отметить, что дефицит социальных навыков — один из основных признаков данного расстройства, сопровождающего человека на протяжении всей жизни. Многочисленные результаты свидетельствуют о том, что трудности при социальном взаимодействии у детей с аутизмом связаны с дисфункцией областей мозга, являющихся частью системы зеркальных нейронов (СЗН) [3]. Первоначально зеркальные нейроны считали вовлеченными в восприятие и понимание действий, однако они играют важную роль и в когнитивных процессах более высокого порядка, таких как имитация, эмпатия, освоение языка и речи. Функционирование данной системы лежит также в основе понимания чужого сознания (theory of mind), т. е. способности человека делать вывод о намерениях, желаниях и эмоциях, которые служат причиной действий другого индивидуума [4]. Установлено, что нарушение данной способности у детей с РАС приводит к трудностям при социальном взаимодействии [5].

При исследовании СЗН человека с помощью метода ЭЭГ используют такие параметры, как реактивность сенсомоторных μ - и β -ритмов [6]. Установлено, что амплитуда сенсомоторных ритмов (СМР) снижается при выполнении, наблюдении, имитации, представлении и слуховом восприятии движений [7].

Известно, что у детей с РАС подавление μ -ритма можно наблюдать во время самостоятельных движений, но оно отсутствует или слабо выражено при наблюдении за аналогичными действиями другого человека [8, 9]. У взрослых волонтеров с высокими показателями по шкале «Коэффициент аутизма» (Autism-Spectrum Quotient (AQ) scale) также обнаружена более слабая десинхронизация μ -ритма при наблюдении действий, в сравнении с людьми с низким уровнем по данной шкале [10]. В другом исследовании у взрослых с высокими показателями по шкале «Коэффициент аутизма» не выявлена десинхронизация ни в μ -, ни в β -диапазонах при наблюдении действий [11]. Таким образом, низкая активация СЗН, на которую указывает слабая десинхронизация сенсомоторных ритмов, может быть основной причиной наблюдаемого дефицита эмпатии и имитационного поведения у людей с РАС [8], что подтверждает исследование, продемонстрировавшее связь между поражением основных областей СЗН левого полушария и нарушением имитации [12]. Однако в ряде исследований не было найдено значимых различий в реактивности μ -ритма у детей и взрослых с РАС по сравнению со здоровыми сверстниками [13]. Результаты недавно проведенного исследования продемонстрировали, что, хотя подавление μ -ритма у детей с РАС отличалось от такового у детей контрольной группы при наблюдении определенных типов действий, в среднем различия не были значимыми. Тем не менее авторы отмечают, что у детей с аутизмом было замедлено время реакции при распознавании действий [14]. Таким образом, имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные об особенностях реактивности μ -ритма у детей с РАС неоднозначны, а исследования, касающиеся сенсомоторного β -ритма у детей с данным нарушением, единичны. Кроме того, реактивность СМР у детей с РАС исследуют преимущественно при выполнении и наблюдении движений. В связи с этим интерес представляет исследование данных ритмов не только при выполнении и наблюдении действий, но и в других

ситуациях, например, таких, как имитация и слуховое узнавание действий.

Модуляцию μ -ритма используют в качестве тренируемого параметра при проведении тренингов биологической обратной связи по характеристикам ЭЭГ (ЭЭГ-БОС) у детей с РАС [15]. После прохождения БОС-терапии у детей с аутизмом обнаруживали более выраженную десинхронизацию μ -ритма при выполнении и наблюдении действий. Было отмечено также значительное положительное влияние БОС на социальное поведение у таких детей: им удавалось лучше распознавать эмоции и действия других людей [16, 17].

Однако при исследовании параметров ЭЭГ и применении БОС-терапии у детей с РАС не учитывали индивидуальные диапазоны реактивности μ -ритма. Известно, что степень десинхронизации μ -ритма может быть неверно оценена из-за частичного наложения на него затылочного α -ритма, находящегося в близком частотном диапазоне [13]. В связи с этим рекомендуется определение индивидуальной полосы μ -ритма, обнаруживаемой при совершении ребенком самостоятельных движений.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы был анализ паттернов реактивности μ -ритма в индивидуально определенном частотном диапазоне и β -ритма ЭЭГ у детей с РАС и нормально развивающихся детей при осуществлении самостоятельных движений с помощью компьютерной мыши, наблюдении, имитации и слуховом восприятии аналогичных движений, выполняемых другим человеком.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика выборки

Исследование проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского.

В исследовании приняли участие 20 детей-правшей в возрасте 5–10 лет (средний возраст составил $7,4 \pm 0,5$ года), из них 10 детей с РАС (9 мальчиков и 1 девочка) и 10 нормально развивающихся детей, соответствующих испытуемым по возрасту и полу (контрольная группа). Группу детей с РАС составили дети с диагнозом «детский аутизм» (F84.0 по МКБ-10) или «расстройство аутистического спектра с нарушением интеллектуального развития и с нарушениями функционального языка» (6A02.3 по МКБ-11). Критерии включения детей в контрольную группу: достаточный уровень когнитивного развития (IQ от 90 до 120 баллов по тесту Векслера в вариантах WPPSI и WISC); отсутствие хронических заболеваний нервной системы. Критерии включения для детей обеих групп: наличие нормального (или скорректированного до нормального) уровня зрения и слуха; предпочтение правой руки в работе с компьютерной мышью.

Регистрация ЭЭГ

Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью 19-канального электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-3» («Нейрософт»; Россия). ЭЭГ-потенциалы отводили монополярно по системе 10–20. Областью интересов в данном исследовании были фронтальные, центральные и парietальные регионы неокортекса (локусы F3, F4, Fz, C3, C4, Cz, P3, P4, Pz). Референтным электродом

служили объединенные контакты, закрепленные на мочках ушей. Частоты среза фильтров высоких и низких частот составляли соответственно 1,5 и 35 Гц, частота оцифровки ЭЭГ-сигналов — 250 Гц.

Запись ЭЭГ производили во время выполнения испытуемыми серии заданий длительностью по 30 с каждое. Все дети, принимавшие участие в исследовании, понимали инструкцию и правильно выполняли задания. Последовательность заданий была следующая:

1) фиксация взгляда на видеоизображении компьютерной мыши, расположенной на столе перед экспериментатором (ФОН 1);

2) выполнение самостоятельных движений компьютерной мышью с произвольной скоростью (ДВ.1);

3) фиксация взгляда на видеоизображении компьютерной мыши, расположенной на столе перед экспериментатором (ФОН 2);

4) наблюдение за движениями руки экспериментатора с компьютерной мышью (НАБЛ);

5) фиксация взгляда на видеоизображении компьютерной мыши, расположенной на столе перед экспериментатором (ФОН 3);

6) выполнение самостоятельных движений компьютерной мышью с произвольной скоростью (ДВ.2);

7) имитация детьми движений, выполняемых экспериментатором с компьютерной мышью (ИМИТ);

8) испытуемый сидит неподвижно с закрытыми глазами (ГЗ);

9) испытуемый слышит (без предварительной инструкции) характерные звуки трения о поверхность стола во время движений мышью, которые совершает экспериментатор (СЛУХ).

Для обработки данных использовали компьютерную программу WinEEG («Мицар»; Россия). Артефакты удаляли с помощью встроенного в приложение метода независимых компонент с дополнительным визуальным контролем качества записи. Отрезки ЭЭГ подвергали быстрому преобразованию Фурье с эпохами анализа по 4 с и перекрытием эпох 50%.

Для каждого этапа рассчитывали среднее значение амплитуды ЭЭГ в диапазоне μ - и β -ритмов (15–25 Гц). Диапазон μ -ритма для каждого испытуемого определяли индивидуально в отведении СЗ при совершении самостоятельных движений правой рукой. Полный частотный диапазон μ -ритма (6–13 Гц) разбивали на отрезки по 1 Гц. Два прилегающих друг к другу отрезка с максимальной десинхронизацией относительно фона далее рассматривали в качестве индивидуального частотного диапазона [18]. Диапазон β -ритма был нами выбран в пределах 15–25 Гц в связи с тем, что в данном частотном диапазоне происходит подавление амплитуды в сенсомоторных областях при выполнении действий [19]. С целью нормализации распределения значения амплитуд логарифмировали.

Индексы реактивности (ИР) сенсомоторных ритмов рассчитывали по общепринятой схеме [20], в соответствии с формулой $ИР = \ln(B/A)$, где B — амплитуда сенсомоторного ритма в основной ситуации, A — амплитуда сенсомоторного ритма в исходной ситуации сравнения. В ситуациях выполнения самостоятельных движений (ДВ.1) и наблюдения движений (НАБЛ) расчет ИР сенсомоторных ритмов производили относительно ситуации фиксации взгляда на изображении неподвижной компьютерной мыши (ФОН 1 и ФОН 2 соответственно). В ситуации имитации движений (ИМИТ) ИР рассчитывали относительно

предшествующей ситуации выполнения самостоятельных движений (ДВ.2), а в ситуации СЛУХ — относительно ситуации спокойного бодрствования с закрытыми глазами (ГЗ). Положительные значения индекса реактивности соответствовали синхронизации сенсомоторного ритма, а отрицательные — десинхронизации.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных проводили с применением программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.; США). Различия в частоте индивидуально определенного μ -ритма между группами оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни. Различия в амплитуде и индексах реактивности сенсомоторных ритмов оценивали с использованием дисперсионного анализа с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Оценивали влияние межсубъектного фактора — ГРУППА (два уровня: дети с РАС и контрольная группа) и внутрисубъектного фактора — ЛОКУС (девять отведений ЭЭГ) по схеме 2×9 . Для расчета статистической значимости различий в анализируемых параметрах сенсомоторных ритмов в привязке к каждому из девяти отведений ЭЭГ использовали метод априорных контрастов (оценка F -распределения). Для описания распределений, отличных от нормального (значения границ индивидуального диапазона μ -ритма), применяли медиану и интерквартильный размах. В случаях нормального распределения данных (логарифмированные значения амплитуд и индексов реактивности) использовали среднее и стандартную ошибку среднего. 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

Амплитудно-частотные показатели сенсомоторных ритмов

В группе нормально развивающихся детей значения медианы нижней границы индивидуального диапазона μ -ритма составили 9,3 Гц (8,5; 10). В группе детей с РАС значения медианы нижней границы индивидуального диапазона μ -ритма составили 8,6 Гц (7; 9,5). Несмотря на то что медианы нижней и верхней границ индивидуального μ -ритма у детей с РАС снижены, различия по данным показателям между группами, оцененные с помощью U -критерия Манна-Уитни, не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,57$).

При дисперсионном анализе амплитуды сенсомоторных ритмов в ситуации выполнения самостоятельных движений не выявлено значимых влияний исследуемых факторов: μ -ритм — ГРУППА ($F_{1,18} = 0,15$; $p = 0,7$) и ЛОКУС \times ГРУППА ($F_{8,144} = 0,75$; $p = 0,7$), β -ритм \times ГРУППА ($F_{1,18} = 0,35$; $p = 0,6$) и ЛОКУС \times ГРУППА ($F_{8,144} = 0,72$; $p = 0,7$). В данной экспериментальной ситуации выявлено значимое влияние лишь фактора ЛОКУС для μ -ритмов ($F_{8,144} = 6,11$; $p < 0,001$) и β -ритмов ($F_{8,144} = 14,09$; $p < 0,001$). Таким образом, амплитуда сенсомоторных ритмов при выполнении самостоятельных движений значимо не различалась у детей двух групп.

Особенности реактивности μ -ритма ЭЭГ

Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности μ -ритма у детей с РАС и нормально

Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности μ -ритма у детей, развивающихся нормально и имеющих РАС

Индексы реактивности	ГРУППА		ЛОКУС		ГРУППА \times ЛОКУС	
	$F_{1,18}$	p	$F_{8,144}$	p	$F_{8,144}$	p
ИР ДВ.1	0,04	0,84	4,64	< 0,001	1,85	0,07
ИР НАБЛ	0,1	0,75	0,28	0,97	0,59	0,79
ИР ИМИТ	3,37	0,08	1,1	0,37	0,58	0,80
ИР СЛУХ	5,35	0,03	1,48	0,17	0,74	0,66

развивающихся детей представлены в табл. 1. В ситуации выполнения самостоятельных движений выявлена тенденция влияния взаимодействия факторов ЛОКУС \times ГРУППА. При дальнейшем анализе методом априорных контрастов значимых различий найдено не было. Не выявлено значимых различий в ИР μ -ритма и в ситуации наблюдения движений.

В ситуации имитации движений экспериментатора обнаружено влияние фактора ГРУППА на уровне тенденции. При анализе методом априорных контрастов различия в индексах реактивности μ -ритма ЭЭГ у двух групп детей достигали уровня статистической значимости в центральном локусе левого полушария (C3: $p = 0,03$; среднее значение и стандартная ошибка среднего для контрольной группы: $-0,08 \pm 0,06$; для группы РАС: $0,18 \pm 0,1$) (рис. 1). Представленные диаграммы демонстрируют, что при подражании движениям экспериментатора у детей с РАС можно наблюдать синхронизацию μ -ритма во всех отведениях, в отличие от нормально развивающихся сверстников, демонстрирующих исключительно десинхронизацию μ -ритма.

Значимое влияние фактора ГРУППА обнаружено при слуховом восприятии детьми знакомых движений с компьютерной мышью. Различия в ИР μ -ритма ЭЭГ у двух групп детей достигали уровня статистической значимости во фронтальных локусах и центральном срединном отведении (локусы F3 ($p = 0,02$; контрольная группа: $-0,06 \pm 0,06$; РАС: $0,19 \pm 0,08$) и Fz ($p = 0,02$; контрольная группа: $-0,1 \pm 0,06$; РАС: $0,16 \pm 0,08$), F4 ($p = 0,04$; контрольная группа: $-0,11 \pm 0,04$; РАС: $0,16 \pm 0,11$), Cz ($p = 0,009$; контрольная группа: $-0,02 \pm 0,05$; РАС: $0,23 \pm 0,06$)) (рис. 2). У детей с РАС в данной экспериментальной ситуации зарегистрирован рост амплитуды μ -ритма во всех отведениях, а у детей контрольной группы — преимущественно снижение амплитуды.

Особенности реактивности β -ритма ЭЭГ

Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности β -ритма у детей двух групп представлены в табл. 2. При выполнении самостоятельных движений влияние взаимодействия факторов ЛОКУС \times ГРУППА находилось на уровне тенденции. В данной экспериментальной ситуации ИР сенсомоторного β -ритма у детей с РАС и нормально развивающихся детей значимо не различались.

При наблюдении движений компьютерной мышью, совершаемых экспериментатором, обнаружено значимое влияние взаимодействия факторов ГРУППА \times ЛОКУС. В данной экспериментальной ситуации различия в реактивности β -ритма у двух групп детей достигали уровня статистической значимости в теменном локусе правого полушария (P4: $p = 0,03$; контрольная группа: $0,03 \pm 0,03$; РАС: $-0,16 \pm 0,08$) (рис. 3). У детей с РАС была выявлена десинхронизация β -ритма, а у нормально развивающихся детей — преимущественно синхронизация, за исключением фронтальных областей, в которых зарегистрировано снижение амплитуды исследуемого ритма.

В ситуации имитации движений экспериментатора не выявлено значимых различий в ИР β -ритма у детей исследуемых групп.

При слуховом восприятии звуков, сопровождающих движения компьютерной мышью, обнаружено влияние фактора ГРУППА на уровне тенденции. Уровня статистической значимости различия в индексах реактивности β -ритма ЭЭГ у двух групп детей достигали в срединном фронтальном отведении и во фронтальном локусе правого полушария (локусы Fz ($p = 0,01$; контрольная группа: $-0,05 \pm 0,03$; РАС: $0,08 \pm 0,04$), F4 ($p = 0,02$; контрольная группа: $-0,09 \pm 0,03$; РАС: $0,08 \pm 0,06$)) (рис. 4). В ситуации слухового восприятия у детей с РАС

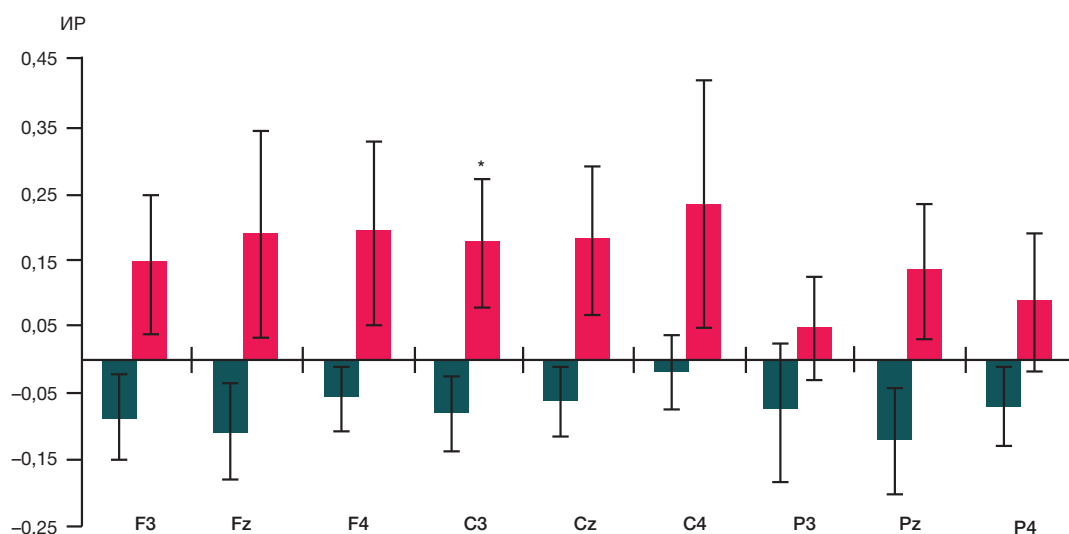


Рис. 1. Индексы реактивности (ИР) μ -ритма ЭЭГ у детей с РАС (красные столбцы) и нормально развивающихся детей (зеленые столбцы) в ситуации имитации движений экспериментатора. * — $p < 0,05$ (статистически значимые различия в индексах реактивности μ -ритма)

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности β -ритма у детей, развивающихся нормально и имеющих РАС

Индексы реактивности	ГРУППА		ЛОКУС		ГРУППА \times ЛОКУС	
	$F_{1,18}$	p	$F_{8,144}$	p	$F_{8,144}$	p
ИР ДВ.1	0,39	0,54	1,79	0,08	1,92	0,06
ИР НАБЛ	1,81	0,2	0,68	0,71	2,73	0,01
ИР ИМИТ	2,93	0,1	1,01	0,43	0,4	0,92
ИР СЛУХ	4,09	0,06	0,77	0,63	0,73	0,66

обнаружена синхронизация β -ритма во всех отведениях, а у нормально развивающихся детей — десинхронизация исследуемого ритма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что частота μ -ритма в индивидуально определенном диапазоне значимо не отличается у детей с РАС по сравнению с детьми контрольной группы. Ранее на выборке здоровых испытуемых 4–15 лет нами было показано, что индивидуально определенная частота μ -ритма не зависела от возраста детей [21]. Однако, как в предыдущем, так и в настоящем исследовании, нами выявлена широкая вариативность нижней и верхней границ индивидуального частотного диапазона μ -ритма. В связи с этим мы рекомендуем при исследовании особенностей реактивности μ -ритма у детей предварительно определять его индивидуальный частотный диапазон.

При выполнении самостоятельных движений значения амплитуды сенсомоторных μ - и β -ритмов у детей с РАС не отличаются от таковых у детей, развивающихся нормально. Анализ реактивности СМР при выполнении движений относительно ситуации двигательного покоя также не показал значимых различий у детей исследуемых групп. Полученные данные подтверждают результаты других авторов, выявивших нормальную реакцию десинхронизации μ -ритма у детей с РАС при совершении самостоятельных движений [8]. Таким образом, можно говорить о том, что у детей с данным нарушением соматосенсорные области коры, обеспечивающие выполнение собственных движений, функционируют нормально.

При сравнении реактивности СМР у детей с РАС и контрольной группы выявлены различия в ситуациях наблюдения, имитации и слухового восприятия

движений. В ситуации имитации движений у детей с аутизмом происходила синхронизация μ -ритма, в отличие от нормально развивающихся сверстников, у которых зарегистрирована десинхронизация. Ранее было установлено, что у людей с аутизмом нарушены имитационные способности [22]. Найдена также связь между поражением областей СЗН левого полушария и нарушением способности человека имитировать действия [12]. Таким образом, отсутствие десинхронизации μ -ритма у детей с РАС при подражании движениям другого человека может быть связано с нарушением СЗН. Восприятие на слух при закрытых глазах знакомых движений компьютерной мышью также не сопровождалось десинхронизацией сенсомоторных μ - и β -ритмов у детей с РАС. Как известно, СЗН активируется (что сопровождается снижением амплитуды СМР) при восприятии на слух звуков, сопровождающих знакомые действия [23]. Полученные результаты еще раз подтверждают, что у детей с РАС нарушено функционирование СЗН.

В ситуации наблюдения движений у детей с РАС происходила большая десинхронизация β -ритма в теменных отведениях ЭЭГ, чем у детей контрольной группы. В исследованиях было показано, что у людей с аутизмом не происходит десинхронизация именно при наблюдении действий [8, 9]. Однако в указанных работах рассматривали μ -ритм. Обнаруженное в настоящем исследовании большее снижение амплитуды β -ритма в при наблюдении движений может быть обусловлено нарушением функционирования антизеркальной системы мозга. Установлено, что антизеркальные нейроны, обнаруженные при микроэлектродном исследовании мозга больных эпилепсией, активируются при выполнении движений и тормозятся при наблюдении за движениями других людей [24]. Известно, что торможение нейронов коры отражается в ЭЭГ в виде синхронизации β -ритма

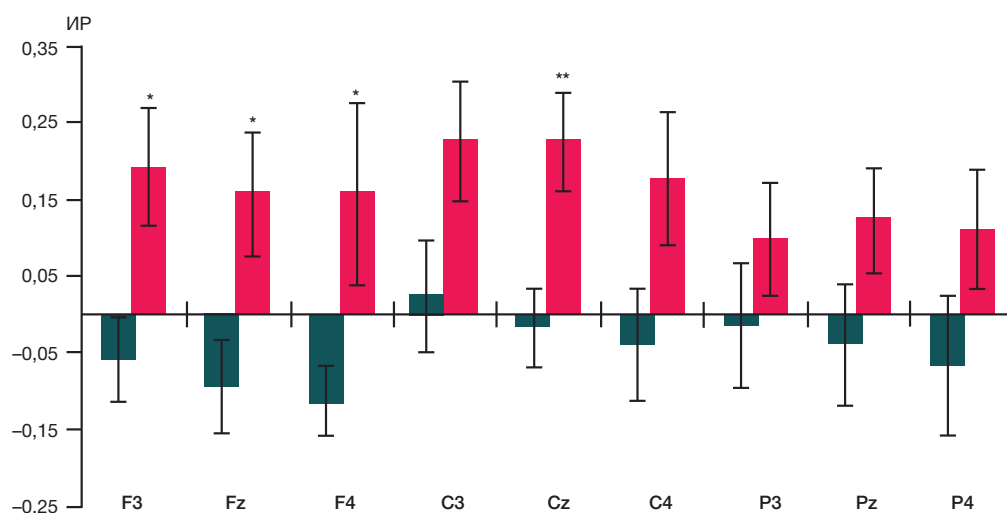


Рис. 2. Индексы реактивности (ИР) μ -ритма ЭЭГ у детей с РАС (красные столбцы) и нормально развивающихся детей (зеленые столбцы) в ситуации слухового восприятия движений. * — $p < 0,05$; ** — $p \leq 0,01$ (статистически значимые различия в индексах реактивности μ -ритма)

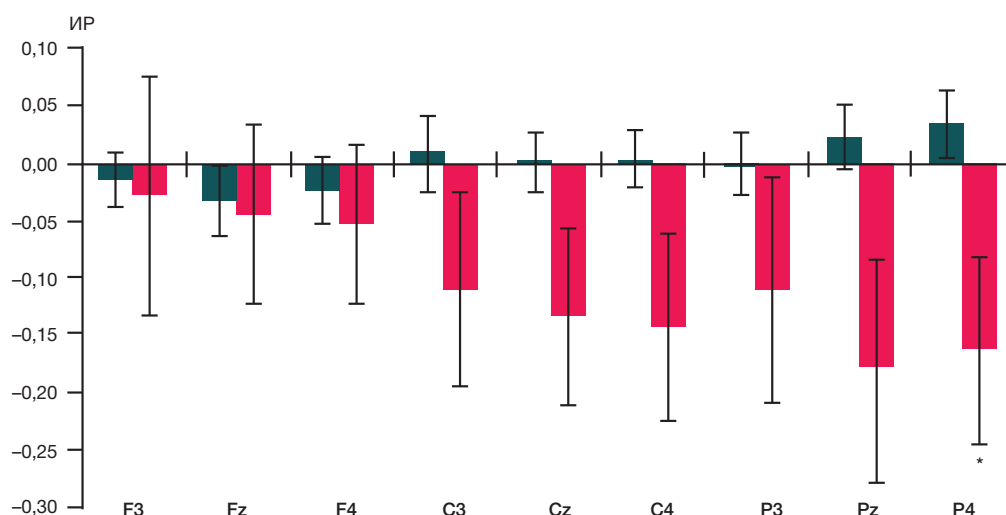


Рис. 3. Индексы реактивности (ИР) β -ритма ЭЭГ у детей с РАС (красные столбцы) и нормально развивающихся детей (зеленые столбцы) в ситуации наблюдения движений. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

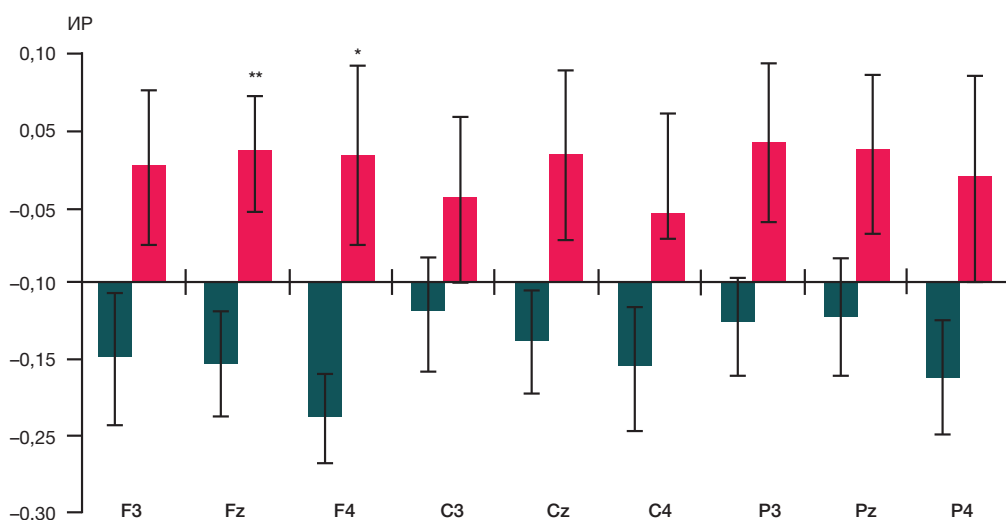


Рис. 4. Индексы реактивности (ИР) β -ритма ЭЭГ у детей с РАС (красные столбцы) и нормально развивающихся детей (зеленые столбцы) в ситуации слухового восприятия движений. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

[25]. В исследовании с участием взрослых волонтеров обнаружена синхронизация β -ритма при наблюдении эмоционально нейтральных движений в группе людей с низким уровнем по шкале «Коэффициент аутизма», что авторы связывают с подавлением автоматического копирования действий [10]. Выдвинуто предположение, что антизеркальная система мозга играет важную роль в разграничении своих и чужих действий, а также в предотвращении непроизвольного подражания [26]. Данные функции мозга у детей с РАС нарушены, что отражалось в нашем исследовании в десинхронизации β -ритма при наблюдении действий. Также можно предположить, что дети с РАС затрачивали больше когнитивных ресурсов для обработки поступающей информации, что сопровождалось большим снижением амплитуды в β -диапазоне.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что у детей с РАС не возникает десинхронизация СМР при имитации и слуховом узнавании действий, а также отсутствует большее снижение амплитуды β -ритма при наблюдении движений. Выявленные особенности могут свидетельствовать о нарушении функционирования нервной системы, в частности СЗН и антизеркальной

системы мозга. Результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности тренировок ЭЭГ-БОС с детьми, имеющими РАС.

ВЫВОДЫ

В результате исследования выявлены особенности реактивности СМР у детей с РАС. При имитации и слуховом узнавании движений у детей с РАС по сравнению с детьми контрольной группы выявлена синхронизация μ - и β -ритмов ЭЭГ, что может свидетельствовать о нарушении функционирования СЗН, обеспечивающей процессы подражания и нормального социального взаимодействия. При наблюдении движений у детей с РАС зарегистрировано большее снижение амплитуды сенсомоторного β -ритма, что может быть связано с нарушением активности антизеркальной системы мозга. Полученные результаты указывают на необходимость исследования реактивности как сенсомоторного μ -ритма, так и β -ритма у детей с РАС. Выявленные закономерности могут быть использованы в коррекционной работе с детьми, имеющими РАС, например с применением тренировок БОС по характеристикам сенсомоторных ритмов ЭЭГ.

Литература

- Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet*. 2014; 383 (9920): 896–910.
- Макушкин Е. В., Макаров И. В., Пашковский В. Э. Распространенность аутизма: подлинная и мнимая. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2019; 119 (2): 80–86.
- Saffin JM, Tohid H. Walk like me, talk like me. The connection between mirror neurons and autism spectrum disorder. *Neurosciences (Riyadh)*. 2016; 21 (2): 108–19.
- Лебедева Н. Н., Зуфман А. И., Мальцев В. Ю. Система зеркальных нейронов мозга: ключ к обучению, формированию личности и пониманию чужого сознания. *Успехи физиологических наук*. 2017; 48 (4): 16–28.
- Andreou M, Skrimpa V. Theory of mind deficits and neurophysiological operations in autism spectrum disorders: A review. *Brain Sci*. 2020; 10 (6): 393.
- Fox NA, Bakermans-Kranenburg MJ, Yoo KH, Bowman LC, Cannon EN, Vanderwert RE, et al. Assessing human mirror activity with EEG mu rhythm: A meta-analysis. *Psychol Bull*. 2016; 142 (3): 291–313.
- Ferrari PF, Rizzolatti G. New frontiers in mirror neurons research. NY: Oxford University Press, 2015; 408 p.
- Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Cognitive Brain Research*. 2005; 24 (2): 190–98.
- Martineau J, Cochin S, Magne R, Barthelemy C. Impaired cortical activation in autistic children: Is the mirror neuron system involved? *International Journal of Psychophysiology*. 2008; 68 (1): 35–40.
- Siqi-Liu A, Harris AM, Atkinson AP, Reed CL. Dissociable processing of emotional and neutral body movements revealed by μ -alpha and beta rhythms. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2018; 13 (12): 1269–79.
- de Vega M, Padron I, Moreno IZ, García-Marco E, Domínguez A, Marrero H, et al. Both the mirror and the affordance systems might be impaired in adults with high autistic traits. Evidence from EEG mu and beta rhythms. *Autism Res*. 2019; 12: 1032–42.
- Binder E, Dovern A, Hesse MD, Ebke M, Karbe H, Saliger J, et al. Lesion evidence for a human mirror neuron system. *Cortex*. 2017; 90: 125–37.
- Hobson HM, Bishop DVM. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: past, present and future. *Review R Soc Open Sci*. 2017; 4 (3): 160662.
- Sotoodeh MS, Taheri-Torbati H, Sohrabi M, Ghoshuni M. Perception of biological motions is preserved in people with autism spectrum disorder: electrophysiological and behavioural evidences. *J Intellect Disabil Res*. 2019; 63 (1): 72–84.
- Pineda JA, Carrasco K, Datko M, Pillen S, Schalles M. Neurofeedback training produces normalization in behavioural and electrophysiological measures of high-functioning autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014; 369 (1644): 20130183.
- Friedrich EVC, Sivanathan A, Lim T, Suttie N, Louchart S, Pillen S, et al. An effective neurofeedback intervention to improve social interactions in children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2015; 45: 4084–100.
- Datko M, Pineda JA, Muller RA. Positive effects of neurofeedback on autism symptoms correlate with brain activation during imitation and observation. *Eur J Neurosci*. 2018; 47 (6): 579–91.
- Махин С. А., Кайда А. И., Эйсмонт Е. В., Михайлова А. А., Павленко В. Б.; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», патентообладатель. Способ определения индивидуального частотного диапазона мю-ритма ЭЭГ. Патент РФ № 2702728. 09.10.2019.
- Simon S, Mukamel R. Power modulation of electroencephalogram mu and beta frequency depends on perceived level of observed actions. *Brain Behav*. 2016; 6 (8): e00494.
- Raymaekers R, Wiersema JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain research*. 2009; 1304: 113–21.
- Kaida AI, Mikhailova AA, Eismont EV, Dzhabbarova LL, Pavlenko VB. EEG μ -rhythm reactivity in children during imitation of biological and non-biological motion. [published online ahead of print, 2020.04.16]. *Bulletin of RSMU*. 2020. DOI: 10.24075/brsmu.2020.019.
- Bernier R, Dawson G, Webb S, Murias M. EEG mu rhythm and imitation impairments in individuals with autism spectrum disorder. *Brain and Cognition*. 2007; 64 (3): 228–37.
- Pineda JA, Grichanik M, Williams V, Trieu M, Chang H, Keysers C. EEG sensorimotor correlates of translating sounds into actions. *Front Neurosci*. 2013; 7: 203.
- Mukamel R, Ekstrom AD, Kaplan J, Iacoboni M, Fried I. Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. *Current Biology*. 2010; 20 (8): 750–56.
- Кропотов Ю. Д. Количественная ЭЭГ, когнитивные вызванные потенциалы мозга человека и нейротерапия. Донецк: Издатель Заславский Ю. А., 2010; 506 с.
- Rizzolatti G, Sinigaglia C. *Mirrors in the brain: how our minds share actions and emotions*. Oxford University Press, 2008; 242 p.

References

- Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet*. 2014; 383 (9920): 896–910.
- Makushkin EV, Makarov IV, Pashkovskiy VE. The prevalence of autism: genuine and imaginary. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2019; 119 (2): 80–86. Russian.
- Saffin JM, Tohid H. Walk like me, talk like me. The connection between mirror neurons and autism spectrum disorder. *Neurosciences (Riyadh)*. 2016; 21 (2): 108–19.
- Lebedeva NN, Zufman AI, Malcev VYu. Mirror neuron system as a key to learning, personality formation and understanding of another's mind. *Uspеhi fiziologicheskikh nauk*. 2017; 48 (4): 16–28. Russian.
- Andreou M, Skrimpa V. Theory of mind deficits and neurophysiological operations in autism spectrum disorders: A review. *Brain Sci*. 2020; 10 (6): 393.
- Fox NA, Bakermans-Kranenburg MJ, Yoo KH, Bowman LC, Cannon EN, Vanderwert RE, et al. Assessing human mirror activity with EEG mu rhythm: A meta-analysis. *Psychol Bull*. 2016; 142 (3): 291–313.
- Ferrari PF, Rizzolatti G. New frontiers in mirror neurons research. NY: Oxford University Press, 2015; 408 p.
- Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Cognitive Brain Research*. 2005; 24 (2): 190–98.
- Martineau J, Cochin S, Magne R, Barthelemy C. Impaired cortical activation in autistic children: Is the mirror neuron system involved? *International Journal of Psychophysiology*. 2008; 68 (1): 35–40.
- Siqi-Liu A, Harris AM, Atkinson AP, Reed CL. Dissociable processing of emotional and neutral body movements revealed by μ -alpha and beta rhythms. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2018; 13 (12): 1269–79.
- de Vega M, Padron I, Moreno IZ, García-Marco E, Domínguez A, Marrero H, et al. Both the mirror and the affordance systems might be impaired in adults with high autistic traits. Evidence from EEG mu and beta rhythms. *Autism Res*. 2019; 12: 1032–42.
- Binder E, Dovern A, Hesse MD, Ebke M, Karbe H, Saliger J, et al. Lesion evidence for a human mirror neuron system. *Cortex*. 2017; 90: 125–37.
- Hobson HM, Bishop DVM. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: past, present and future. *Review R Soc Open Sci*. 2017; 4 (3): 160662.
- Sotoodeh MS, Taheri-Torbati H, Sohrabi M, Ghoshuni M. Perception of biological motions is preserved in people with autism spectrum disorder: electrophysiological and behavioural

- evidences. *J Intellect Disabil Res.* 2019; 63 (1): 72–84.
15. Pineda JA, Carrasco K, Datko M, Pillen S, Schalles M. Neurofeedback training produces normalization in behavioural and electrophysiological measures of high-functioning autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369 (1644): 20130183.
 16. Friedrich EVC, Sivanathan A, Lim T, Suttie N, Louchart S, Pillen S, et al. An effective neurofeedback intervention to improve social interactions in children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord.* 2015; 45: 4084–100.
 17. Datko M, Pineda JA, Muller RA. Positive effects of neurofeedback on autism symptoms correlate with brain activation during imitation and observation. *Eur J Neurosci.* 2018; 47 (6): 579–91.
 18. Mahin SA, Kaida AI, Eismont EV, Mikhailova AA, Pavlenko VB; FGAOU VO "Krymskij federal'nyj universitet imeni V.I. Vernadskogo", patentoobladatel'. Sposob opredelenija individual'nogo chastotnogo diapazona mju-ritma JeJeG. Patent RF # 2702728. 09.10.2019. Russian.
 19. Simon S, Mukamel R. Power modulation of electroencephalogram mu and beta frequency depends on perceived level of observed actions. *Brain Behav.* 2016; 6 (8): e00494.
 20. Raymaekers R, Wiersema JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain research.* 2009; 1304: 113–21.
 21. Kaida AI, Mikhailova AA, Eismont EV, Dzhapparova LL, Pavlenko VB. EEG μ -rhythm reactivity in children during imitation of biological and non-biological motion. [published online ahead of print, 2020.04.16]. *Bulletin of RSMU.* 2020. DOI: 10.24075/brsmu.2020.019.
 22. Bernier R, Dawson G, Webb S, Murias M. EEG mu rhythm and imitation impairments in individuals with autism spectrum disorder. *Brain and Cognition.* 2007; 64 (3): 228–37.
 23. Pineda JA, Grichanik M, Williams V, Trieu M, Chang H, Keyzers C. EEG sensorimotor correlates of translating sounds into actions. *Front Neurosci.* 2013; 7: 203.
 24. Mukamel R, Ekstrom AD, Kaplan J, Iacoboni M, Fried I. Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. *Current Biology.* 2010; 20 (8): 750–56.
 25. Kropotov YuD. Kolichestvennaja JeJeG, kognitivnye vyzvannye potencijaly mozga cheloveka i nejroterapija. Doneck: Izdatel' Zaslavkij Ju.A., 2010; 506 s. Russian.
 26. Rizzolatti G, Sinigaglia C. *Mirrors in the brain: how our minds share actions and emotions.* Oxford University Press, 2008; 242 p.

ТЕЛОМЕРИЗОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ 3D-МОДЕЛИРОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ РУБЦОВ *IN VITRO*В. С. Шадрин , П. М. Кожин, О. О. Шошина, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Поиск оптимальных клеточных моделей для изучения патогенеза гиперпластических рубцов является актуальной задачей. Целью исследования было оценить перспективу использования теломеризованных фибробластов в качестве объекта при 3D-моделировании патологических гипертрофических рубцов *in vitro*. Клетки НФ и Фб-hTERT культивировали в виде монослоя и сфероидов, в интактном состоянии и при воздействии TGFβ1. Метаболическую активность клеток оценивали методом МТТ. Скорость заращения дефекта монослоя клеток вычисляли с помощью scratch-теста. Уровень экспрессии генов, ассоциированных с гиперпластическими процессами, определяли методом qRT-PCR. Для Фб-hTERT характерно более выраженное по сравнению с НФ усиление метаболической активности клеток при воздействии TGFβ1 (для 1 нг/мл 179 ± 12% и 135 ± 13% соответственно; $p < 0,05$). Сфероиды, сформированные из Фб-hTERT, были значительно крупнее сфероидов, полученных из НФ. Продукция основных специфических для фибробластов белков, ассоциированных с продукцией внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*), при стимуляции TGFβ1 была ниже в Фб-hTERT по сравнению с НФ (более чем в 25, 20 и 2 раза соответственно; $p < 0,05$). Интактные НФ более активно, по сравнению с Фб-hTERT, восстанавливали дефект монослоя (в 2,28 раза на вторые сутки; $p < 0,05$). При этом воздействие TGFβ1 приводило к увеличению скорости заполнения дефекта клетками Фб-hTERT (в 2 раза на вторые сутки; $p < 0,05$), но не НФ. Таким образом, теломеризованные фибробласты имеют ряд фенотипических признаков, характерных для келоидных фибробластов, но в то же время есть ограничения, которые следует учитывать при использовании Фб-hTERT для моделирования патологических гипертрофических рубцов.

Ключевые слова: *in vitro* модель, фибробласты, hTERT, гипертрофический рубец, келоидный рубец, TGFβ1

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 05.604.21.0219, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0219).

Вклад авторов: Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — концепция и дизайн исследования; В. С. Шадрин, П. М. Кожин, О. О. Шошина, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — анализ литературы, анализ и интерпретация полученных данных, редактирование рукописи; В. С. Шадрин, П. М. Кожин — планирование и проведение исследования; В. С. Шадрин — написание статьи.

 **Для корреспонденции:** Валериан Сергеевич Шадрин
ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121; valerianshadrin@gmail.com

Статья получена: 28.08.2020 **Статья принята к печати:** 02.09.2020 **Опубликована онлайн:** 27.09.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.057

TELOMERIZED FIBROBLASTS AS A CANDIDATE 3D *IN VITRO* MODEL OF PATHOLOGICAL HYPERTROPHIC SCARSShadrin VS , Kozhin PM, Shoshina OO, Luzgina NG, Rusanov AL


Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The search for the optimal cell model for studying the pathogenesis of pathological scars is a pressing challenge. This study aimed at evaluating the feasibility of using telomerized fibroblasts for the *in vitro* 3D modeling of pathological hypertrophic scars. NF and Fb-hTERT cells were cultured as monolayers and spheroids in the absence and in the presence of TGFβ1. The metabolic activity of the cultured cells was assessed using the MTT assay. Cell migration was estimated using the scratch assay. The expression of genes associated with fibrous scar tissue growth was measured by qRT-PCR. Fb-hTERT cells were more metabolically active than NF cells in the presence of TGFβ1 (for 1 ng/ml: 179 ± 12% vs. 135 ± 13% respectively; $p < 0,05$). Spheroids grown from Fb-hTERT cells were significantly larger than those derived from NF cells. In the presence of TGFβ1, the expression of proteins associated with extracellular matrix production (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*) was lower in Fb-hTERT cells than in NF cells (more than 25, 20 and 2-fold, respectively; $p < 0.05$). Intact NF cells were more active in closing the scratch than Fb-hTERT cells: on day 2, the gap closure rate was 2.28 times higher in NF cells ($p < 0.05$). Exposure to TGFβ1 stimulated Fb-hTERT, unlike NF cells, to close the gap 2 times faster on day 2 ($p < 0.05$). Thus, telomerized fibroblasts have a few phenotypic traits observed in keloid fibroblasts; still there are some limitations that should be accounted for when using Fb-hTERT cells for the modeling of pathological hypertrophic scars.

Keywords: *in vitro* model, fibroblasts, hTERT, hypertrophic scar, keloid scar, TGFβ1

Funding: this research was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education and was conducted under the Federal Targeted Program on Research and Development in Priority Fields of Science and Technology for 2014–2020 (Agreement 05.604.21.0219, Project ID RFMEFI60419X0219).

Author contribution: Luzgina NG, Rusanov AL conceived the study and proposed its design; Shadrin VS, Kozhin PM, Shoshina OO, Luzgina NG, Rusanov AL analyzed the literature, analyzed and interpreted the experimental data and wrote the manuscript; Shadrin VS, Kozhin PM planned and conducted the experiment; Shadrin VS wrote the manuscript.

 **Correspondence should be addressed:** Valerian S. Shadrin
Pogodinskaya, 10, str. 8, Moscow, 119121; valerianshadrin@gmail.com

Received: 28.08.2020 **Accepted:** 02.09.2020 **Published online:** 27.09.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.057

Ежегодно в мире после хирургических вмешательств, травм и ожогов более чем у 100 млн пациентов образуются рубцы кожных покровов. В зависимости от локализации и глубины повреждения, условий заживления раны и индивидуальных особенностей организма процесс регенерации может значительно варьировать по проявлениям и последствиям и приводить к образованию

нормальных (нормотрофических) или патологических рубцов. Чрезмерная активация гиперпластических процессов, развивающихся в силу различных причин, приводит к образованию так называемых гипертрофических и келоидных рубцов. Оба варианта рубцов — проявление фибропролиферативного расстройства, в результате которого происходят чрезмерная

активация фибробластов в ране и aberrантное образование внеклеточного матрикса [1].

Для изучения патогенеза гиперпластических рубцов и разработки эффективных средств их профилактики и лечения необходимы удобные и доступные экспериментальные модели *in vitro*, получаемые на основе клеток, способных наиболее полно воспроизводить патологические профиброгенные программы. Использование с этой целью фибробластов, выделенных из области келоидов, сопряжено со сложностями доступа к достаточному количеству клинического материала, а также вариативностью фенотипа клеток, полученных от различных доноров. В связи с этим поиск оптимальных модельных клеток, наиболее полно воспроизводящих фенотип келоидных фибробластов, является актуальной задачей. Представляется перспективным использовать с этой целью иммортализованные клеточные линии, имеющие неограниченное число делений и стабильный фенотип вне зависимости от клеточного пассажа.

Известно, что для келоидных фибробластов характерны высокая пролиферативная активность и быстрый рост, повышенная экспрессия коллагена I, фибронектина, эластина, периостина (регулирует синтез коллагена I типа), тенасцина (участвует в клеточной адгезии) [2, 3], что приводит к избыточной наработке соединительной ткани, в том числе за пределами локуса повреждения кожи, а также ряд метаболических особенностей, свойственных клеткам опухолей [4, 5].

Есть мнение, что фенотип фибробластов в патологических рубцах может определять высокая активность теломеразы [6]. Так, за счет снижения теломеразной активности в келоидных фибробластах, авторам одного из исследований удалось уменьшить активность роста и пролиферации клеток, а также нормализовать ряд других фенотипических параметров клеток, что позволило прийти к заключению о перспективности стратегии ингибирования теломеразы при терапии келоидов [5]. В этой связи представляет интерес оценка перспективы использования теломеризованных фибробластов для моделирования патологических гиперпластических рубцов *in vitro*.

При разработке адекватных моделей патологических рубцов важно использовать оптимальные способы культивирования клеток. Известно, что в центре келоидных тканей часто возникает гипоксия вследствие окклюзии капилляров из-за избытка коллагена и эндотелиальных клеток [7]. Краевые фибробласты метаболически более активны, проникают в окружающие ткани и активируют ангиогенез, предположительно, для поддержания инвазивности [8]. В связи с этим перспективны модели, основанные на культивировании клеток в виде клеточных сфероидов.

Для индукции профиброгенного фенотипа фибробластов *in vitro* часто используют трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) [9]. Этот многофункциональный белок регулирует рост клеток, дифференцировку, подвижность и выработку внеклеточного матрикса в нормальном процессе заживления ран, но его повышенная экспрессия может приводить к развитию фиброзных нарушений [10]. TGF $\beta 1$ стимулирует рост и секрецию коллагена, индуцирует биосинтез фибронектина в келоидных фибробластах [11]. Представляет интерес функциональный ответ потенциальных модельных клеток на воздействие данного ростового фактора.

Целью исследования было оценить перспективу использования теломеризованных фибробластов в

качестве объекта при 3D-моделировании патологических гипертрофических рубцов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Исследование проводил на культурах нормальных (НФ) и теломеризованных (Фб-hTERT) фибробластов кожи человека. НФ были получены из криобанка («Перспектива»; Россия) и представляли собой первичные клеточные линии фибробластов третьего пассажа, выделенные из крайней плоти доноров в возрасте 35–38 лет. Для учета индивидуальных особенностей клеток, полученных от различных доноров, при проведении экспериментов были использованы три клеточные линии.

Фб-hTERT были любезно предоставлены проф. Е. Е. Егоровым (Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН). Культура была получена в результате введения гена каталитического компонента теломеразы в фибробласты кожи линии 1608. Данные клетки имеют устойчивый фенотип, воспроизводимый до 200-го пассажа [12].

Культивирование клеток

Для культивирования использовали полную культуральную среду DMEM/F-12 (Gibco; США), содержащую 10% FBS («Диаэм»; Россия), 1%-й раствор антибиотика-антимикотика (в финальной концентрации: пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 ед./мл, амфотерицин Б 0,25 мкг/мл) (Gibco; США) и 1%-й раствор GlutaMAX (финальная концентрация дипептида L-аланил-L-глутамин — 2 mM) (Gibco; США).

Исследование влияния TGF $\beta 1$ на клетки методом МТТ

Для МТТ-теста [13] в каждую лунку плоскодонного 96-луночного планшета вносили по 2,5 тыс. клеток НФ (четвертый пассаж) и Фб-hTERT из культурального флакона с 70%-й конfluентностью и преинкубировали 24 ч в полной среде DMEM/F-12 при 37 °C и 5% CO₂. Затем среду меняли на свежую, содержащую TGF $\beta 1$ (ProSpec; Израиль), и инкубировали клетки еще 48 ч, меняя среду каждые 24 ч. Среду отбирали, лунки промывали раствором DPBS (Gibco; США), добавляли по 100 мкл раствора МТТ («Диаэм»; Россия) с концентрацией 1 мг/мл и инкубировали 2,5 ч при 37 °C и 5% CO₂. По истечении этого времени раствор МТТ заменяли раствором ДМСО («Биолот»; Россия) и инкубировали клетки при комнатной температуре до полного растворения кристаллов формазана. Определяли оптическую плотность в каждой лунке на 490 нм (с учетом фонового поглощения на 655 нм). МТТ-тест проводили в трех повторях по пять лунок при следующих концентрациях TGF $\beta 1$: 0 нг/мл; 0,1 нг/мл; 1 нг/мл; 5 нг/мл; 10 нг/мл.

Метаболическую активность рассчитывали по следующей формуле (ОП — оптическая плотность): $100\% \cdot (ОП_{490}(\text{опытных лунок}) - ОП_{490}(\text{среды})) / (ОП_{655}(\text{контрольных лунок}) - ОП_{655}(\text{среды}))$.

Культивирование клеток в виде сфероидов

Для получения сфероидов использовали 96-луночные планшеты ultra low attachment (Corning; США), в которые

вносили 5, 10 или 20 тыс. клеток (НФ или Фб-hTERT) на лунку из культурального флакона с 70%-й конфлюентностью и инкубировали девять суток в полной среде DMEM/F-12 при 37 °C и 5% CO₂. Среду меняли каждые 24 ч.

Для исследования влияния TGFβ1 на сфероиды вносили 20 тыс. клеток НФ и 10 тыс. клеток Фб-hTERT на лунку (для получения сфероидов примерно одинакового размера) из культурального флакона с 70%-й конфлюентностью и инкубировали трое суток в полной среде DMEM/F-12 с добавлением 1 нг/мл TGFβ1 при 37 °C и 5% CO₂. Среду меняли каждые 24 ч для поддержания концентрации фактора роста на постоянном уровне.

Каждый сфероид фотографировали ежедневно в течение всего срока культивирования с помощью микроскопа Primovert (Carl Zeiss; Германия). Определение параметров сфероидов (диаметр) производили с помощью программного пакета для обработки изображений ImageJ и его расширения Fiji (National Institutes of Health; США) [14].

Оценка скорости зарастания дефекта монослоя клеток с помощью scratch-теста

В лунки 24-луночного планшета вносили по 50 тыс. клеток НФ и Фб-hTERT из культурального флакона с 70%-й конфлюентностью и преинкубировали 24 ч в полной среде DMEM/F-12 при 37 °C и 5% CO₂ до образования монослоя в лунке. Затем среду меняли, наносили стандартизированное повреждение монослоя с помощью наконечника объемом 1 мл, промывали клетки раствором DPBS и добавляли среду DMEM/F-12 (контроль) или DMEM/F-12 с TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл (опыт). После этого клетки инкубировали в течение двух суток. Каждую лунку фотографировали по всей длине повреждения ежедневно. Обработку фотографий проводили в программе CellProfiler (Broad Institute of Harvard and MIT; США) [15]. Вычисляли площадь восстановления дефекта за 24 ч и 48 ч и находили процентное соотношение с начальной площадью дефекта. Эксперимент проводили в трех повторах по три лунки.

Определение уровня экспрессии генов, ассоциированных с гиперпластическими процессами, методом qRT-PCR

С учетом литературных данных в качестве целевых генов были выбраны гены, кодирующие синтез коллагена I, коллагена III, фибронектина, а также ген *PAI-1*. Данный список генов, безусловно, не является исчерпывающим, но увеличение уровня их экспрессии позволяет констатировать факт модуляции профиброгенного потенциала клеток.

Для qRT-PCR во флакон вносили клеточную суспензию (по 200 тыс. клеток в 5 мл среды) преинкубировали клетки 48 ч в полной среде DMEM/F-12 при 37 °C и 5% CO₂. Затем среду меняли на содержащую 1 нг/мл TGFβ1 и инкубировали клетки еще 48 ч, меняя среду каждые 24 ч. После этого из клеток выделяли РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen; Германия) по стандартному протоколу. Количество полученной РНК измеряли на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор MMLV RT kit («Евроген»; Россия) по стандартному протоколу, добавляя в реакцию по 1 мкг РНК. qPCR проводили, используя qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Для каждого гена и каждого образца реакцию проводили в трех повторах.

В качестве референсного гена использовали GAPDH. Использовали следующие праймеры:

GAPDH Forward Primer F:

5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3' Reverse Primer R: 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'; *COL1A1* F: 5'-CCAAGAGGAAGGCCAAGTC-3' R: 5'-ACACGTCTCGGTCATGTA-3'; *COL3A1* F: 5'-CTGGTGCTAAGGGTGAAGTT-3' R: 5'-GTCCAGGTTCTCCTCTTTGTC-3'; *FN1* F: 5'-GAATAAGCTGTACCATCGCAAAC-3' R: 5'-ACCAAGACACACACTCTAAC-3'; *PAI-1* F: 5'-GGCTGACTTCACGAGTCTTT-3' R: 5'-CGTTCACCTCGATCTTCACTT-3';

Определение синтеза коллагена I клетками сфероидов

Сфероиды формировали, как описано выше. После трех суток инкубации сфероиды из 10 тыс. клеток фиксировали в 4%-м формалине, подвергали стандартной гистологической проводке с заключением в парафин, изготавливали парафиновые срезы и окрашивали первичными антителами козы к коллагену I человека («ИМТЕК»; Россия) и вторичными FITC-конъюгированными антителами к IgG козы (ab6881, Abcam; США). Для каждой группы использовали три биологических образца, для дальнейшей окраски брали по пять срезов с образца. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно с использованием единого набора реактивов (разведений антител и буферов).

Полученные препараты последовательно визуализировали с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss; Германия) с использованием одинаковых настроек. Обработку фотографий проводили в программе CellProfiler [15]. Для каждого образца вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции (суммарная интенсивность, деленная на площадь сфероида). Значения средней интенсивности флуоресценции нормировали на значение средней интенсивности флуоресценции в группе НФ без воздействия TGFβ1.

Статистическая обработка данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R. Различия между группами определяли с помощью *t*-критерия с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, если не указано иное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нормальные и иммортализованные фибробласты кожи различались размерами и пролиферативной активностью. При выращивании в низкой плотности (менее 50% конфлюентности) НФ имели площадь 723 ± 54 мкм² (рис. 1А). Время удвоения, рассчитанное по формуле $DT = T \cdot \ln 2 / \ln (X_1/X_0)$, где T — время инкубации, X_1 — конечное количество клеток, X_0 — начальное количество клеток, для данных клеток составило $3,1 \pm 0,6$ сут. 100%-ю конфлюентность клетки при культивировании в виде монослоя достигали при плотности $16,5 \pm 3,1$ тыс./см².

Площадь клеток Фб-hTERT была меньше 675 ± 29 мкм² (рис. 1А). Время удвоения составило $1,8 \pm 0,4$ сут. 100%-ю конфлюентность клетки достигали при плотности $41,9 \pm 7,2$ тыс./см².

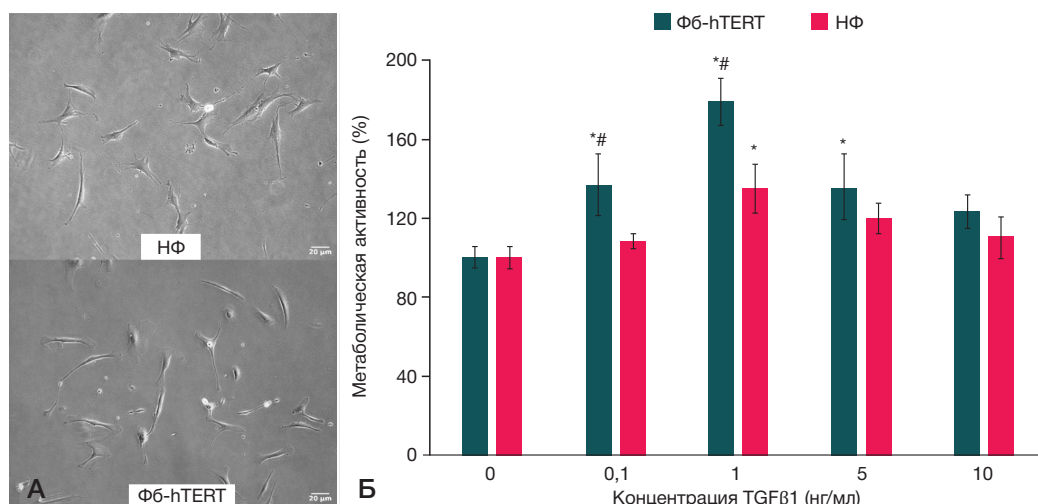


Рис. 1. Характеристики клеток НФ и Фб-hTERT в 2D-культуре. **А.** Внешний вид клеток НФ и Фб-hTERT. Световая микроскопия, ув. $\times 100$. **Б.** Метаболическая активность клеток НФ и Фб-hTERT в зависимости от концентрации TGFβ1 (МТТ-тест). * — статистически значимые отличия от предыдущей дозы воздействия TGFβ1 ($p < 0,05$); # — статистически значимые отличия от группы клеток НФ при той же дозе воздействия TGFβ1 ($p < 0,05$). Примечание: здесь и далее на рисунках НФ — нормальные фибробласты кожи крайней плоти человека, Фб-hTERT — теломеризованные постнатальные фибробласты кожи человека

МТТ-тест показал дозозависимое влияние TGFβ1 на культуры НФ и Фб-hTERT (рис. 1Б). Достоверное увеличение метаболической активности Фб-hTERT и НФ обнаружено при добавлении 0,1 нг/мл и 1 нг/мл TGFβ1 соответственно. Максимальное увеличение метаболической активности клеток обеих линий наблюдали при воздействии TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл, и оно было достоверно выше у Фб-hTERT ($179 \pm 12\%$ и $135 \pm 13\%$ соответственно; $p < 0,05$). Дальнейшее увеличение концентрации ростового фактора в среде приводило к уменьшению метаболической активности клеток, по сравнению с воздействием 1 нг/мл TGFβ1. Исходя из полученных данных, для повышения профиброгенной активности клеток в дальнейшем использовали TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл.

С помощью scratch-теста было продемонстрировано, что восстановление дефекта монослоя клеток НФ и Фб-hTERT, в том числе в условиях воздействия TGFβ1, различалось (рис. 2).

Величина данного показателя через 24 и 48 ч от начала исследования была достоверно выше у контрольных (без воздействия TGFβ1) клеток НФ, в сравнении с контрольными клетками Фб-hTERT. В то же время после

добавления в среду культивируемых клеток TGFβ1 скорость заращения дефекта монослоя у НФ на всем протяжении исследования не имела достоверных различий с контролем. В тех же условиях величина анализируемого показателя у Фб-hTERT достоверно превышала таковую у клеток контроля более чем в два раза как через 24 ч после начала исследования ($33 \pm 8\%$ и $13 \pm 7\%$ соответственно), так и на вторые сутки наблюдения ($61 \pm 10\%$ и $30 \pm 7\%$ соответственно). Таким образом, НФ в сравнении с Фб-hTERT быстрее восстанавливали дефект монослоя в интактном состоянии, а клетки Фб-hTERT, напротив, при стимуляции TGFβ1.

При культивировании клеток в виде клеточных сфероидов, сформированных из различного количества исследуемых клеток (5 тыс., 10 тыс. и 20 тыс.), было установлено, что во всех экспериментальных ситуациях размер сфероидов уменьшался в течение первых пяти суток культивирования, а затем оставался относительно стабильным (рис. 3А). Причем, чем больше было взято клеток для формирования сфероида, тем более выраженной была скорость уменьшения его размеров, что характерно как для НФ, так и для Фб-hTERT.

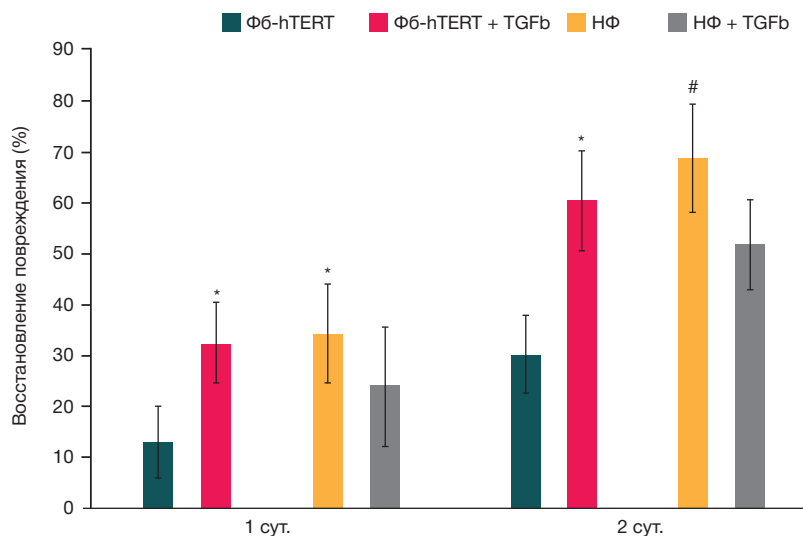


Рис. 2. Исследование базовой (контроль) и стимулированной TGFβ1 скорости закрытия дефекта монослоя клетками НФ и Фб-hTERT (скрэтч-тест, TGFβ1 введен в питательную среду в концентрации 1 нг/мл). * — статистически значимые отличия от базовой скорости закрытия дефекта монослоя ($p < 0,05$); # — статистически значимые отличия от группы Фб-hTERT при тех же условиях культивирования ($p < 0,05$)

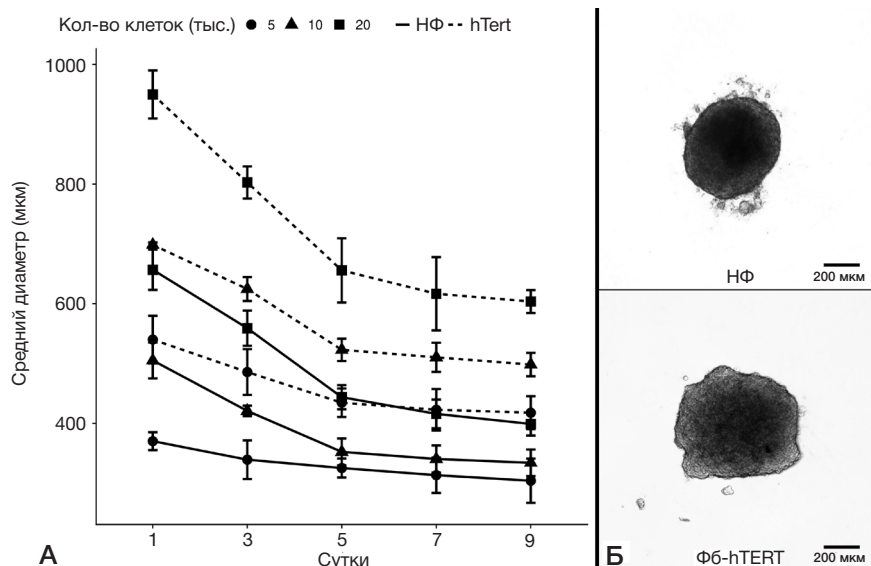


Рис. 3. Формирование сфероидов НФ и Фб-hTERT. **А.** Динамика изменения среднего диаметра сфероидов НФ и Фб-hTERT в процессе культивирования в зависимости от количества клеток, использованных при их формировании ($M \pm \sigma$). **Б.** Внешний вид сфероидов НФ (20 тыс. клеток) и Фб-hTERT (10 тыс. клеток). Световая микроскопия, ув. $\times 40$

Размеры сфероидов из клеток Фб-hTERT превосходили размеры сфероидов из НФ примерно в два раза, несмотря на то что сами клетки Фб-hTERT меньше, чем НФ.

Для оценки влияния TGF β 1 на клетки НФ и Фб-hTERT, культивируемые в виде сфероидов, использовали клеточные образования, сформированные из 20 тыс. клеток — для НФ и 10 тыс. клеток — для Фб-hTERT (рис. 3Б). Используемое число клеток позволяло получить сфероиды примерно сопоставимых размеров. Данный параметр важен для функционирования подобных клеточных образований, так как определяет интенсивность трофических процессов в краевых и центральных клетках, а также интенсивность гипоксии в центре сфероида.

В условиях добавления в питательную среду TGF β 1 в концентрации 1 нг/мл через 24 ч было обнаружено достоверное увеличение размеров сфероидов, сформированных из НФ, в сравнении с размерами сфероидов контрольной группы, состоящих из клеток НФ (рис. 4). Затем данные различия уменьшались и исчезали к третьим суткам культивирования.

Сфероиды, полученные из Фб-hTERT, вели себя несколько иначе. В присутствии TGF β 1 их размер на первые и вторые сутки культивирования достоверно уменьшался по сравнению с контролем. К третьим суткам данные различия также нивелировались.

Отмеченные незначительные различия в динамике изменения размеров сфероидов из НФ и Фб-hTERT при воздействии TGF β 1 на ранних сроках культивирования можно объяснить фенотипическими особенностями клеток разных линий, а также их исходно разным числом в клеточном образовании. Однако следует отметить, что на третьи сутки культивирования по мере формирования и уплотнения сфероидов данные различия практически отсутствовали.

Клетки НФ и Фб-hTERT имели различия в экспрессии генов, ассоциированных с развитием гиперпластических процессов, как в интактном состоянии, так и при воздействии TGF β 1 (рис. 5).

В интактных НФ по сравнению с Фб-hTERT выявлена тенденция к повышению экспрессии генов, кодирующих

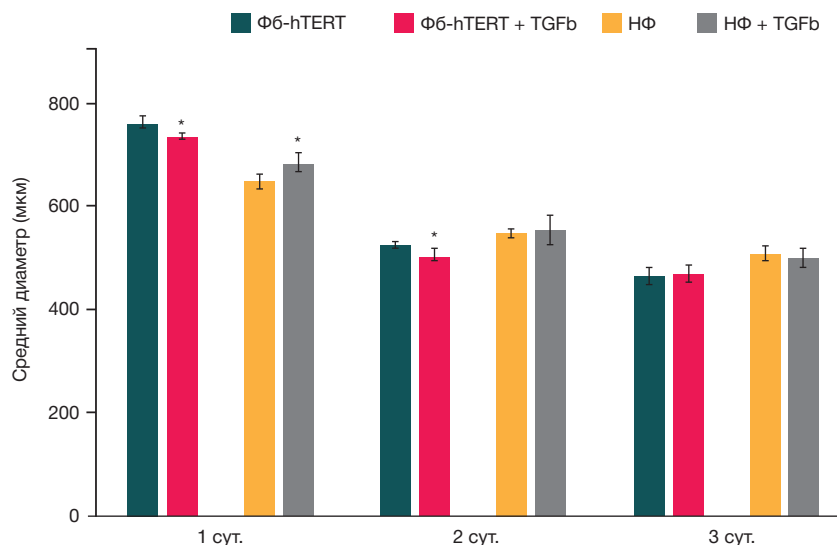


Рис. 4. Средний диаметр сфероидов, сформированных из НФ и Фб-hTERT в зависимости от времени инкубирования в условиях добавления в питательную среду TGF β 1 (1 нг/мл) и без (контроль). Для получения исходных сфероидов сопоставимого размера при их формировании использовали 20 тыс. клеток — для НФ и 10 тыс. клеток — для Фб-hTERT. * — статистически значимые отличия от группы контроля при том же сроке инкубации ($p < 0,05$)

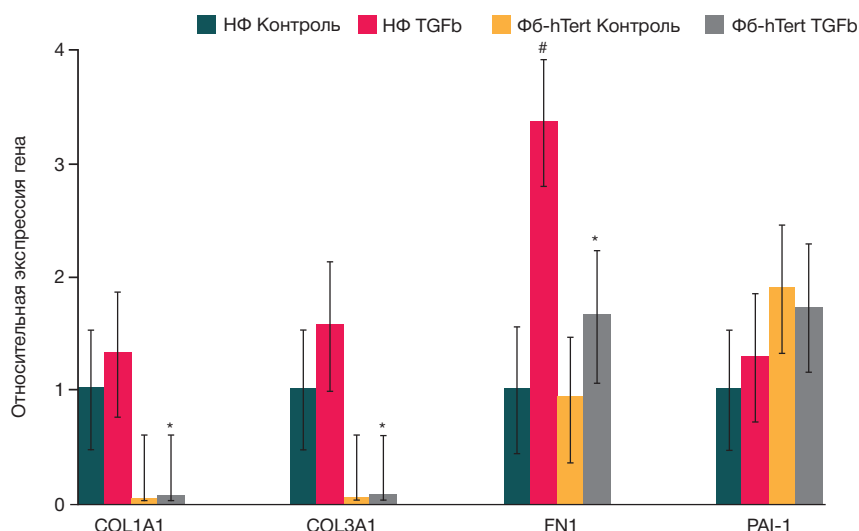


Рис. 5. Уровень экспрессии генов, ассоциированных с развитием гиперпластических процессов, в клетках НФ и Фб-hTert в интактном состоянии и при воздействии TGFβ1 (1 нг/мл). * — статистически значимые отличия в экспрессии гена в клетках Фб-hTERT от НФ при том же воздействии TGFβ1 ($p < 0,05$); # — статистически значимые различия в экспрессии гена в линиях клеток при воздействии TGFβ1 и без ($p < 0,05$)

синтез коллагенов I и III. В клетках Фб-hTERT, в свою очередь, несколько более активно экспрессировался *PAI-1*. Экспрессия гена, кодирующего синтез фибронектина, в клетках НФ и Фб-hTERT была сопоставимой.

При инкубации исследуемых клеток с TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл в течение двух суток в клетках НФ по сравнению с контролем отмечена тенденция к увеличению экспрессии всех исследованных генов. Значимые различия выявлены для гена, кодирующего синтез фибронектина.

В то же время в клетках Фб-hTERT при воздействии TGFβ1 достоверное изменение экспрессии *COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *PAI-1* не обнаружено.

Отмеченные различия базовой и стимулированной TGFβ1 экспрессии коллагена I клетками НФ и Фб-hTERT сохранялись и при их культивировании в виде сфероидов (рис. 6А). По данным микроскопического исследования, уровень экспрессии коллагена в сфероидах, сформированных из НФ, был значительно выше, чем в сфероидах Фб-hTERT (рис. 6Б). При воздействии TGFβ1 в сфероидах, сформированных из НФ, наблюдалось выраженное увеличение продукции коллагена I в 1,7 раз, в то время как в сфероидах, полученных из Фб-hTERT, в тех же экспериментальных условиях увеличение экспрессии коллагена I было умеренным (в 1,4 раза).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено сравнительное исследование нормальных и телемеризованных фибробластов кожи человека (НФ и Фб-hTERT соответственно) в аспекте возможности стимулирования их профиброгенного потенциала *in vitro*. Известно, что в фибробластах, выделенных из келоидных рубцов, происходит активация теломеразы [6]. По этому параметру келоидные фибробласты оказываются отчасти схожими с иммортализованными клетками, что определяет перспективность использования Фб-hTERT в качестве модельных клеток при разработке *in vitro* моделей патологических гиперпластических (келоидных и гипертрофических) рубцов. В то же время, по данным литературы, фенотип нормальных фибробластов может быть значительно приближен к таковому у клеток, выделенных из патологических рубцов, в результате использования ростовых факторов, играющих ключевое значение в патогенезе гиперпластических патологических

процессов, в частности TGFβ1 [16]. Известно, что данный ростовой фактор активирует множество сигнальных каскадов, приводящих к увеличению пролиферации, адгезии и миграции клеток, продукции внеклеточного матрикса [17].

Как было отмечено ранее, для моделирования *in vitro* любой ткани, в том числе соединительной ткани в норме и при патологическом рубцевании, важно воспроизведение ее трехмерной структуры, позволяющее обеспечивать поведение клеток с учетом их межклеточного взаимодействия и взаимного влияния. В связи с этим исследованы фенотипические особенности НФ и Фб-hTERT при их культивировании в виде клеточных сфероидов. Эту модель активно используют для исследования канцерогенеза и экспериментальной оценки эффективности противораковой терапии, ввиду того что микроокружение, питание, газообмен и физиология клеток в сфероидах наиболее точно воспроизводят таковые в опухолях [18]. В то же время сфероиды ранее не использовали для создания клеточной модели патологического гиперпластического рубца, что определяет новизну полученных результатов.

В целом, интактные Фб-hTERT по сравнению с НФ имели ряд фенотипических признаков, характерных для иммортализованных клеток: более мелкие размеры, высокую скорость удвоения и формирования конфлюентного монослоя, что, по-видимому, обусловлено их высокой пролиферативной активностью. Эта особенность Фб-hTERT, вероятно, также определяет и более высокую по сравнению с НФ метаболическую активность клеток в покое и при воздействии TGFβ1 (данные МТТ-теста).

Метод МТТ позволяет оценить метаболическую или при некоторых допущениях пролиферативную активность клеток [19]. В настоящем исследовании показано дозозависимое влияние TGFβ1 на метаболическую активность НФ и Фб-hTERT, более выраженное для Фб-hTERT. Данное наблюдение согласуется с результатами других исследований, посвященных оценке влияния TGFβ1 на пролиферативную и метаболическую активность фибробластов [20, 21]. В целом наибольшее увеличение метаболической активности исследованных клеток было отмечено при воздействии TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл, более выраженное — у Фб-hTERT.

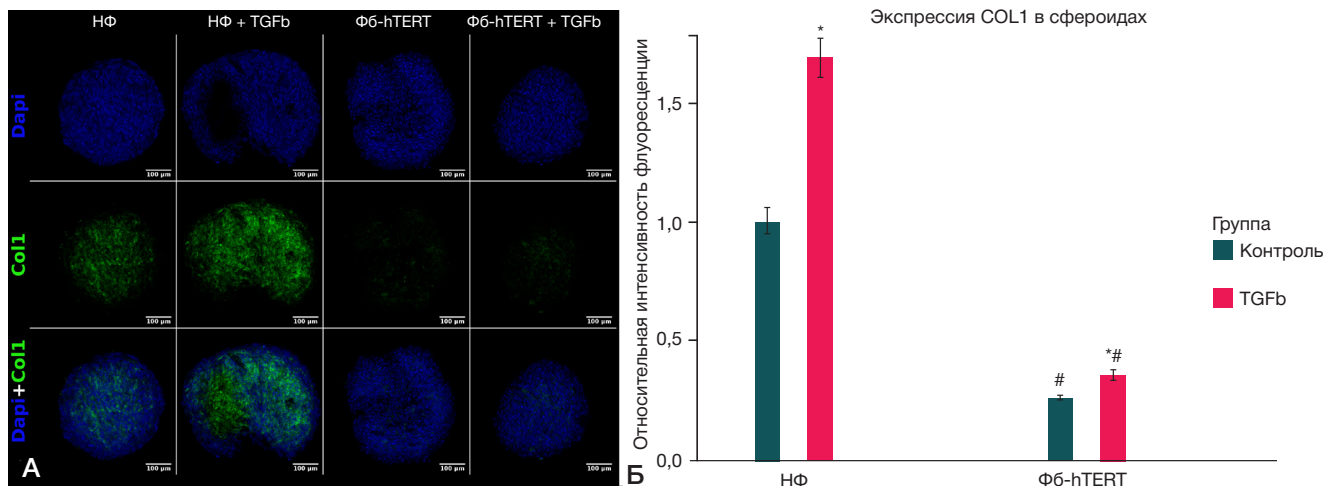


Рис. 6. Продукция коллагена I в сфероиде, сформированных из клеток НФ и Фб-hTERT при воздействии TGFβ1 в концентрации 1 нг/мл. **А.** Иммунофлуоресценция, лазерная конфокальная микроскопия, ув. ×100; синий — окраска ядер Dapi, зеленый — коллаген I. **Б.** Относительная интенсивность флуоресценции коллагена I в сфероиде НФ и Фб-hTERT при воздействии TGFβ1 (1 нг/мл). * — статистически значимые различия в интенсивности флуоресценции коллагена I в сфероиде при воздействии TGFβ1 и без ($p < 0,05$); # — статистически значимые отличия в интенсивности флуоресценции коллагена I в сфероиде Фб-hTERT от НФ при том же воздействии TGFβ1 ($p < 0,05$)

Динамика изменения размеров сфероидов в процессе их культивирования, зарегистрированная в настоящем исследовании, согласуется с результатами других экспериментов [22, 23]. В них также отмечены резкое уменьшение размеров сфероидов в первые сутки культивирования и последующий постепенный переход на плато, что называют «созреванием» клеточного сфероида. Представляются также закономерными результаты о более резком уменьшении размеров сфероидов, для формирования которых использовали большее число клеток (максимальным этот показатель был для сфероидов, сформированных из 20 тыс. клеток), так как оптимальными, с точки зрения возможности обеспечения проникновения питательных веществ к клеткам сфероида и адекватного газообмена, считают диаметры сфероидов в диапазоне от 200–500 мкм [24].

Необходимо отметить, что сфероиды, сформированные из Фб-hTERT, были значительно крупнее сфероидов, полученных из НФ, несмотря на более крупные размеры данных клеток. Это может быть обусловлено более высокой пролиферативной активностью телемеризованных клеток. В то же время нельзя исключить, что сфероиды из Фб-hTERT имели сниженную способность к уплотнению (ретракции) за счет слабых межклеточных контактов.

Воздействие TGFβ1 приводило к уменьшению размеров сфероидов, сформированных из Фб-hTERT, а также увеличивало скорость заполнения дефекта монослоя (scratch-тест), более низкую у интактных Фб-hTERT, по сравнению с НФ. Возможно, наряду с увеличением пролиферативной активности в данной экспериментальной ситуации усиливалась способность клеток Фб-hTERT к адгезии и межклеточной кооперации. Однако данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Важно отметить, что клетки Фб-hTERT имели и другие фенотипические отличия от нормальных дифференцированных фибробластов. Например, продукция основных специфических для данных клеток белков, используемых для формирования структур волокнистой соединительной ткани (коллаген I и III типов, фибронектин), была снижена, по сравнению с НФ как в интактных клетках, так и при стимуляции TGFβ1, в том числе при культивировании клеток в виде сфероидов (данные ПЦР-исследования, флуоресцентного

окрашивания клеток в составе сфероидов). Так как данные клетки иммортализованы, по-видимому, в них наиболее активны программы пролиферации, а не дифференцировки. В связи с этим, как в исходных, так и в стимулированных клетках, наблюдается низкая экспрессия генов, связанных с продукцией коллагена (характерна для дифференцированных клеток соединительной ткани). В то же время НФ демонстрировали состоятельность этих программ, активность которых возрастала при воздействии TGFβ1.

Как известно, экспрессия генов, обеспечивающих синтез компонентов соединительной ткани, оказывается повышенной в клетках келоидных рубцов. Рядом исследователей показано повышение транскрипции и трансляции коллагена I и III типов, фибронектина в локусах гиперпластических процессов [2]. Повышенным уровнем экспрессии гена ингибитора активатора плазминогена PAI-1, не характерным для нормальных фибробластов, объясняют увеличение количества коллагена в келоидах [25]. Примечательно, что в нашем исследовании экспрессия гена PAI-1 у интактных клеток Фб-hTERT была выше, чем у НФ.

Кроме того, интактные НФ более активно, по сравнению с Фб-hTERT, восстанавливали дефект монослоя (scratch-тест). Данный методический подход используют для косвенной оценки регенераторного потенциала клеток (способности восстанавливать дефект). При этом скорость заполнения дефекта клетками обусловлена увеличением их пролиферации и/или миграционной активности. Известно, что TGFβ1 способствует заживлению ран [17]. В наших экспериментах воздействие TGFβ1 приводило к увеличению скорости заполнения дефекта клетками Фб-hTERT, но не НФ. Для оценки данного результата необходим дальнейший анализ влияния TGFβ1 в клетках Фб-hTERT и НФ на клеточные программы адгезии и межклеточной кооперации, участвующие в реализации способности клеток к миграции.

ВЫВОДЫ

Теломеризованные фибробласты имеют ряд фенотипических признаков, характерных для келоидных фибробластов: высокую пролиферативную и метаболическую активность;

способность по сравнению с НФ восстанавливать дефект монослоя (scratch-тест) под воздействием TGFβ1; повышенный по сравнению с НФ уровень экспрессии гена *PAI-1* (на уровне тенденции, статистически незначимо). Важны их способность к неограниченному числу делений, фенотипическая однородность клеток различных пассажей, способность образовывать клеточные сфероиды, что определяет перспективность использования данных клеток при 3D-моделировании патологических гиперпластических рубцов. Однако в данных клетках снижена экспрессия

белков, ассоциированных с продукцией компонентов внеклеточного матрикса (COL1A1, COL3A1, FN1), в том числе и при воздействии TGFβ1. В то время как для келоидных фибробластов характерна гиперпродукция данных белков. Данное обстоятельство следует учитывать при использовании Фб-hTERT для моделирования патологических гипертрофических рубцов. Целесообразны дальнейшие исследования для оценки возможности и условий активации экспрессии белков внеклеточного матрикса в данных клетках.

Литература

- Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease. *Histology and histopathology*. 2015; 30 (9): 1033–57.
- Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012; 26 (2): 141–152.
- Liang CJ, Yen YH, Hung LY, Wang SH, Pu CM, Chien HF, et al. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF-β1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway. *Biochemical pharmacology*. 2013; 85 (11): 1594–02.
- De Felice B, Wilson RR, Nacca M. Telomere shortening may be associated with human keloids. *BMC medical genetics*. 2009; 10 (1): 110.
- Huang Y, Lin LX, Bi QX, Wang P, Wang XM, Liu J, et al. Effects of hTERT antisense oligodeoxynucleotide on cell apoptosis and expression of hTERT and bcl-2 mRNA in keloid fibroblasts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017; 21 (8): 1944–51.
- Yu D, Shang Y, Yuan J, Ding S, Luo S, Hao L. Wnt/β-catenin signaling exacerbates keloid cell proliferation by regulating telomerase. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016; 39 (5): 2001–13.
- Kischer CW, Thies AC, Chvapil M. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Human pathology*. 1982; 13 (9): 819–24.
- Bran GM, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis. *International journal of molecular medicine*. 2009; 24 (3): 283–93.
- Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF-β)? *British journal of plastic surgery*. 2004; 57 (3): 215–21.
- Yang GP, Lim IJ, Phan TT, Lorenz HP, Longaker MT. From scarless fetal wounds to keloids: molecular studies in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2003; 11 (6): 411–8.
- Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGFβ) and keloid disease. *International journal of surgery*. 2007; 5 (4): 278–85.
- Egorov EE, Terekhov SM, Vishniakova K, Karachentsev DN, Kazimirchuk EV, Tsvetkova TG, et al. Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. *Ontogenez*. 2003; 34 (3): 183.
- Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. In *Mammalian cell viability*. Humana Press. 2011: 13–19.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012; 9 (7): 676–82.
- Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*. 2006; 7 (10): R100.
- Lee TY, Chin GS, Kim W, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Annals of plastic surgery*. 1999; 43 (2): 179–84.
- Klass BR, Grobelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor β1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal*. 2009; 85 (999): 9–14.
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *International journal of radiation biology*. 2007; 83 (11–12): 849–71.
- Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of immunological methods*. 1991; 145 (1–2): 199–203.
- Meran S, Thomas DW, Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, et al. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-β1-mediated fibroblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (10): 6530–45.
- Negreros M, Hagood JS, Espinoza CR, Balderas-Martínez YI, Selman M, Pardo A. Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts. *PloS one*. 2019; 14 (10): e0223512.
- Takezawa T, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K. Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. *Experimental cell research*. 1993; 208 (2): 430–41.
- Frandsen SK, Gibot L, Madi M, Gehl J, Rols MP. Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *PLoS One*. 2015; 10 (12): e0144028.
- Mittler F, Obeid P, Rulina AV, Haguët V, Gidrol X, Balakirev MY. High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model. *Frontiers in oncology*. 2017; 7: 293.
- Tuan TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, et al. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *The American journal of pathology*. 2003; 162 (5): 1579–89.
- Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease. *Histology and histopathology*. 2015; 30 (9): 1033–57.
- Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012; 26 (2): 141–152.
- Liang CJ, Yen YH, Hung LY, Wang SH, Pu CM, Chien HF, et al. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF-β1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway. *Biochemical pharmacology*. 2013; 85 (11): 1594–02.
- De Felice B, Wilson RR, Nacca M. Telomere shortening may be associated with human keloids. *BMC medical genetics*. 2009; 10 (1): 110.
- Huang Y, Lin LX, Bi QX, Wang P, Wang XM, Liu J, et al. Effects of hTERT antisense oligodeoxynucleotide on cell apoptosis and expression of hTERT and bcl-2 mRNA in keloid fibroblasts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*.

- 2017; 21 (8): 1944–51.
6. Yu D, Shang Y, Yuan J, Ding S, Luo S, Hao L. Wnt/ β -catenin signaling exacerbates keloid cell proliferation by regulating telomerase. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016; 39 (5): 2001–13.
7. Kischer CW, Thies AC, Chvapil M. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Human pathology*. 1982; 13 (9): 819–24.
8. Bran GM, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis. *International journal of molecular medicine*. 2009; 24 (3): 283–93.
9. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)?. *British journal of plastic surgery*. 2004; 57 (3): 215–21.
10. Yang GP, Lim IJ, Phan TT, Lorenz HP, Longaker MT. From scarless fetal wounds to keloids: molecular studies in wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2003; 11 (6): 411–8.
11. Jagadeesan J, Bayat A. Transforming growth factor beta (TGF β) and keloid disease. *International journal of surgery*. 2007; 5 (4): 278–85.
12. Egorov EE, Terekhov SM, Vishniakova K, Karachentsev DN, Kazimirchuk EV, Tsvetkova TG, et al. Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. *Ontogenez*. 2003; 34 (3): 183.
13. Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. In *Mammalian cell viability*. Humana Press. 2011: 13–19.
14. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012; 9 (7): 676–82.
15. Carpenter AE, Jones TR., Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*. 2006; 7 (10): R100.
16. Lee TY, Chin GS, Kim W, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Annals of plastic surgery*. 1999; 43 (2): 179–84.
17. Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor β 1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal*. 2009; 85 (999): 9–14.
18. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *International journal of radiation biology*. 2007; 83 (11–12): 849–71.
19. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of immunological methods*. 1991; 145 (1–2): 199–203.
20. Meran S, Thomas DW, Stephens P, Enoch S, Martin J, Steadman R, et al. Hyaluronan facilitates transforming growth factor- β 1-mediated fibroblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (10): 6530–45.
21. Negreros M, Hagood JS, Espinoza CR, Balderas-Martínez YI, Selman M, Pardo A. Transforming growth factor beta 1 induces methylation changes in lung fibroblasts. *PloS one*. 2019; 14 (10): e0223512.
22. Takezawa T, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K. Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. *Experimental cell research*. 1993; 208 (2): 430–41.
23. Frandsen SK, Gibot L, Madi M, Gehl J, Rols MP. Calcium electroporation: evidence for differential effects in normal and malignant cell lines, evaluated in a 3D spheroid model. *PLoS One*. 2015; 10 (12): e0144028.
24. Mittler F, Obeid P, Rulina AV, Haguët V, Gidrol X, Balakirev MY. High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model. *Frontiers in oncology*. 2017; 7: 293.
25. Tuan TL, Wu H, Huang EY, Chong SS, Laug W, Messadi D, et al. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *The American journal of pathology*. 2003; 162 (5): 1579–89.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАЛОЙ ЯГОДИЧНОЙ МЫШЦЫ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА

К. А. Егизарян¹, И. В. Сиротин¹✉, И. О. Чижикова², Г. Д. Лазишвили¹, А. П. Ратьев¹, А. Б. Бут-Гусаим¹

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

² Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Возникновение вывихов бедренного компонента эндопротеза — одно из частых осложнений эндопротезирования тазобедренного сустава. Наиболее популярным объяснением возникновения данного осложнения является мальпозиция компонентов эндопротеза. Однако не все вывихи удается объяснить исходя из данной гипотезы. Целью работы было уточнить значение в генезе данного осложнения повреждения мышц абдукторов бедра и в первую очередь *m. gluteus minimus*, описываемой в ряде источников как важный стабилизатор тазобедренного сустава. Для изучения данного тезиса был поставлен эксперимент с использованием четырех мужских и трех женских биоманекенов. Было произведено 12 установок эндопротеза тазобедренного сустава. В равных долях применяли доступы по Hardinge и Watson-Jones. По данным рентгенконтроля, наклон вертлужного компонента составил 40–47°, антеверсия — 10–22°, что технически и биомеханически соответствует допустимым значениям, зависимость данных показателей от типа доступа статистически не значима (для наклона вертлужного компонента $p = 0,94$; для антеверсии вертлужного компонента $p = 0,63$), что исключало мальпозицию компонентов как фактор риска вывиха. Тем не менее при пересечении переднего или заднего пучка *m. gluteus minimus* стабильность эндопротеза существенно нарушалась, что приводило к вывиху бедренного компонента при выполнении стандартных тестов ротации и сгибания. Таким образом, показана значимость *m. gluteus minimus* в стабилизации тазобедренного сустава. Сохранение или тщательное восстановление ее структуры в ходе выполнения операции позволит не только провести профилактику возникновения вывиха, но и восстановить более правильную анатомию и биомеханику оперированного сустава.

Ключевые слова: вывих эндопротеза тазобедренного сустава, малая ягодичная мышца, абдукторы бедра, артропластика тазобедренного сустава, доступ к тазобедренному суставу

Вклад авторов: К. А. Егизарян — общее руководство работой, анализ литературы, написание статьи; И. В. Сиротин, И. О. Чижикова — анализ литературы, проведение экспериментального исследования, написание статьи; Г. Д. Лазишвили, А. П. Ратьев, А. Б. Бут-Гусаим — анализ литературы, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением этических принципов медицинских исследований Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Иван Владимирович Сиротин
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; ivsir@mail.ru

Статья получена: 04.09.2020 **Статья принята к печати:** 18.09.2020 **Опубликована онлайн:** 04.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.058

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE MUSCULUS GLUTEUS MINIMUS IN TOTAL HIP ARTHROPLASTY

Yegiazaryan KA¹, Sirotnin IV¹✉, Chizhikova IO², Lazishvili GD¹, Ratiev AP¹, But-Gusaim AB¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Bureau of Forensic Medical Expertise, Moscow Department of Health, Moscow, Russia

Dislocation of the acetabular component is one of the most frequent complications of total hip arthroplasty. It is commonly attributed to implant malpositioning. However, not all dislocations can be explained by this hypothesis. The aim of our study was to elucidate the role of intraoperative injury to hip abductors (*m. gluteus minimus* in the first place, since it is reportedly an important hip stabilizer) in the development of postoperative hip dislocation. The experiment was conducted in 4 male and 3 female cadavers. A total of 12 THA were performed. The Hardinge and Watson-Jones approaches were used in equal proportion. On plain radiography, acetabular inclination was 40–47°, anteversion was 10–22°; technically and biomechanically, these values were within the normal range and did not depend on the type of surgical approach (for inclination, $p = 0.94$; for anteversion, $p = 0.63$), ruling out implant malpositioning as a risk factor for hip dislocation. Nevertheless, implant stability was significantly disrupted following transection of the anterior or posterior fascicle of *m. gluteus minimus*, leading to the dislocation of the acetabular component in standard rotation and flexion tests. Thus, our study shows the significant role of *m. gluteus minimus* in stabilizing the hip joint. Preservation or adequate repair of this muscle during surgery will reduce the risk of dislocation and help to restore the anatomy and biomechanics of the operated joint.

Keywords: hip dislocation after arthroplasty, *m. gluteus minimus*, hip abductor, hip arthroplasty, hip approach

Author contribution: Yegiazaryan KA supervised the study, analyzed the literature and contributed to writing the manuscript; Sirotnin IV, Chizhikova IO analyzed the literature, conducted the experimental part of the study and contributed to writing the manuscript; Lazishvili GD, Ratiev AP, But-Gusaim AB analyzed the literature and contributed to writing the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study followed the principles of the Declaration of Helsinki by the World Medical Association.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan V. Sirotnin
Ostrovityanova, 1, 117997, Moscow; ivsir@mail.ru

Received: 04.09.2020 **Accepted:** 18.09.2020 **Published online:** 04.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.058

В настоящее время эндопротезирование тазобедренного сустава (ЭТБС) в качестве операции выбора практикуют при большинстве патологий данного анатомического образования. Эффективность операции, по данным большинства авторов, находится в среднем на уровне около 92–95%. Вместе с тем до сих пор ряд осложнений данной

операции, пусть и в небольшом количестве, сохраняется и не поддается статистически значимому снижению [1].

Одна из подобных проблем — возникновение вывихов бедренного компонента эндопротеза в послеоперационном периоде. Наиболее часто развитие такого осложнения по многим данным происходит при использовании хирургом

задних типов доступа к суставу. Однако оно встречается и после проведения операции через традиционно более безопасные в данном плане доступы по Hardinge и Watson-Jones. Эта проблема в ряде случаев может быть объяснима неверной установкой компонентов эндопротеза, форсированными движениями в суставе, превышающими возможную амплитуду [2–4].

Интересной предпосылкой к развитию подобной ситуации является дефицит работы мышц группы абдукторов бедра, к которым традиционно относят *m. gluteus medius* и *m. gluteus minimus*. Наиболее ярко данная проблема может проявляться при переломах *trochanter major* — основного места крепления данной мышечной группы. Однако следует отметить, что в определенном числе случаев причины вывиха бедренного компонента установить достоверно не удается. Вместе с тем в ряде работ имеется указание на то, что мышцы группы абдукторов, помимо функции непосредственно отведения бедра, выполняют и другие, одной из которых, в первую очередь у *m. gluteus minimus*, является стабилизация или «центрация» головки бедренной кости в тазобедренном суставе, а также наружная и внутренняя ротация бедра [5, 6]. *M. gluteus medius* и *m. gluteus minimus* представляют собой широкие толстые и короткие пучки мышечных волокон с широкой сухожильной частью, проксимально начинающиеся от наружной поверхности *os iliaca* и дистально фиксирующиеся в области *trochanter major et fossa piriformis*. В ряде анатомических исследований, а также исследований, посвященных тенотомии абдукторов бедра, данную мышечную группу по аналогии с «вращательной манжетой плеча» обозначают как «вращательная манжета бедра».

В результате использования магнитно-резонансной томографии удалось более точно установить области прикрепления пучков *m. gluteus medius* и *m. gluteus minimus* к большому вертелу и выделить их функции. К верхнезадней и латеральной поверхностям крепятся пучки *m. gluteus medius*, три порции волокон которой стабилизируют таз в начальную фазу шага и подключаются также при ротации таза. Мышечные волокна *m. gluteus minimus* следуют к внутренней поверхности передне-верхнего края большого вертела, волокна ее ориентированы преимущественно горизонтально и служат главными стабилизаторами в среднюю и позднюю фазы шага [7].

Более детальные исследования позволяют предположить, как распределен функционал уже внутри отдельных групп мышечных волокон этих мышц. Показано, что в структуре *m. gluteus medius* абсолютно четко можно выделить передний пучок, отвечающий за внутреннюю ротацию, и задний пучок, отвечающий за наружную ротацию [8]. Отдельно вопрос, касающийся *m. gluteus minimus* отмечен в ограниченном числе публикаций, однако выделение разнофункциональных мышечных пучков отмечается и в данном образовании [8].

Было высказано предположение о важности *m. gluteus minimus* в качестве образования, способствующего стабилизации не только нативного тазобедренного сустава, но и эндопротеза [5]. Данная мышца отчасти за счет интимной связи с волокнами капсулы сустава может служить не столько «движателем» бедра, в отличие от *m. gluteus medius*, сколько «стабилизатором», по аналогии с *pes anserinus* в коленном суставе. В современной литературе это предположение не получило развития.

Целью работы было проверить предположение о том, что малая ягодичная мышца может иметь существенное значение в случае выполнения операции ЭТБС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения эксперимента использовали биоманекены без визуальных повреждений в ягодичной области и области бедра в условиях разрешенного трупного окоченения. В качестве модели имплантируемого сустава использовали набор инструментов (DePuy; США) для установки эндопротеза CORAIL-PINNACLE Construct (DePuy; США). В наличии имелись примерочные головки эндопротеза диаметром 28 мм с посадочными индексами от +1,5 до +12 мм. Установку эндопротеза традиционными доступами по Hardinge и Watson-Jones производил хирург, имеющий опыт эндопротезирования с применением данных доступов более 500 операций за последние три года.

Для проведения эксперимента было отобрано четыре мужских и три женских биоманекена (в возрасте 78–86 лет), сопоставимых по антропометрическим характеристикам, из которых для установки эндопротеза взяты три мужских (средний возраст 82,33 года) и три женских (средний возраст 84,33 года) биоманекена, с нормостеническим телосложением, без визуальных признаков повреждений в области таза и нижних конечностей (см. таблицу).

Таблица. Характеристика проведенных операций в зависимости от пола и возраста биоманекена, стороны операции, а также оперативного доступа и углов установки вертлужного компонента эндопротеза

Пол	Возраст	Сторона	Доступ	Наклон вертлужного компонента	Антеверсия вертлужного компонента
ж	82	левая	Hardinge	40	12
ж	82	правая	Watson-Jones	42	18
ж	84	левая	Watson-Jones	45	20
ж	84	правая	Hardinge	46	22
ж	87	левая	Hardinge	47	15
ж	87	правая	Watson-Jones	45	17
м	78	левая	Watson-Jones	42	20
м	78	правая	Hardinge	43	15
м	83	левая	Hardinge	41	21
м	83	правая	Watson-Jones	45	20
м	86	левая	Watson-Jones	46	12
м	86	правая	Hardinge	45	10

Примечание: м — мужской; ж — женский

Один биоманекен использовали для первичной визуализации малой ягодичной мышцы и не подвергали установке эндопротеза.

Произвели 12 установок эндопротеза тазобедренного сустава однократно с каждой стороны биоманекена. В равных долях применяли доступы по Hardinge и Watson-Jones соответственно у равного количества биоманекенов в равном половом соотношении. Оценку правильности установки компонентов эндопротеза проводили по прямым рентгенограммам тазобедренного сустава по Lewinnek [9] (рис. 1).

Значения наклона вертлужного компонента и антеверсии в зависимости от доступа оценивали с помощью теста Манна-Уитни. Вычисления выполняли при помощи стандартных и подключаемых библиотек языка Python (находится в свободном доступе).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первым этапом опосредованно оценили участие *m. gluteus minimus* в ротации бедра. Для лучшей визуализации в ходе препарирования часть *m. gluteus medius* непосредственно над *m. gluteus minimus* удалили. Визуально отметили разделение брюшка мышцы на переднюю и заднюю части, что позволило предположить наличие двух пучков мышечных волокон, имеющих сросшуюся, но широкую сухожильную часть (рис. 2).

Отмечено, что при наружной ротации бедра происходит натяжение волокон и сухожильной части переднего пучка *m. gluteus minimus*, а при внутренней ротации и при сгибании бедра — натяжение заднего пучка, ограничивающее амплитуду данных движений. Данное наблюдение позволяет предположить наличие значимой стабилизирующей функции данной мышцы для нативного тазобедренного сустава.

Вторым этапом была произведена установка эндопротеза традиционными доступами по Hardinge и Watson-Jones. После выполнения установки эндопротеза для лучшей визуализации удалили части *m. gluteus medius* непосредственно над *m. gluteus minimus*. Отмечено, что при использовании обоих доступов происходит повреждение передней части *m. gluteus minimus*, несколько в большей степени при доступе по Hardinge. Капсулу сустава не иссекали и ушивали. По данным рентгенконтроля, наклон бедренного компонента составил 40–47°, антеверсия — 10–22°, что технически и биомеханически соответствует допустимым значениям. Далее проводили наружную и внутреннюю ротацию бедра с максимально возможной индивидуальной амплитудой, а также сгибание бедра до 90°. Данные движения не спровоцировали проявления вывиха бедренного компонента эндопротеза. Тем не менее для достижения стабильности в суставе в случае использования доступа по Hardinge использовали головку с большим посадочным индексом (с большим *offset*). Тракция бедренного компонента инструментом по оси шейки эндопротеза (уже при вскрытой капсуле) также не привела к выходу головки из чашки эндопротеза.

Третьим этапом на биоманекенах с установленным эндопротезом и восстановленной капсулой в шести случаях провели полное пересечение переднего пучка при сохранении заднего пучка *m. gluteus minimus* поперечно ходу волокон. Далее провели наружную ротацию с максимально возможной индивидуальной амплитудой, что привело к вывиху изначально стабильного эндопротеза, причем ушитая капсула сустава осталась сохранной.

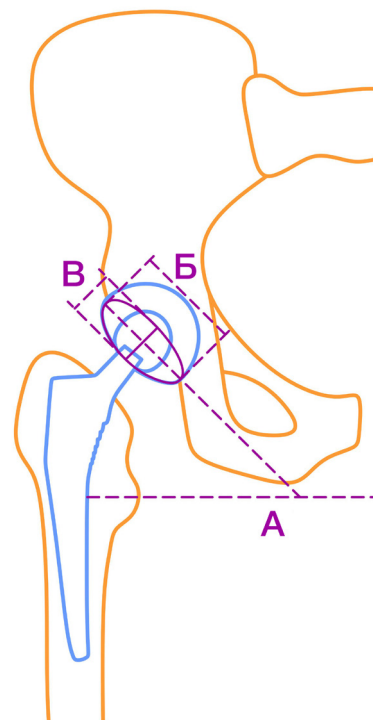


Рис. 1. Схема определения наклона и антеверсии бедренного компонента эндопротеза (наклон чашки определяли как угол между горизонталью А и продолжением длинной оси эллипса Б; антеверсия как \arcsin короткого диаметра эллипса к длинному В / Б)

Попытки скомпенсировать нестабильность эндопротеза путем увеличения *offset* головками с большим посадочным индексом из имеющихся в наличии к успеху не привели. Тракция бедренного компонента инструментом по оси шейки эндопротеза (уже при вскрытой капсуле) привела к выходу головки из чашки эндопротеза в положении разгибания бедра.

Четвертым этапом на биоманекенах с установленным эндопротезом и восстановленной капсулой также в шести случаях провели полное пересечение заднего пучка при сохранении переднего пучка *m. gluteus minimus* поперечно ходу волокон. Затем провели внутреннюю ротацию, а также изолированное сгибание бедра и сгибание совместно с внутренней ротацией, с максимально возможной индивидуальной амплитудой. Данное обстоятельство привело к вывиху изначально стабильного эндопротеза при одномоментном сгибании и внутренней ротации, причем ушитая капсула сустава осталась также сохранной. Попытки скомпенсировать нестабильность эндопротеза путем увеличения *offset* головками с большим посадочным индексом из имеющихся в наличии также не привели к успеху. Тракция бедренного компонента инструментом по оси шейки эндопротеза (уже при вскрытой капсуле) привела к выходу головки из чашки эндопротеза в положении сгибания бедра.

По данным рентгенконтроля, наклон вертлужного компонента составил 40–47°, антеверсия — 10–22°, что технически и биомеханически соответствует допустимым значениям (см. таблицу). При сравнении в полученных выборках средних значений наклона и антеверсии вертлужного компонента в зависимости от типа доступа статистически значимых различий при выполнении нами доступа по Watson-Jones и Hardinge не выявлено (для наклона вертлужного компонента: $p = 0,94$; для антеверсии вертлужного компонента: $p = 0,63$), что свидетельствует об исключении в нашем исследовании мальпозиции

компонентов как фактора риска вывиха бедренного компонента эндопротеза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современной литературе функцию абдукторов бедра оценивают преимущественно в двух аспектах. Во-первых, дегенеративное или травматическое повреждение данного мышечного комплекса провоцирует выраженный болевой синдром и нарушение походки [10]. Во-вторых, в случае отрыва (возможно в результате перелома *trochanter major*) или слабости абдукторов (повреждение *nervus gluteus superior*) возникает нестабильность искусственного сустава [11].

Показано, что физиологическая площадь поперечного сечения мышечной части *m. gluteus minimus* меньше таковой у *m. gluteus medius*, из чего следует, что и сила сокращения ее волокон пропорционально слабее [12]. Возможно, именно конструкционные особенности отдельных пучков *m. gluteus minimus* обуславливают ее роль стабилизатора. В нескольких сериях анатомических диссекций было выявлено, что часть пучков *m. gluteus minimus* могут быть связаны и с капсулой сустава, однако функциональная роль такой связи, а также степень ее распространенности и выраженности пока остаются предметом дискуссий [6, 13].

Изучение функции мышц, отводящих бедро, с применением ультразвуграфии и функциональных тестов показало, что толщина исследованных *in vivo* мышц не коррелирует с их силой или функциональностью, однако такое явление, по мнению авторов, могло быть обусловлено невозможностью провести изолированные измерения отдельных пучков *in vivo* [14].

Вместе с тем работ, посвященных изучению детальных функций, в первую очередь *m. gluteus minimus*, крайне мало. Данное обстоятельство в определенной доле связано с тем, что патология рассматриваемых анатомических структур вне эндопротезирования встречается относительно редко и обычно хорошо поддается традиционным методам лечения, что не требует детального изучения анатомии.

На современном этапе развития оперативной ортопедии даже такой успешный метод, как ЭТБС, требует более глубокого понимания причин развития осложнений, пусть их количество и незначительно. Оно позволит еще больше понизить риск выполнения оперативного вмешательства и внесет значительный вклад в понимание биомеханики как нативного, так и искусственного сустава, позволив повысить качество проводимого лечения, а также с большим успехом лечить возникающие осложнения.

В нашем исследовании рассмотрена возможность повреждения *m. gluteus minimus* в ходе выполнения латеральных доступов к тазобедренному суставу. Вместе с тем результаты эксперимента, а также некоторые литературные данные [15] позволяют предположить значимую роль повреждения заднего пучка *m. gluteus*

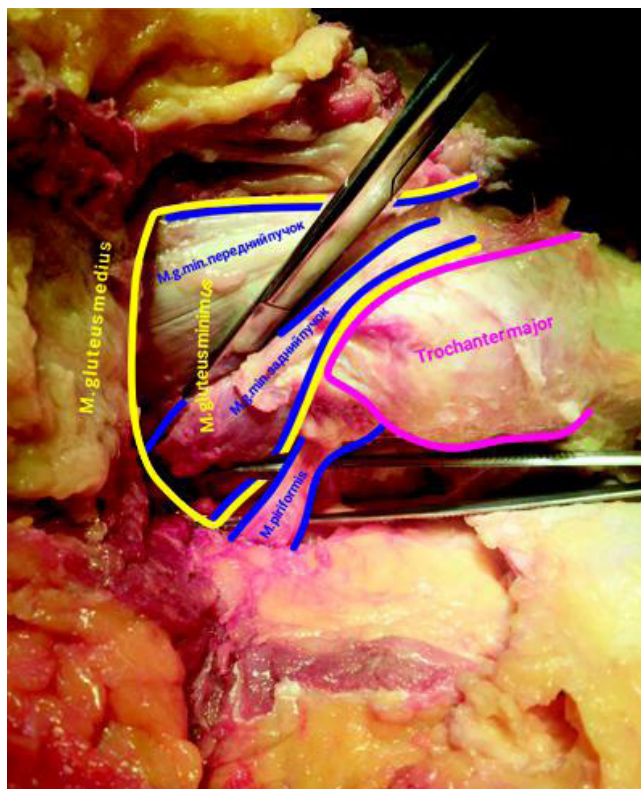


Рис. 2. Вертельная область с местом прикрепления *m. gluteus minimus* и частичной визуализацией наружных ротаторов бедра (см. текст)

minimus и в ходе выполнения группы задних доступов. Хотя наиболее важно для сохранения стабильности в суставе при выполнении задних доступов восстановление сухожильной части *m. piriformis*, повреждение данного участка мышцы является весьма вероятной причиной развития задних вывихов бедренного компонента даже при восстановленной *m. piriformis*.

ВЫВОДЫ

В эксперименте показана значительная роль *m. gluteus minimus* в стабилизации тазобедренного сустава. Особенно значимой эта роль может оказаться в случае проведения ЭТБС. Сохранение или тщательное восстановление структуры *m. gluteus minimus* в ходе выполнения оперативного доступа или ушивания мягких тканей позволит не только провести профилактику возникновения вывиха, но и восстановить более правильную анатомию и биомеханику оперированного сустава. Требуется дальнейшее изучение функций как *m. gluteus minimus*, так и других мышц и связок, окружающих тазобедренный сустав, в свете их влияния на стабильность установленного эндопротеза и степени свободы, дающейся суставу при релизе того или иного образования, по аналогии с коленным суставом.

Литература

1. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007; 370: 1508–19.
2. De Martino I, Triantafyllopoulos GK, Sculco PK, Sculco TP. Dual mobility cups in total hip arthroplasty. *World J Orthop*. 2014; 5: 180–7.
3. De Martino I, D'Apolito R, Soranoglou VG, Poultides LA, Sculco

- PK, Sculco TP Dislocation following total hip arthroplasty using dual mobility acetabular components: a systematic review. *Bone Joint J*. 2017 Jan; 99-B (ASuppl1): 18–24.
4. Tsikandylakis G, Kärrholm JN, Hallan G, Furnes O, Eskelinen A, Mäkelä K, Pedersen AB, Overgaard S, Mohaddes M. Is there a

reduction in risk of revision when 36-mm heads instead of 32 mm are used in total hip arthroplasty for patients with proximal femur fractures? *Acta Orthop*. 2020 Apr 14; 1–7.

5. Beck M, Sledge JB, Gautier E, Dora CF, Ganz R.J The anatomy and function of the gluteus minimus muscle. *Bone Joint Surg Br*. 2000 Apr; 82 (3): 358–63.
6. Flack NA, Nicholson HD, Woodley SJ. The anatomy of the hip abductor muscles. *Clin Anat*. 2014; 27 (2): 241–53.
7. Pfirrmann CW, Chung CB, Theumann NH, Trudell DJ, Resnick D. Greater Trochanter of the Hip: Attachment of the Abductor Mechanism and a Complex of three bursae — MR Imaging and MR Bursography in Cadavers and MR Imaging in Asymptomatic Volunteers. *Radiology*. 2001; 221 (2): 469–77.
8. Conneely M, O'Sullivan K, Edmondston S. Dissection of gluteus maximus and medius with respect to their suggested roles in pelvic and hip stability: Implications for rehabilitation? *Phys Therapy Sport Conf Proc*. 2006; 7: 176–8.
9. Park YS, Shin WC, Lee SM, et al. The Best Method for Evaluating Anteversion of the Acetabular Component After Total Hip Arthroplasty on Plain Radiographs. *J Orthop Surg Res*. 2018 Apr

2; 13 (1): 66.

10. Gulledge CM, Makhni EC. Open Gluteus Medius and Minimus Repair With Double-Row Technique and Bioinductive Implant Augmentation. *Arthrosc Tech*. 2019 May 17; 8 (6): e585–e589.
11. Kung PL, Ries MD. Effect of Femoral Head Size and Abductors on Dislocation after revision THA. *Clin Orthop Relat Res*. 2007; 465: 170–4.
12. Parvaresh KC, Chang C, Patel A, Lieber RL, Ball ST, Ward SR. Architecture of the Short External Rotator Muscles of the Hip. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019; 20 (1): 611.
13. Walters J, Solomons M, Davies J. Gluteus minimus: observations on its insertion. *J Anat*. 2001; 198 (Pt 2): 239–42.
14. Whiler L, Fong M, Kim S, et al. Gluteus Medius and Minimus Muscle Structure, Strength, and Function in Healthy Adults: Brief Report. *Physiother Can*. 2017; 69 (3): 212–16.
15. Whiteside LA, Roy ME. Incidence and Treatment of Abductor Deficiency During Total Hip Arthroplasty Using the Posterior Approach: Repair With Direct Suture Technique and Gluteus Maximus Flap Transfer. *Bone Joint J*. 2019 Jun; 101-B (6_Supple_B): 116–22.

References

1. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007; 370: 1508–19.
2. De Martino I, Triantafyllopoulos GK, Sculco PK, Sculco TP. Dual mobility cups in total hip arthroplasty. *World J Orthop*. 2014; 5: 180–7.
3. De Martino I, D'Apolito R, Soranoglou VG, Poultsides LA, Sculco PK, Sculco TP Dislocation following total hip arthroplasty using dual mobility acetabular components: a systematic review. *Bone Joint J*. 2017 Jan; 99-B (ASuppl1): 18–24.
4. Tsikandylakis G, Kärrholm JN, Hallan G, Furnes O, Eskelinen A, Mäkelä K, Pedersen AB, Overgaard S, Mohaddes M. Is there a reduction in risk of revision when 36-mm heads instead of 32 mm are used in total hip arthroplasty for patients with proximal femur fractures? *Acta Orthop*. 2020 Apr 14; 1–7.
5. Beck M, Sledge JB, Gautier E, Dora CF, Ganz R.J The anatomy and function of the gluteus minimus muscle. *Bone Joint Surg Br*. 2000 Apr; 82 (3): 358–63.
6. Flack NA, Nicholson HD, Woodley SJ. The anatomy of the hip abductor muscles. *Clin Anat*. 2014; 27 (2): 241–53.
7. Pfirrmann CW, Chung CB, Theumann NH, Trudell DJ, Resnick D. Greater Trochanter of the Hip: Attachment of the Abductor Mechanism and a Complex of three bursae — MR Imaging and MR Bursography in Cadavers and MR Imaging in Asymptomatic Volunteers. *Radiology*. 2001; 221 (2): 469–77.
8. Conneely M, O'Sullivan K, Edmondston S. Dissection of gluteus maximus and medius with respect to their suggested roles in pelvic and hip stability: Implications for rehabilitation? *Phys Therapy Sport Conf Proc*. 2006; 7: 176–8.
9. Park YS, Shin WC, Lee SM, et al. The Best Method for Evaluating Anteversion of the Acetabular Component After Total Hip Arthroplasty on Plain Radiographs. *J Orthop Surg Res*. 2018 Apr 2; 13 (1): 66.
10. Gulledge CM, Makhni EC. Open Gluteus Medius and Minimus Repair With Double-Row Technique and Bioinductive Implant Augmentation. *Arthrosc Tech*. 2019 May 17; 8 (6): e585–e589.
11. Kung PL, Ries MD. Effect of Femoral Head Size and Abductors on Dislocation after revision THA. *Clin Orthop Relat Res*. 2007; 465: 170–4.
12. Parvaresh KC, Chang C, Patel A, Lieber RL, Ball ST, Ward SR. Architecture of the Short External Rotator Muscles of the Hip. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019; 20 (1): 611.
13. Walters J, Solomons M, Davies J. Gluteus minimus: observations on its insertion. *J Anat*. 2001; 198 (Pt 2): 239–42.
14. Whiler L, Fong M, Kim S, et al. Gluteus Medius and Minimus Muscle Structure, Strength, and Function in Healthy Adults: Brief Report. *Physiother Can*. 2017; 69 (3): 212–16.
15. Whiteside LA, Roy ME. Incidence and Treatment of Abductor Deficiency During Total Hip Arthroplasty Using the Posterior Approach: Repair With Direct Suture Technique and Gluteus Maximus Flap Transfer. *Bone Joint J*. 2019 Jun; 101-B (6_Supple_B): 116–22.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОЙ КОАГУЛЯЦИИ СЕТЧАТКИ ПРИ БОЛЕЗНИ ИЛЗА

Х. П. Тахчиди, Е. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина , М. В. Мокрунова

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

Болезнь Илза — идиопатическая окклюзионная воспалительная васкулопатия, которая приводит к периферической ишемии сетчатки, неоваскуляризации, рецидивирующим гемофтальмам, развитию пролиферативной ткани и нередко осложняется тракционной отслойкой сетчатки, вторичной глаукомой, окклюзией центральной вены сетчатки. В основном при ведении пациентов с данной патологией используют глюкокортикостероидную терапию, ингибиторы ангиогенеза, витреоретинальную хирургию и лазерную коагуляцию. Представленный клинический случай демонстрирует возможность использования лазерной коагуляции сетчатки при лечении болезни Илза на ишемической и пролиферативной стадиях. Полученные результаты применения лазерной коагуляции сетчатки в качестве монотерапии свидетельствуют об улучшении клинико-функциональных показателей: увеличении остроты зрения, стабилизации показателя центральной светочувствительности сетчатки, восстановлении прозрачности оптических сред, регрессе неоваскуляризации и макулярного отека на глазу с пролиферативной стадией (3b), а также стабилизации процесса на глазу в стадии ишемии (2a).

Ключевые слова: болезнь Илза, лазерная коагуляция, оптическая когерентная томография, флюоресцентная ангиография

Вклад авторов: Х. П. Тахчиди — концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Е. Х. Тахчиди — анализ литературных данных; Е. П. Тебина — написание текста; Т. А. Касмынина — лазерное лечение пациента; М. В. Мокрунова — сбор и обработка материала.

Соблюдение этических стандартов: от пациента получено согласие на лазерное лечение и обработку персональных данных.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Павловна Тебина
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 123182; ekaterinatebina@mail.ru

Статья получена: 20.09.2020 **Статья принята к печати:** 12.10.2020 **Опубликована онлайн:** 23.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.063

RETINAL LASER PHOTOCOAGULATION IN MANAGEMENT OF EALES' DISEASE

Takhchidi KhP, Takhchidi EK, Kasminina TA, Tebina EP , Mokrunova MV


Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russia

Eales' disease is an idiopathic occlusive inflammatory vasculopathy resulting in peripheral retinal ischemia, neovascularization, recurrent hemophthalmos, and proliferative tissue formation. It is often complicated by tractional retinal detachment, secondary glaucoma, and central retinal vein occlusion. The management of patients with Eales' disease includes mainly glucocorticosteroid therapy, the use of angiogenesis inhibitors, vitreoretinal surgery and laser photocoagulation. The clinical case reported demonstrates the potential of retinal laser photocoagulation for treatment of the Eales' disease in the ischemic and proliferative stages. The results of retinal laser photocoagulation used as monotherapy demonstrate the clinical and functional indices improvement: enhanced visual acuity, stabilized central retinal sensitivity value, restored clarity to the ocular media, regression of neovascularization and macular edema in the patient's eye being in the proliferative (3b) stage, and the process stabilization in the eye being in the ischemic (2a) stage of the disease.

Keywords: Eales' disease, laser photocoagulation, optical coherence tomography, fluorescein angiography

Author contribution: Takhchidi KhP — study concept and design, manuscript editing; Takhchidi EK — literature analysis; Tebina EP — manuscript writing; Kasminina TA — laser treatment; Mokrunova MV — data acquisition and processing.

Compliance with ethical standards: the patient submitted informed consent to laser treatment and personal data processing.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina P. Tebina
Volokolamskoe shosse, 30, str. 2, Moscow, 123182; ekaterinatebina@mail.ru

Received: 20.09.2020 **Accepted:** 12.10.2020 **Published online:** 23.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.063

Болезнь Илза — идиопатическая окклюзионная воспалительная васкулопатия, приводящая к периферической ишемии сетчатки, неоваскуляризации, рецидивирующим гемофтальмам и развитию пролиферативной ткани [1, 2].

По данным литературы, заболевание чаще всего встречается у здоровых молодых людей во втором десятилетии жизни и в 90% случаев протекает с поражением обоих глаз [3].

Данная патология впервые была описана британским офтальмологом Henry Eales в 1880 г. [4]. Этиопатогенез болезни Илза изучен не до конца. В последние годы в результате иммунологических, молекулярно-биологических и биохимических исследований показана роль антигена лейкоцитов человека, аутоиммунных механизмов, *Mycobacterium tuberculosis* и свободных радикалов в развитии этого заболевания [5, 6]. Естественное течение болезни довольно вариабельно и сопровождается чередованием ремиссий и обострений [7, 3].

По данным литературы, заболевание обычно начинается с поражения периферии сетчатки и характеризуется рядом изменений различной степени выраженности: венозным воспалением, ишемией и неоваскуляризацией сетчатки. Вышеперечисленные проявления часто приводят к осложнениям: рецидивирующим кровоизлияниям в сетчатку и стекловидное тело, тракционно-реграторной отслойке сетчатки, рубцово-радиальной и вторичной глаукоме [8]. В некоторых случаях болезнь затрагивает центральную зону, с дальнейшим развитием макулярного отека [9].

К «золотому стандарту» диагностики этой патологии относят флюоресцентную ангиографию (ФАГ), которая позволяет оценить кровообращение и степень поражения ретинальных сосудов: трансудацию красителя, извилистость сосудов сетчатки и телеангиоэктазии, сосудистые шунты, венозный стаз, ишемию, неоваскуляризацию сетчатки [10–12].

В 2007 г. на основании данных офтальмоскопии и ФАГ была разработана новая классификация болезни Илза [13].

Стадия 1

(1a) Перифлебит мелких сосудов

(1b) Перифлебит крупных сосудов с поверхностными кровоизлияниями сетчатки

Стадия 2

(2a): Капиллярная неперфузия

(2b): Неоваскуляризация в зоне диска зрительного нерва (ДЗН) и/или сетчатки

Стадия 3

(3a): Фиброваскулярная пролиферация

(3b): Гемофтальм

Стадия 4

(4a): Тракция и/или регматогенная отслойка сетчатки

(4b): Рубеоз радужки, неоваскулярная глаукома, осложненная катаракта, атрофия зрительного нерва

Современные методы диагностики и широкий спектр видов лечения значительно улучшают прогноз и исход болезни Илза [3, 7]. Тактика ведения пациентов зависит от клинко-патологической стадии течения заболевания [14–20] и включает в себя: прием глюкокортикостероидов (ГКС) (системных и/или периокулярных) на воспалительных стадиях [7]; интравитреальное введение ингибитора неоваскуляризации [16]; витреоретинальное хирургическое вмешательство (при наличии рецидивирующих гемофтальмов, витреоретинальных тракций и/или наличии отслойки сетчатки) [21].

Лазерная коагуляция является одним из методов выбора лечения болезни Илза на стадии ишемии сетчатки и пролиферации [3, 15, 16, 19–22]. По данным клинических исследований зарубежных авторов, после лазерной коагуляции регрессию зон неоваскуляризации сетчатки и витреоретинальных тракций выявляют в 80–90% случаев [16, 23–25]. Кроме того, лазерная коагуляция в областях ишемизированной сетчатки на бессимптомных парных глазах пациентов эффективна в качестве профилактики образования возможных осложнений данного заболевания [16, 26]. На примере клинического случая сделана попытка оценить эффективность и безопасность применения лазерной коагуляции сетчатки при лечении болезни Илза на 2a (ишемической) и 3b (пролиферативной) стадиях.

Описание клинического случая

Пациент А., 20 лет, обратился в Научно-исследовательский центр офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова с жалобами на снижение остроты зрения и наличие «плавающих» помутнений в левом глазу. Из анамнеза известно, что вышеописанные жалобы появились внезапно и беспокоят на протяжении шести месяцев. При обращении к офтальмологу по месту жительства у пациента был диагностирован увеит обоих глаз неясной этиологии и проведен курс консервативной терапии, включающий в себя ГКС. На фоне проводимого лечения положительной динамики выявлено не было.

Пациенту было проведено комплексное офтальмологическое обследование: визометрия с оценкой максимальной корригированной остроты зрения (МКОЗ), офтальмоскопия с помощью офтальмоскопа «MaxField» 78D (Ocular Inc.; США), ФАГ и спектральная оптическая когерентная томография (СОКТ) на приборе «Spectralis HRA+OCT» OCT2 85 000 Гц (Heidelberg Engineering; Германия), компьютерная периметрия на анализаторе Humphrey Field Analyzer II (Carl Zeiss Meditec Inc.; США) по программе «30-2 SITA standard», компьютерная микропериметрия с определением центральной светочувствительности (СЧ) сетчатки на анализаторе «MAIA» (CenterVue Inc.; Италия). Рентгенография органов грудной полости без патологии, проба Манту отрицательна. Результаты серологического тестирования без изменений. Начало заболевания пациент ни с чем не связывает, наследственность не отягощена. Для выполнения лазерной коагуляции использовали офтальмологическую лазерную установку модели «VISULAS Trion» в режиме 532 нм (Carl Zeiss; Германия).

При первичном обследовании было выявлено: МКОЗ правого глаза (OD) — 1,0; левого глаза (OS) — 0,1 н/к. При биомикроскопии переднего отрезка обоих глаз (OU) патологических изменений не обнаружено.

При офтальмоскопии OD: ДЗН бледно-розовый, границы четкие; в макулярной зоне рефлекс сохранен. Паравазально определяется патологический рефлекс, соотношение а : в = 2 : 3. На периферии сетчатки визуализируются аневризматические расширения сосудов

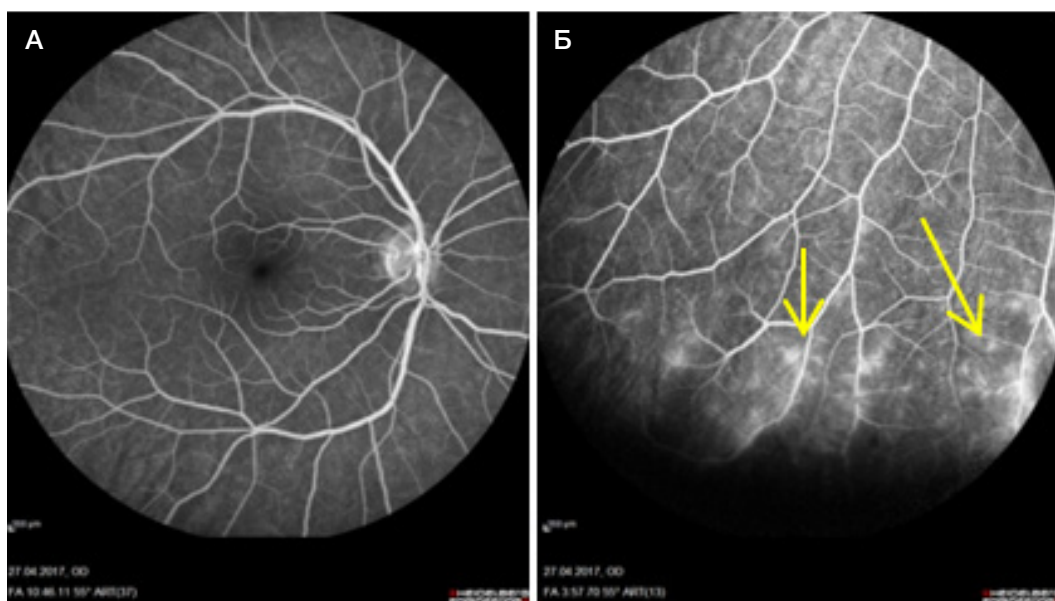


Рис. 1. ФАГ правого глаза. **А.** ДЗН с четкими границами, калибр сосудов не изменен, а : в = 2 : 3, макулярная зона без патологии. **Б.** На периферии глазного дна правого глаза в зоне патологически измененных сосудов визуализируются экстравазальный выход красителя, аневризматические изменения (желтая стрелка)

и зоны ишемии. На ФАГ в венозной фазе исследования в зонах измененных сосудов на периферии по всей окружности сетчатки обнаружены экстравазальный выход контрастного вещества и участки ишемии (рис. 1). Результаты СОКТ: макулярный профиль сохранен, ретинальные слои структурны, толщина сетчатки — 310 мкм (рис. 2).

При офтальмоскопии OS визуализация была затруднена из-за наличия частичного гемофтальма: ДЗН гиперемирован, границы ступеваны, проминирует в полость стекловидного тела; над ДЗН определялся фиброзный тяж с распространением к нижне-наружному квадранту сетчатки, макулярная зона визуализировалась нечетко. Вены расширены, извиты. На периферии в зоне 5 ч был выявлен проминирующий очаг с размытыми краями, ретинальными и преретинальными кровоизлияниями. На ФАГ в венозную фазу исследования была отмечена гиперфлюоресценция ДЗН. В центральной зоне сетчатки — гиперфлюоресценция в виде цветка (макулярный отек). На периферии в нижнем секторе — очаг гиперфлюоресценции с гипопфлюоресцентными участками (рис. 3). На СОКТ в макулярной зоне было выявлено увеличение толщины сетчатки до 600 мкм, в наружном и внутреннем ядерных слоях — кистозные полости (рис. 4).

С учетом жалоб, данных анамнеза и комплексного офтальмологического обследования пациенту был поставлен диагноз болезнь Илза, OD — 2а стадии (наличие зон ишемии по данным ФАГ), OS — 3b стадии (наличие пролиферации и гемофтальма).

Было решено провести лечение с использованием лазерной коагуляции. Объем вмешательства определяла степень поражения глазного дна: для OD (2а стадия) — расширенная периферическая лазерная коагуляция сетчатки (один сеанс), для OS (3b стадия) — панретинальная лазерная коагуляция сетчатки (четыре сеанса с интервалом месяц). Энергетические лазерные параметры для OD: мощность — 100 мВт, экспозиция — 0,1 с, диаметр пятна — 200 мкм, расстояние между аппликатами — 300 мкм, общее количество коагулятов — 500; энергетические лазерные параметры для периферии сетчатки OS: мощность — 100–120 мВт, экспозиция — 0,1 с, диаметр пятна — 200 мкм, расстояние между аппликатами — 300 мкм, общее число коагулятов составило 3000; энергетические лазерные параметры для центральной зоны сетчатки OS — мощность 50–100 мВт, экспозиция — 0,05–0,1 с, диаметр пятна — 100 мкм, расстояние между аппликатами — 150 мкм.

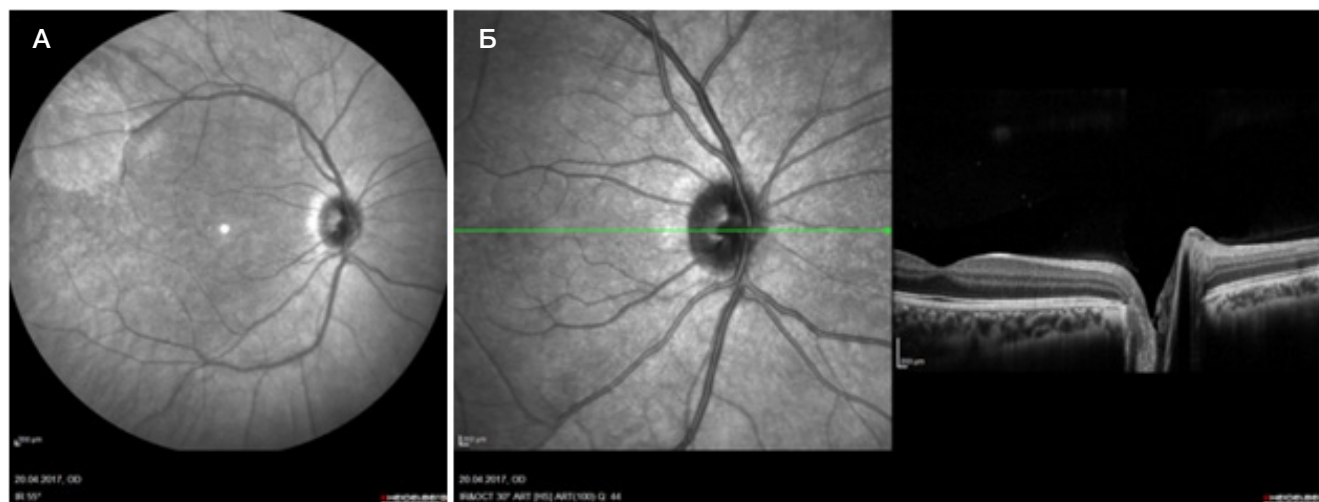


Рис. 2. А. IR-изображение глазного дна правого глаза. ДЗН с четкими границами; в макулярной зоне патологии не выявлено. Б. ОКТ правого глаза. Срез через ДЗН и макулярную зону — без патологии

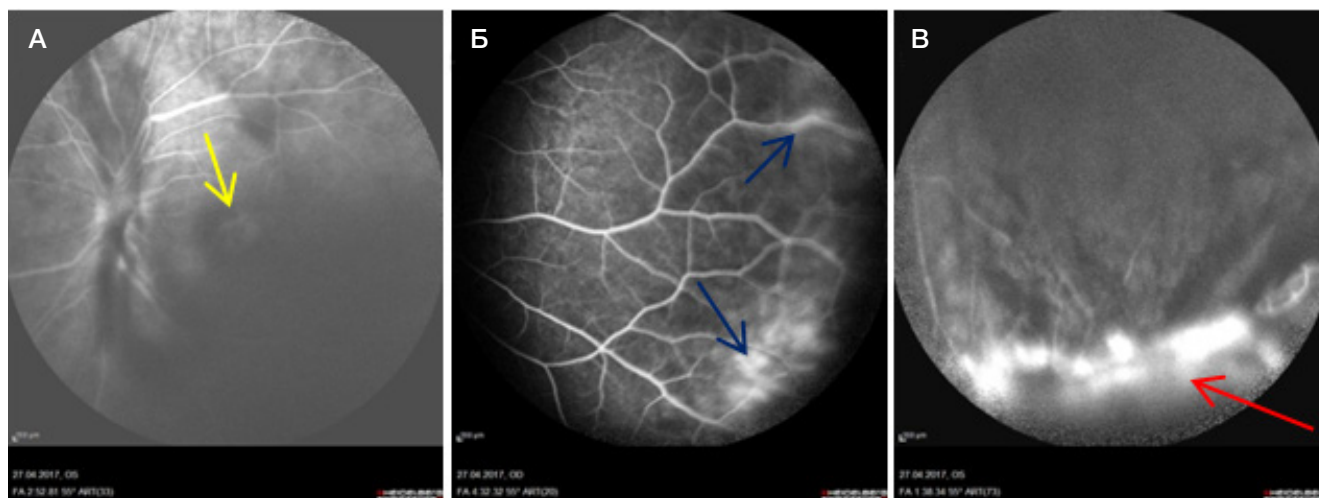


Рис. 3. ФАГ левого глаза. А. Границы ДЗН размыты; калибр сосудов изменен, через гемофтальм в центральной зоне просматривается гиперфлюоресценция в виде цветка (желтая стрелка). Б. По всей видимой периферии — перифлеблит с экстравазальным выходом красителя (синие стрелки). В. В положении на 5 ч — сформированное пролиферативное разрастание с размытыми контурами в виде плотного очага гиперфлюоресценции (красная стрелка); имеются очаги гипопфлюоресценции, соответствующие очагам кровоизлияния

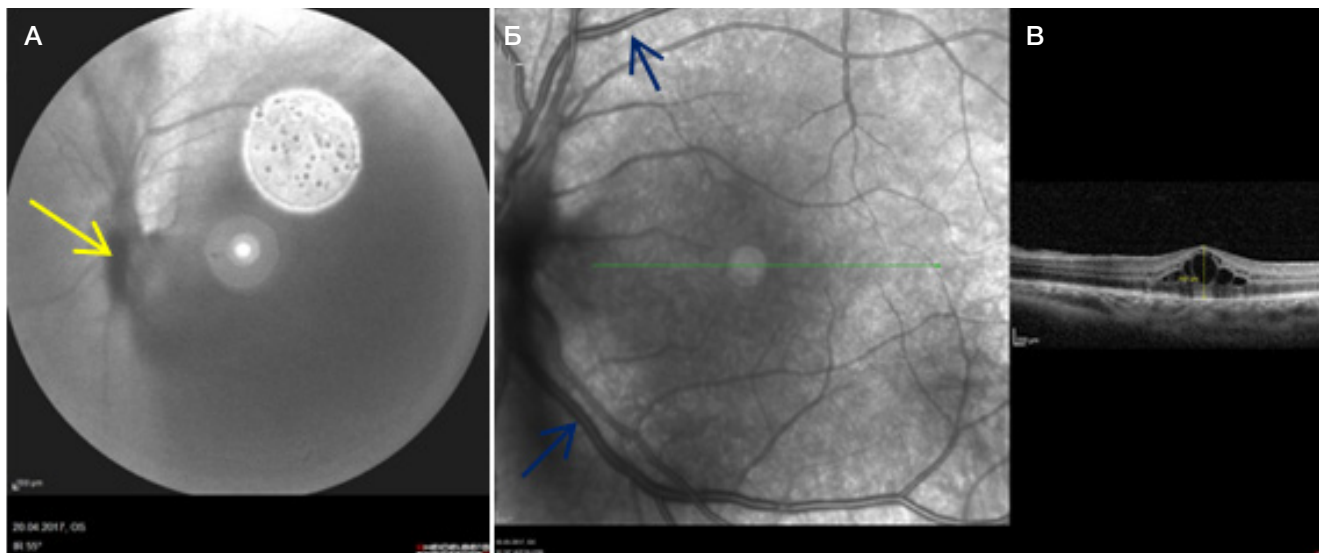


Рис. 4. А. IR-изображение глазного дна левого глаза: частичный гемофтальм; над ДЗН фиброзный тяж, распространяющийся к ниже-наружному сектору сетчатки (желтая стрелка). Б. IR-изображение глазного дна левого глаза: вены сетчатки извиты, расширены (синие стрелки). В. ОКТ макулярной зоны левого глаза: кистозный отек 600 мкм

В результате лечения через месяц МКОЗ OD составила 1,0; МКОЗ OS увеличилась до 0,7 н/к. При офтальмоскопии OD ДЗН был бледно-розового цвета с четкими границами. Соотношение ретинальных сосудов а : в = 2 : 3. В макулярной зоне патологии не обнаружено. По всей периферии сетчатки были отмечены пигментированные лазерные коагуляты, аневризматические сосуды и участки ишемии блокированы (рис. 5); при осмотре OS было отмечено уменьшение гемофтальма, ДЗН имел бледно-розовый цвет с четкими границами; фиброзный тяж уменьшился в размерах. Соотношение ретинальных сосудов а : в = 2 : 3. В центральной зоне была выявлена частичная регрессия макулярного отека, слабопигментированные лазерные коагуляты (исключая аваскулярную зону). На периферии — пигментированные лазерные коагуляты, проминирующий очаг блокирован (рис. 6).

Через два года МКОЗ OU составила 1,0. По результатам биомикроскопии OU, передний отрезок

был без патологических изменений, оптические среды прозрачные.

По данным СОКТ, OD без отрицательной динамики (рис. 7). При офтальмоскопии на периферии сетчатки были выявлены пигментированные лазерные коагуляты с четкими контурами, новые патологические очаги отсутствовали. Центральная СЧ сетчатки составила 25,7 дБ.

При офтальмоскопии OS ДЗН имел бледно-розовый цвет, границы четкие, фиброзный тяж над ДЗН уменьшился в размерах. Соотношение ретинальных сосудов а : в = 2 : 3. В макулярной зоне обнаружены слабопигментированные лазерные коагуляты (исключая аваскулярную зону). По данным СОКТ, макулярный профиль восстановлен, отек регрессировал (рис. 8). На периферии сетчатки выявлен фиброзированный очаг неоваскуляризации с четкими границами (рис. 9). Паравазально и по всей периферии — пигментированные лазерные коагуляты. Показатель центральной СЧ сетчатки составил 25,4 дБ.



Рис. 5. ОКТ макулярной зоны правого глаза: макулярный профиль сохранен, ретинальные слои структурны; в срок наблюдения через один месяц отрицательной динамики не обнаружено

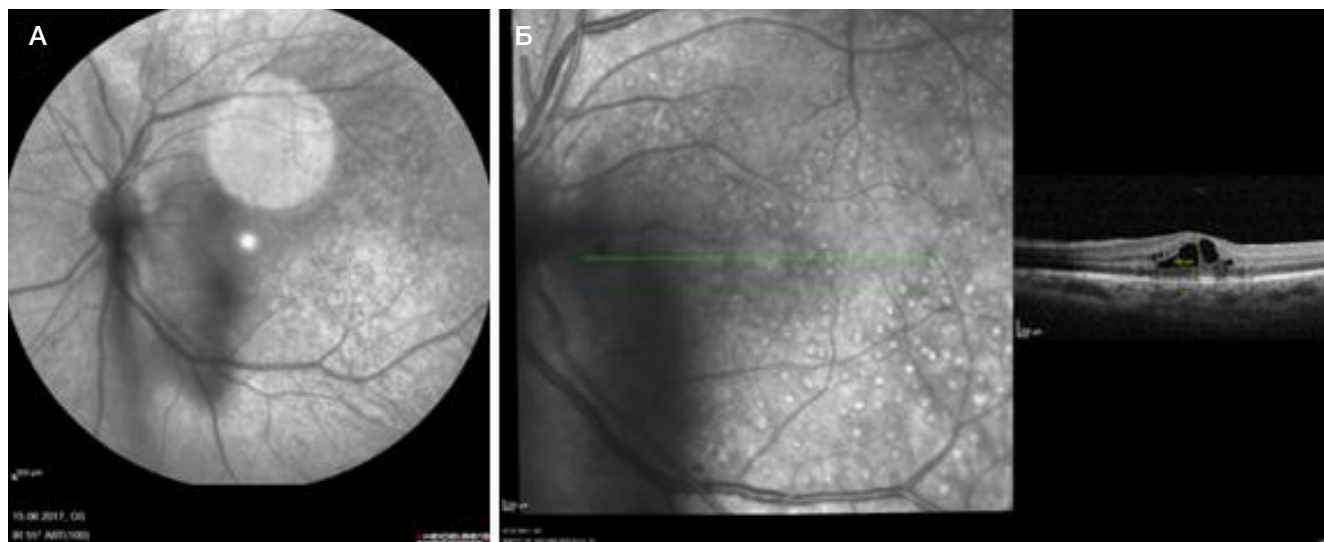


Рис. 6. А. IR-изображение глазного дна левого глаза: через месяц наблюдения отмечается уменьшение гемофтальма. **Б.** ОКТ макулярной зоны левого глаза: уменьшение макулярного отека с 600 до 500 мкм

По данным компьютерной периметрии ОУ, дефектов полей зрения не выявлено.

Обсуждение клинического случая

Успешное применение лазерной коагуляции в качестве монотерпии при неэффективности ГКС-терапии, было продемонстрировано во многих клинических зарубежных [14, 27] и отечественных исследованиях [28, 29]. Однако немаловажную роль в прогнозе лечения заболевания играют применяемые лазерные энергетические параметры. В случае использования «жесткой» лазерной коагуляции сетчатки не исключено развитие осложнений, таких как экссудативная отслойка сетчатки, ятрогенная хориоретинальная неоваскуляризация, кистозный макулярный отек, эпиретинальный фиброз, появление дефектов поля зрения, ухудшение цветового зрения и снижение контрастной чувствительности [30–32]. По данным литературы, наиболее часто используемый

размер пятна составляет 400–500 микрометров, рекомендуемая продолжительность импульса — от 0,15 до 0,2 с с интервалом 0,15–0,3 с между двумя лазерными аппликатами [3]. Схожие энергетические параметры были использованы и в других исследованиях: диаметр пятна — 400 мкм, длительность — 0,15 с, при этом мощность была подобрана индивидуально и составляла в среднем 160–200 мВт [28, 29].

В данном исследовании с целью улучшения клинико-функциональных результатов лечения пациента с болезнью Илза, в отличие от мирового опыта, была проведена лазерная коагуляция с использованием меньшего диаметра лазерного пятна (200 мкм), мощностью (100–120 мВт) и экспозицией 0,1 с. Безопасность использования лазерной коагуляции сетчатки на 2а стадии (ишемической) и 3b стадии (пролиферативной) болезни Илза с сохранением функциональных свойств сетчатки была подтверждена данными современной диагностики: компьютерной периметрии (отсутствие дефектов поля



Рис. 7. ОКТ макулярной зоны правого глаза: макулярный профиль сохранен, ретинальные слои структурны; в срок наблюдения два года отрицательной динамики не обнаружено

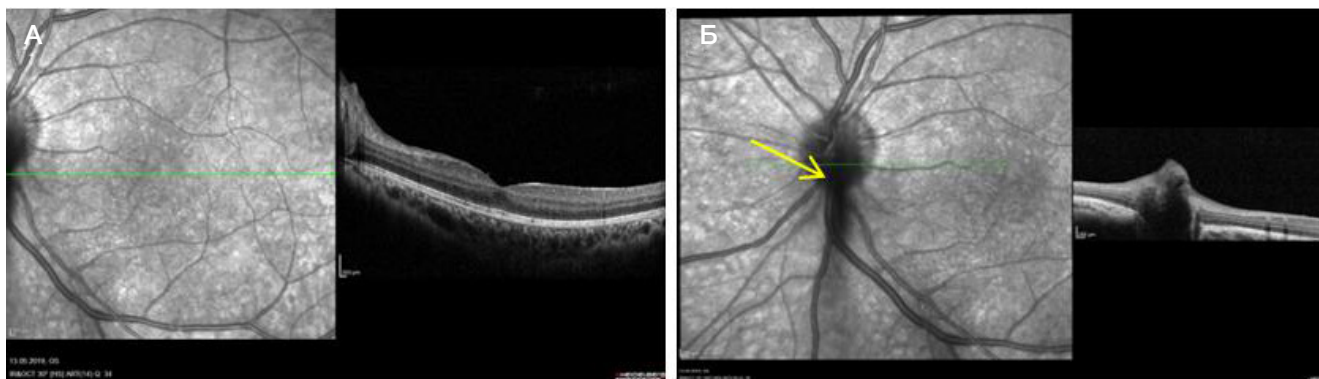


Рис. 8. А. ОКТ макулярной зоны левого глаза: кистозный макулярный отек регрессировал, архитектура ретинальных слоев восстановлена. **Б.** ОКТ ДЗН левого глаза: сохраняется фиброзный тяж над ДЗН (желтая стрелка)

зрения) и компьютерной микропериметрии (сохранение центральной СЧ сетчатки), оптической когерентной томографии (регресс кистозного макулярного отека).

Предложенные энергетические параметры позволили также получить высокие клиничко-функциональные результаты в отдаленном послеоперационном периоде, отражающиеся увеличением показателя МКОЗ, стабилизацией показателя центральной СЧ сетчатки, восстановлением прозрачности оптических сред, регрессом неоваскуляризации и макулярного отека на глазу с пролиферативной стадией (3b), а также стабилизацией процесса на глазу в стадии ишемии (2a).

ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что применение лазерной коагуляции сетчатки в качестве монотерапии при болезни Илза на ишемической (2a) и пролиферативной (3b) стадиях способствует улучшению клиничко-функциональных показателей, а отдаленные результаты лазерного лечения демонстрируют длительную ремиссию.



Рис. 9. IR-изображение глазного дна левого глаза: на периферии сетчатки в положении на 5 ч визуализируется фиброзированный очаг неоваскуляризации с четкими границами (желтая стрелка)

Литература

1. Therese KL, Deepa P, Therese J, Bagyalakshmi R, Biswas J, Madhavan HN. Association of mycobacteria with Eales' disease. *Indian J Med Res.* 2007; 126: 56–62.
2. Yannuzzi LA. The Retinal Atlas. Retinal Vascular Diseases, Eales' Disease. Elsevier. 2010: 433–8.
3. Das T, Pathengay A, Hussain N, Biswas J. Eales' disease: diagnosis and management. *Eye.* 2010; 24 (3): 472–82.
4. Eales H. Retinal haemorrhages associated with epistaxis and constipation. *Brim Med.* 1880; 9: 262.
5. Madhavan HN, Therese KL, Doraiswamy K. Further investigations on the association of Mycobacterium tuberculosis with Eales' disease. *Indian J Ophthalmol.* 2002; 50: 35–39.
6. Patwardhan SD, Azad E, Shah BM, Sharma Y. Role of intravitreal bevacizumab in Eales disease with dense vitreous haemorrhage: a prospective randomized control study. *Retina.* 2011; 31 (5): 866–70.
7. Biswas J, K R R, Pal B, Gondhale HP, Kharel Sitaula R. Long-Term Outcomes of a Large Cohort of Patients with Eales' Disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018; 26 (6): 870–6.
8. Sen A, Paine SK, Chowdhury IH, Mukherjee A, Choudhury S, Mandal LK, Bhattacharya B. Assessment of gelatinase and tumor necrosis factor-alpha level in the vitreous and serum of patients with Eales disease; role of inflammation-mediated angio-genesis in the pathogenesis of Eales disease. *Retina.* 2011; 31 (7): 1412–20.
9. Saxena S, Kumar D. Macular involvement in Eales disease. *Ann Ophthalmol.* 2000; 32 (2): 98–100.
10. Gupta V, Al-Dhibi HA, Arevalo JF. Retinal imaging in uveitis. *Saudi J Ophthalmol.* 2014; 28: 95–103.
11. Kumar V, Chandra P, Kumar A. Ultra-wide field angiography in the management of Eales disease. *Indian J Ophthalmol.* 2016; 64: 504–7.
12. Mwandoza KA, Lauer A. Eales Disease. *American Academy of Ophthalmology.* 2015. Available from: http://eyewiki.org/Eales_Disease.
13. Saxena S, Kumar D. New classification system-based visual outcome in Eales' disease. *Indian J Ophthalmol.* 2007; 55 (4): 267–9.
14. Biswas J, Ravi RK, Naryanasamy A, Kulandai LT, Madhavan HN. Eales' disease — current concepts in diagnosis and management. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2013; 3: 11.
15. Das TP, Namperumalsamy P. Photocoagulation in Eales' disease. Results of pro-spective randomised clinical study. Presented in XXVI Int Cong Ophthalmol – Singapore, 1990.
16. Ishaq M, Niazi MK. Usefulness of laser photocoagulation in managing asymptomatic eyes of Eales disease. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2002; 14 (4): 22–25.
17. Ishaq M, Feroze AH, Shahid M, Baig MA, Ameen SS, Feroze SH, Chishti RA. Intravitreal steroids may facilitate treatment of Eales' disease (idiopathic retinal vasculitis): an interventional case series.

- Eye (Lond). 2007; 21: 1403–5.
18. Kumar A, Sinha S. Rapid regression of disc and retinal neovascularization in a case of Eales disease after intravitreal bevacizumab. *Can J Ophthalmol*. 2007; 42 (2): 335–6.
19. Magargal LE, Walsh AW, Magargal HO, et al. Treatment of Eales' disease with scatter laser photocoagulation. *Ann Ophthalmol*. 1989; 21: 300–2.
20. Talat L, Lightman S, Tomkins-netzer O. Ischemic retinal vasculitis and its management. *J Ophthalmol*. 2014; 2014: 197675.
21. Li J, Liu SM, Dong WT, Li F, Zhou CH, Xu XD, Zhong J. Outcomes of transconjunctival sutureless 27-gauge vitrectomy for vitreoretinal diseases. *Int J Ophthalmol*. 2018; 11 (3): 408–15.
22. El-Asrar AM, Al-Kharashi SA. Full panretinal photocoagulation and early vitrectomy improve prognosis of retinal vasculitis associated with tuberculo-protein hypersensitivity (Eales' disease). *Br J Ophthalmol*. 2002; 86 (11): 1248–51.
23. Dehghan MH, Ahmadi H, Soheilani M, Azarmina M, Mashayekhi A, Naghibozakeri J. Therapeutic effects of laser photocoagulation and/or vitrectomy in Eales' disease. *Eur J Ophthalmol*. 2005; 15 (3): 379–83.
24. Gopal L, Abraham C. Efficacy of photocoagulation in Eales' disease. *Trans Asia-Pacific Acad*. 1985; 10: 689.
25. Nada M, Qanoongo S, Singh SV, Khurana AK. A rare presentation of exudative macroaneurysms in unilateral Eales' disease. *Nepal J Ophthalmol*. 2017; 9 (18): 95–98.
26. Murphy RP, Gieser SC, Fine SL, et al. Retinal and vitreous findings in Eales disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27: 121.
27. Nicolcescu A, Mocanu C, Dinu L, Olaru A, Ionete M, Stefanescu DA. Unilateral Eales' disease a case report. *Rom J Ophthalmol*. 2017; 61 (2): 144–9.
28. Педанова Е. К., Буряков Д. А. Эффективность лазеркоагуляции при болезни Илза в свете современных представлений об этиопатогенезе заболевания. Современные технологии лечения витреоретинальной патологии — 2013. 2013: 136. Доступно по ссылке: <https://eyepress.ru/article.aspx?12646>.
29. Толстухина Е. А., Магарамов Д. А., Володин П. Л., Тимохов В. Л., Фомин А. В. Лазер-индуцированный регресс периферической ретиальной неоваскуляризации при болезни Илза (клинический случай). Современные технологии в офтальмологии. 2019; 1 (26): 381–3.
30. Mainster MA. Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. *Semin Ophthalmol*. 1999; 14 (4): 200–9.
31. Moutray T, Evans JR, Lois N, Armstrong DJ, Peto T, Azuara-Blanco A. Different lasers and techniques for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 3 (3): CD012314.
32. Reddy SV, Husain D. Panretinal Photocoagulation: A Review of Complications. *Semin Ophthalmol*. 2018; 33 (1): 83–88.

References

1. Therese KL, Deepa P, Therese J, Bagyalakshmi R, Biswas J, Madhavan HN. Association of mycobacteria with Eales' disease. *Indian J Med Res*. 2007; 126: 56–62.
2. Yannuzzi LA. The Retinal Atlas. Retinal Vascular Diseases, Eales' Disease. Elsevier. 2010: 433–8.
3. Das T, Pathengay A, Hussain N, Biswas J. Eales' disease: diagnosis and management. *Eye*. 2010; 24 (3): 472–82.
4. Eales H. Retinal haemorrhages associated with epistaxis and constipation. *Brim Med*. 1880; 9: 262.
5. Madhavan HN, Therese KL, Doraiswamy K. Further investigations on the association of Mycobacterium tuberculosis with Eales' disease. *Indian J Ophthalmol*. 2002; 50: 35–39.
6. Patwardhan SD, Azad E, Shah BM, Sharma Y. Role of intravitreal bevacizumab in Eales disease with dense vitreous haemorrhage: a prospective randomized control study. *Retina*. 2011; 31 (5): 866–70.
7. Biswas J, K R R, Pal B, Gondhale HP, Kharel Sitaula R. Long-Term Outcomes of a Large Cohort of Patients with Eales' Disease. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018; 26 (6): 870–6.
8. Sen A, Paine SK, Chowdhury IH, Mukherjee A, Choudhury S, Mandal LK, Bhattacharya B. Assessment of gelatinase and tumor necrosis factor-alpha level in the vitreous and serum of patients with Eales disease; role of inflammation-mediated angiogenesis in the pathogenesis of Eales disease. *Retina*. 2011; 31 (7): 1412–20.
9. Saxena S, Kumar D. Macular involvement in Eales disease. *Ann Ophthalmol*. 2000; 32 (2): 98–100.
10. Gupta V, Al-Dhibi HA, Arevalo JF. Retinal imaging in uveitis. *Saudi J Ophthalmol*. 2014; 28: 95–103.
11. Kumar V, Chandra P, Kumar A. Ultra-wide field angiography in the management of Eales disease. *Indian J Ophthalmol*. 2016; 64: 504–7.
12. Mwandoza KA, Lauer A. Eales Disease. *American Academy of Ophthalmology*. 2015. Available from: http://eyewiki.org/Eales_Disease.
13. Saxena S, Kumar D. New classification system-based visual outcome in Eales' disease. *Indian J Ophthalmol*. 2007; 55 (4): 267–9.
14. Biswas J, Ravi RK, Naryanasamy A, Kulandai LT, Madhavan HN. Eales' disease — current concepts in diagnosis and management. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2013; 3: 11.
15. Das TP, Namperumalsamy P. Photocoagulation in Eales' disease. Results of pro-spective randomised clinical study. Presented in XXVI Int Cong Ophthalmol – Singapore, 1990.
16. Ishaq M, Niazi MK. Usefulness of laser photocoagulation in managing asymptomatic eyes of Eales disease. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2002; 14 (4): 22–25.
17. Ishaq M, Feroze AH, Shahid M, Baig MA, Ameen SS, Feroze SH, Chishti RA. Intravitreal steroids may facilitate treatment of Eales' disease (idiopathic retinal vasculitis): an interventional case series. *Eye (Lond)*. 2007; 21: 1403–5.
18. Kumar A, Sinha S. Rapid regression of disc and retinal neovascularization in a case of Eales disease after intravitreal bevacizumab. *Can J Ophthalmol*. 2007; 42 (2): 335–6.
19. Magargal LE, Walsh AW, Magargal HO, et al. Treatment of Eales' disease with scatter laser photocoagulation. *Ann Ophthalmol*. 1989; 21: 300–2.
20. Talat L, Lightman S, Tomkins-netzer O. Ischemic retinal vasculitis and its management. *J Ophthalmol*. 2014; 2014: 197675.
21. Li J, Liu SM, Dong WT, Li F, Zhou CH, Xu XD, Zhong J. Outcomes of transconjunctival sutureless 27-gauge vitrectomy for vitreoretinal diseases. *Int J Ophthalmol*. 2018; 11 (3): 408–15.
22. El-Asrar AM, Al-Kharashi SA. Full panretinal photocoagulation and early vitrectomy improve prognosis of retinal vasculitis associated with tuberculo-protein hypersensitivity (Eales' disease). *Br J Ophthalmol*. 2002; 86 (11): 1248–51.
23. Dehghan MH, Ahmadi H, Soheilani M, Azarmina M, Mashayekhi A, Naghibozakeri J. Therapeutic effects of laser photocoagulation and/or vitrectomy in Eales' disease. *Eur J Ophthalmol*. 2005; 15 (3): 379–83.
24. Gopal L, Abraham C. Efficacy of photocoagulation in Eales' disease. *Trans Asia-Pacific Acad*. 1985; 10: 689.
25. Nada M, Qanoongo S, Singh SV, Khurana AK. A rare presentation of exudative macroaneurysms in unilateral Eales' disease. *Nepal J Ophthalmol*. 2017; 9 (18): 95–98.
26. Murphy RP, Gieser SC, Fine SL, et al. Retinal and vitreous findings in Eales disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986; 27: 121.
27. Nicolcescu A, Mocanu C, Dinu L, Olaru A, Ionete M, Stefanescu DA. Unilateral Eales' disease a case report. *Rom J Ophthalmol*. 2017; 61 (2): 144–9.
28. Pedanova EK, Burjakov DA. Jefferktivnost' lazerkoaguljacii pri bolezni Ilza v svete sovremennyh predstavlenij ob jetiopatogeneze zabolevanija. *Sovremennye tehnologii lechenija vitreoretinal'noj patologii* — 2013. 2013: 136. Available from: <https://eyepress.ru/article.aspx?12646>. Russian.
29. Tolstuhina EA, Magaramov DA, Volodin PL, Timohov VL, Fomin AV. Lazer-inducirovannyj regress perifericheskoy retinal'noj neovaskuljarizacii pri bolezni Ilza (klinicheskij sluchaj). *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2019; 1 (26): 381–3. Russian.

30. Mainster MA. Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. *Semin Ophthalmol.* 1999; 14 (4): 200–9.
31. Moutray T, Evans JR, Lois N, Armstrong DJ, Peto T, Azuara-Blanco A. Different lasers and techniques for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 3 (3): CD012314.
32. Reddy SV, Husain D. Panretinal Photocoagulation: A Review of Complications. *Semin Ophthalmol.* 2018; 33 (1): 83–88.

ПОЭТАПНЫЙ ПОДХОД В ЛЕЧЕНИИ КОМБИНИРОВАННОЙ ГАМАРТОМЫ СЕТЧАТКИ И РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина ✉

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

Комбинированная гамартома пигментного эпителия и сетчатки — редкое врожденное доброкачественное новообразование. Наиболее часто ее выявляют у молодых людей и подростков. В большинстве случаев заболевание протекает бессимптомно, однако в 24% снижение зрительных функций обусловлено развитием осложнений: эпиретинального фиброза, сопровождающегося тракционным искажением фовеа, гемофтальмом, хориоидальной неоваскуляризацией, экссудативной отслойкой сетчатки, макулярным отеком, тракционной/регрматогенной отслойкой сетчатки. В настоящее время не существует единого мнения в лечении осложнений, вызванных комбинированной гамартомой. Данный клинический случай демонстрирует возможность поэтапного лечения комбинированной гамарты сетчатки и ретинального пигментного эпителия, осложненного эпиретинальным фиброзом и частичным гемофтальмом, с использованием современных методов диагностики (оптическая когерентная томография) и лечения.

Ключевые слова: гамартома, ретинальный пигментный эпителий, сетчатка, лазерная коагуляция, ингибитор неоваскуляризации

Вклад авторов: Х. П. Тахчиди — концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Н. Х. Тахчиди — анализ литературных данных; Е. П. Тебина — сбор и обработка материала, написание текста; Т. А. Касмынина — лазерное лечение пациента.

Соблюдение этических стандартов: от пациента получено добровольное информированное согласие на поэтапное оперативное лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Павловна Тебина
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 123182; ekaterinatebina@mail.ru

Статья получена: 07.09.2020 **Статья принята к печати:** 03.10.2020 **Опубликована онлайн:** 12.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.060

STAGED APPROACH TO TREATMENT OF COMBINED HAMARTOMA OF THE RETINA AND RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

Takhchidi KhP, Takhchidi NK, Kasminina TA, Tebina EP ✉

Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russia

Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium (RPE) is a rare congenital benign lesion. It is most often detected in young adults and adolescents. The disorder is mostly asymptomatic, however, in 24% of patients the loss of visual function results from complications, such as epiretinal fibrosis associated with tractional distortion of the fovea, hemophthalmos, choroidal neovascularization, exudative retinal detachment, macular edema, and combined tractional/rhegmatogenous retinal detachment. Currently, there is no consensus on the combined hamartoma complications management. The reported clinical case demonstrates the feasibility of staged approach to treatment of combined hamartoma of the retina and RPE complicated by epiretinal fibrosis and partial hemophthalmos using the advanced diagnosis (optical coherence tomography) and treatment methods.

Keywords: hamartoma, retinal pigment epithelium, retina, laser photocoagulation, angiogenesis inhibitor

Author contribution: Takhchidi KhP — study concept and design, manuscript editing; Takhchidi NK — literature analysis; Tebina EP — data acquisition and processing, manuscript writing; Kasminina TA — laser treatment.

Compliance with ethical standards: the patient submitted informed consent to staged surgery and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina P. Tebina
Volokolamskoe shosse, 30, str. 2, Moscow, 123182; ekaterinatebina@mail.ru

Received: 07.09.2020 **Accepted:** 03.10.2020 **Published online:** 12.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.060

Комбинированная гамартома сетчатки и ретинального пигментного эпителия является редким доброкачественным образованием. Данная патология является врожденной и наиболее часто выявляется в раннем возрасте. Впервые опухоль была описана Gass в 1973 г. [1].

Гамартома часто возникает на фоне системного туберозного склероза (болезнь Бурневилля), реже ее обнаруживают у пациентов с нейрофиброматозом II типа (в меньшей степени I типа), синдромом Горлина, ювенильной назофаренгиальной ангиофибромой. Однако это новообразование может спорадически появляться в изолированном варианте у здоровых людей [2–4].

На гистологических срезах отмечается тотальная дезорганизация архитектоники ретинальной ткани, сопровождающаяся пролиферацией глии и пигментного эпителия [2]. Основываясь на расположении и клинических проявлениях, Gass классифицировал комбинированную гамарту на четыре группы: папиллярная и

юкстапапиллярная (56–76%), макулярная (17–38%) и периферическая (5–7%) [1, 4].

Заболевание часто выявляют при плановом осмотре глазного дна либо при обращении пациентов с жалобами на снижение остроты зрения, косоглазие, лейкокории. Снижение зрительных функций напрямую зависит от степени вовлеченности макулы и зрительного нерва в патологический процесс. Часто комбинированную гамарту обнаруживают монолатерально, однако описано несколько случаев выявления билатеральных комбинированных гамарт [4].

При офтальмоскопии юкстапапиллярная, папиллярная или макулярная гамартома имеет вид проминирующего образования с нечеткими контурами. Опухоль неравномерно пигментированна, светло- или темно-серого цвета и покрыта полупрозрачной блестящей мембраной. Часто отмечают наличие аномальной извитости ретинальных сосудов, в ряде случаев возникают экссудативная отслойка

сетчатки, микрогеморрагии и отложения экссудатов [4]. Периферические комбинированные гамартомы сопровождаются значительными деформациями ходаретинальных сосудов и утолщением сетчатки, при этом границы опухоли не различимы.

На сегодняшний день оптическая когерентная томография (ОКТ) позволяет выявить морфометрические признаки течения комбинированной гамартомы: наличие эпиретинальной мембраны; небольшие вертикальные витреоретинальные тракции (минимальные пики); большие вертикальные витреоретинальные тракции, сопровождающиеся складчатостью внутренних слоев сетчатки (максимальные пики); искажения внешнего плексиформного слоя (пилообразную конфигурацию или знак «омега») [5–8].

В 24% случаев снижение зрительных функций обусловлено проявлением осложнений заболевания: эпиретинального фиброза, сопровождающегося витреомакулярным тракционным синдромом; гемофтальмом; хориоидальной неоваскуляризацией; экссудативной отслойкой сетчатки; макулярным отеком; тракционной и регматогенной отслойкой сетчатки [2].

В настоящее время не существует единого мнения в лечении осложнений, вызванных комбинированной гамартемой. Тем не менее рядом авторов описаны случаи проведения витрэктомии *pars plana* с целью уменьшения витреоретинальной тракции (удаление эпиретинального фиброза) и увеличения показателей остроты зрения до 60% [9, 10]. Для уменьшения экстравазального выпота возможно также применение интравитреальных инъекций ингибитора неоангиогенеза или проведение лазерной коагуляции сетчатки [11, 12]. Цель работы: показать эффективность поэтапного лечения комбинированной гамартомы пигментного эпителия и сетчатки.

Описание клинического случая

Пациентка С. 38 лет поступила в сентябре 2019 г. в НИЦ офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова с жалобами на снижение остроты зрения левого глаза в течение последних шести месяцев. Из анамнеза: в январе 2019 г.

пациентка обратилась к офтальмологу по месту жительства с вышеописанными жалобами. Был поставлен диагноз OS «тромбоз верхне-височной ветви центральной вены сетчатки и проведен курс консервативной терапии; положительная динамика отсутствовала. Системные заболевания были исключены.

При поступлении пациентке провели комплексное офтальмологическое обследование, включающее стандартные методы: визометрию с определением максимально скорректированной остроты зрения (МКОЗ), непрямую офтальмоскопию с помощью бесконтактной линзы MaxField (OcularInc.; США) и специальные методы исследования: ОКТ на приборе «Spectralis HRA+OCT», Module OCT2 85 000 Гц (Heidelberg Engineering Inc.; Германия).

В ходе первичного обследования левого глаза МКОЗ составила 0,6 н/к. Биомикроскопия: передний отрезок без патологических изменений, частичный гемофтальм. Офтальмоскопия глазного дна: диск зрительного нерва (ДЗН) бледно-розовый, границы четкие. В макулярной зоне «целлофановый» блеск. Ретинальные сосуды: верхне-височная сосудистая аркада — артерии сужены, вены резко расширены, извиты, калибр — $a : v = 1 : 3$; нижне-височная сосудистая аркада — ход ретинальных сосудов равномерный; калибр сосудов не изменен — $a : v = 2 : 3$. В зоне верхне-височной ветви ЦВС определяется проминирующий серый очаг с множественными витреоретинальными тракциями, границы очага не дифференцируются. На периферии сетчатки изменений не обнаружено. На томограммах спектральной ОКТ в зоне проминирующего очага визуализируется деформация внутренних слоев сетчатки (максимальные пики) (рис. 1А, Б). В макулярной зоне на поверхности сетчатки определяется эпиретинальный фиброз (рис. 2).

На основании совокупности результатов клинико-инструментальных исследований пациентке на левом глазу диагностирована комбинированная гамартома пигментного эпителия и сетчатки, осложненная эпиретинальным фиброзом и частичным гемофтальмом. Пациентке было рекомендовано поэтапное лечение:

этап 1 — лазерная коагуляция, с целью снижения экстравазального выпота;

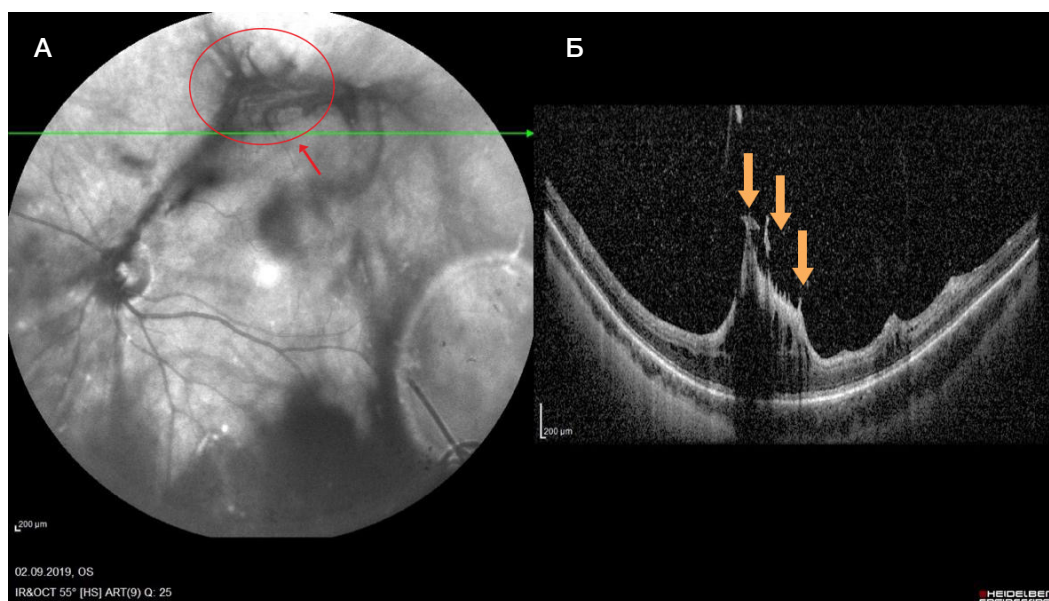


Рис. 1. А. IR-изображение глазного дна: в зоне верхне-височной ветви центральной ветви сетчатки визуализируется проминирующий серый очаг с множественными витреоретинальными тракциями. Частичный гемофтальм. **Б.** ОКТ сетчатки: в зоне проминирующего очага определяется дезорганизация всех слоев сетчатки, деформация внутренних слоев сетчатки (максимальные пики; желтая стрелка)

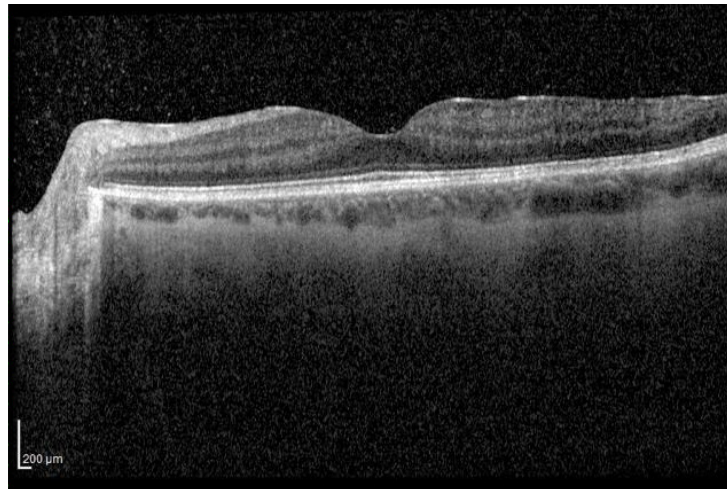


Рис. 2. ОКТ сетчатки: в центральной зоне на поверхности сетчатки определяется полоса гиперрефлективности, плотно спаянная с внутренней пограничной мембраной, макулярный профиль сохранен

этап 2 — интравитреальное введение ингибитора неоангиогенеза с целью снижения сосудистой проницаемости в зонах, недоступных лазерной коагуляции, а также снижения риска интра- и послеоперационных интравитреальных кровоизлияний;

этап 3 — микроинвазивная субтотальная витрэктомия + швартэктомия + эндолазеркоагуляция с целью восстановления оптических сред, устранения тракционного компонента.

Для лазерной коагуляции (1-й этап лечения) использовали трехволновую офтальмологическую лазерную установку модели VISULAS Trion (532, 561, 659 нм) (Carl Zeiss; Germany). Энергетические параметры: мощность 80 мВт, экспозиция 0,1 с, длина волны 532 нм. Лазерные аппликаты наносили паравазально, с ограничением проминирующего очага. При осмотре через месяц после лазерной коагуляции сетчатки МКОЗ составила 0,6 н/к. Биомикроскопия: передний отрезок без патологических изменений, частичный гемофтальм. Офтальмоскопия: ДЗН бледно-розовый, границы четкие. В макулярной зоне «целлофановый» блеск. Ретинальные сосуды: верхне-височная сосудистая аркада — артерии сужены, вены резко расширены, извиты, калибр — $a : v = 1 : 3$; нижне-височная сосудистая

аркада — ход ретинальных сосудов равномерный; калибр сосудов не изменен — $a : v = 2 : 3$. В зоне верхне-височной ветви ЦВС определяется проминирующий серый очаг с множественными витреоретинальными тракциями, границы очага не дифференцируются. Паравазально визуализируются пигментированные лазерные коагуляты, очаг ограничен пигментированными лазерными коагулятами. ОКТ-томограмма без отрицательной динамики.

Через месяц после проведения лазерной коагуляции вторым этапом пациенту было выполнено интравитреальное введение ингибитора неоангиогенеза (афлиберцепт; 0,1 мг/0,04 мл) в левый глаз. При осмотре через две недели: МКОЗ — 0,7 н/к. Биомикроскопия: передний отрезок без патологических изменений, гемофтальм частично регрессировал. Офтальмоскопия: без отрицательной динамики. ОКТ-томограмма без изменений.

Через три недели после проведения интравитреального введения ингибитора неоангиогенеза третьим этапом пациенту была выполнена микроинвазивная субтотальная витрэктомия + швартэктомия + эндолазеркоагуляция. Через неделю после хирургического лечения: МКОЗ — 1,0 н/к. Биомикроскопия: передний отрезок без

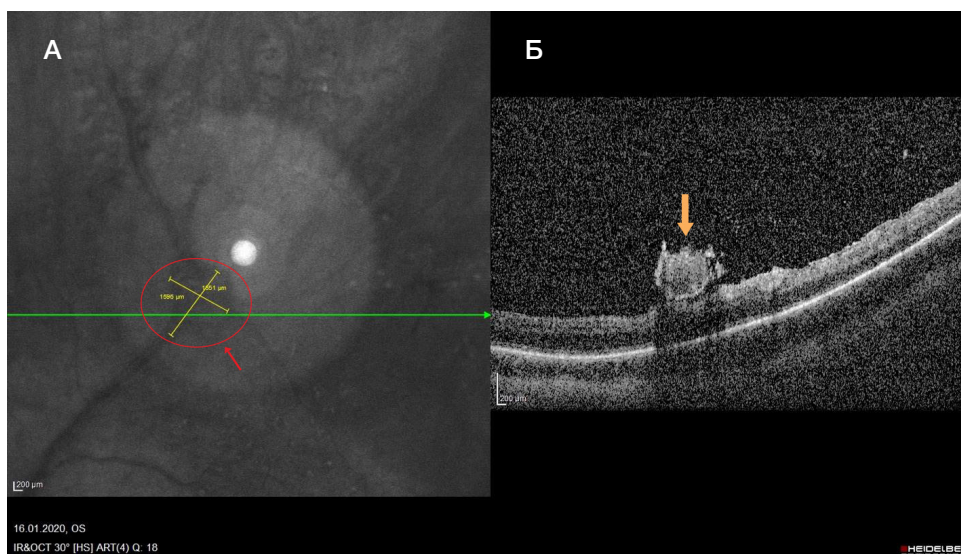


Рис. 3. А. IR-изображение глазного дна через неделю после проведения субтотальной витрэктомии: калибр сосудов по ходу верхне-височной ветки восстановлен, витреоретинальные тракции удалены, проминирующий очаг уменьшен в размерах ($d = 0,5$ ДЗН; красная стрелка) Б. ОКТ сетчатки: на поверхности сетчатки визуализируется единичный проминирующий очаг (желтая стрелка) без витреоретинальных тракций, архитектура ретинальных слоев восстановлена

патологических изменений; авитрия. Офтальмоскопия: ДЗН бледно-розовый, границы четкие. В макулярной зоне сохраняется «целлофановый» блеск. Ретинальные сосуды: верхне-височная сосудистая аркада — восстановлен равномерный ход сосудов, калибр — $a : v = 2 : 3$, паравазально визуализируются пигментированные лазерные коагуляты, нижне-височная сосудистая аркада — ход ретинальных сосудов равномерный; калибр сосудов не изменен — $a : v = 2 : 3$. По ходу верхне-височной ветви ЦВС витреоретинальные тракции удалены, проминирующий очаг уменьшен в размерах ($d = 0,5$ ДЗН) и окружен пигментированными лазерными коагулятами (рис. 3А). ОКТ-томограмма представлена на рис. 3Б.

На контрольном осмотре через три месяца отрицательной динамики не выявлено.

Обсуждение клинического случая

На сегодняшний день общепринятой тактики ведения пациентов с комбинированной гамармой сетчатки и ретинального пигментного эпителия не существует. Анализ литературных данных показал, что заболевание может длительное время протекать бессимптомно, а снижение зрительных функций происходит в результате развития осложнений.

В литературе описано несколько вариантов лечения заболевания и его осложнений: лучевая терапия при комбинированной гамарме сетчатки и ретинального пигментного эпителия не доказала своей эффективности, поскольку опухоль является доброкачественным новообразованием и нерадиочувствительна [13]; в случае развития хориоидальной неоваскуляризации для лечения активно используют фотодинамическую терапию, фокальную лазерную коагуляцию сетчатки и интравитреальное введение ингибитора неоваскуляризации [11, 14]. Ингибитор неоваскуляризации используют также для уменьшения проницаемости сосудов, что снижает риск интравитреальных кровоизлияний [14]. При наличии эпиретинального фиброза в качестве «золотого стандарта» лечения используют субтотальную витрэктомия с удалением внутренней пограничной мембраны (ВПМ) и эпиретинальной мембраны. Однако данный метод имеет ряд недостатков: во-первых, в результате пиллинга ВПМ происходит механическое повреждение клеток

Мюллера, приводящее к патологическим изменениям биомеханической прочности сетчатки и неполному восстановлению зрительных функций в послеоперационном периоде [15–17]; во-вторых, пиллинг ВПМ — технически сложная манипуляция, которая может приводить к осложнениям: травматическому повреждению сетчатки эндовитреальными инструментами, интравитреальному кровоизлиянию в зонах захвата ВПМ, увеличению риска кровотечения в интра- и послеоперационном периодах; в-третьих, улучшение зрительных функций в послеоперационном периоде коррелирует со степенью деформации ретинальных слоев [18].

В данном исследовании с целью улучшения клинко-функциональных результатов лечения пациента с комбинированной гамармой сетчатки и ретинального пигментного эпителия, в отличие от мирового опыта, был использован поэтапный подход, включающий в себя на первом этапе проведение паравазальной лазерной коагуляции сетчатки с целью уменьшения экстравазального выпота; на втором этапе — интравитреальное введение ингибитора неоваскуляризации с целью снижения проницаемости сосудов и уменьшения риска интра- и послеоперационных кровоизлияний; на третьем этапе — проведение субтотальной витрэктомии с целью восстановления прозрачности оптических сред и уменьшения тракционного компонента в зоне новообразования.

Предложенный нами поэтапный подход в лечении комбинированной гамармы сетчатки и ретинального пигментного эпителия, осложненного частичным гемофтальмом и эпиретинальным фиброзом, позволил получить высокие клинко-функциональные результаты: увеличение показателя МКОЗ, восстановление прозрачности оптических сред, устранение тракционного компонента и риска дальнейших интравитреальных кровоизлияний.

ВЫВОДЫ

Индивидуальный поэтапный подход в лечении комбинированной гамармы сетчатки и ретинального пигментного эпителия с использованием современных методов диагностики и лечения позволил получить высокие зрительно-функциональные результаты в отдаленных сроках динамического наблюдения.

Литература

1. Gass JDM. An unusual hamartoma of the pigment epithelium and retina simulating choroidal melanoma and retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1973; 71: 171–83.
2. Gupta R, Fung AT, Lupidi M, et al. Peripapillary Versus Macular Combined Hamartoma of the Retina and Retinal Pigment Epithelium: Imaging Characteristics. *Am J Ophthalmol.* 2019; 200: 263–9.
3. Fonseca RA, Dantas MA, Kaga T, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium associated with juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Am J Ophthalmol.* 2001; 132 (1): 131–32.
4. Коэн С. И., Квинтель Г. Флюоресцентная ангиография в диагностике патологии глазного дна. М.: Рейтар, 2005; 311 с.
5. Shields CL, Mashayekhi A, Dai VV, et al. Optical Coherence Tomographic Findings of Combined Hamartoma of the Retina and Retinal Pigment Epithelium in 11 Patients. *Arch Ophthalmol.* 2005; 123 (12): 1746–50.
6. Arepalli S, Pellegrini M, Ferenczy SR, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium: findings on enhanced depth imaging optical coherence tomography in eight eyes. *Retina.* 2014; 34 (11): 2202–7.
7. Schachat AP, Shields JA, Fine SL, et al. Combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmology.* 1984; 91 (12): 1609–15.
8. Kumar V, Chawla R, Tripathy K. Omega Sign: A Distinct Optical Coherence Tomography Finding in Macular Combined Hamartoma of Retina and Retinal Pigment Epithelium. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2017; 48 (2): 122–5.
9. Cohn AD, Quiram PA, Drenser KA, et al. Surgical outcomes of epiretinal membranes associated with combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *Retina.* 2009; 29: 825–30.
10. Zhang X, Dong F, Dai R, et al. Surgical management of epiretinal membrane in combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Retina.* 2010; 30: 305–09.
11. Nam DH, Shin KH, Lee DY, et al. Vitrectomy, laser photocoagulation, and intravitreal triamcinolone for combined hamartoma of the

- retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010; 9: 1–4.
12. Xue K, Mellington F, Gout I, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *BMJ. Case Reports*. 2012.
 13. Dave T, Dave V, Pappuru R. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium with hypo-autofluorescence and cystic degeneration at the macula. *Clin Exp Optom*. 2014; 97: 475–6.
 14. Cormos D, Ocusan C. Complication of combined retinal and retinal pigment epithelium hamartoma involving optic disc in a child, treated with Avastin — a review of the literature and case presentation. *Romanian Journal of Ophtalmology*. 2015; 59 (4): 255–62.
 15. Tari SR, Vidne-Hay O, Greenstein VC, et al. Functional and structural measurements for the assessment of internal limiting membrane peeling in idiopathic macular pucker. *Retina*. 2007; 27 (5): 567–72.
 16. Kumagai K, Ogino N, Furukawa M. Retinal thickness after vitrectomy and internal limiting membrane peeling for macular hole and epiretinal membrane. *Clin Ophthalmol*. 2012; 6: 679–88.
 17. Wolf S, Schnurbusch U, Wiedemann P. Peeling of the basal membrane in the human retina: ultrastructural effects. *Ophthalmology*. 2004; 111: 238–43.
 18. Каримов А. И., Лыскин П. В., Згоба М. И., Макаренко И. Р. Хирургическое лечение макулярных отверстий без пилинга внутренней пограничной мембраны. *Современные технологии в офтальмологии*. 2018; 4: 137–9.

References

1. Gass JDM. An unusual hamartoma of the pigment epithelium and retina simulating choroidal melanoma and retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1973; 71: 171–83.
2. Gupta R, Fung AT, Lupidi M, et al. Peripapillary Versus Macular Combined Hamartoma of the Retina and Retinal Pigment Epithelium: Imaging Characteristics. *Am J Ophthalmol*. 2019; 200: 263–9.
3. Fonseca RA, Dantas MA, Kaga T, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium associated with juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Am J Ophthalmol*. 2001; 132 (1): 131–32.
4. Kojen SI, Kvintel G. Flyuorescentnaja angiografija v diagnostike patologii glaznogo dna. M.: Rejtar, 2005; 311 s. Russian.
5. Shields CL, Mashayekhi A, Dai VV, et al. Optical Coherence Tomographic Findings of Combined Hamartoma of the Retina and Retinal Pigment Epithelium in 11 Patients. *Arch Ophthalmol*. 2005; 123 (12): 1746–50.
6. Arepalli S, Pellegrini M, Ferenczy SR, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium: findings on enhanced depth imaging optical coherence tomography in eight eyes. *Retina*. 2014; 34 (11): 2202–7.
7. Schachat AP, Shields JA, Fine SL, et al. Combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmology*. 1984; 91 (12): 1609–15.
8. Kumar V, Chawla R, Tripathy K. Omega Sign: A Distinct Optical Coherence Tomography Finding in Macular Combined Hamartoma of Retina and Retinal Pigment Epithelium. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2017; 48 (2): 122–5.
9. Cohn AD, Quiram PA, Drenser KA, et al. Surgical outcomes of epiretinal membranes associated with combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *Retina*. 2009; 29: 825–30.
10. Zhang X, Dong F, Dai R, et al. Surgical management of epiretinal membrane in combined hamartomas of the retina and retinal pigment epithelium. *Retina*. 2010; 30: 305–09.
11. Nam DH, Shin KH, Lee DY, et al. Vitrectomy, laser photocoagulation, and intravitreal triamcinolone for combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010; 9: 1–4.
12. Xue K, Mellington F, Gout I, et al. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium. *BMJ. Case Reports*. 2012.
13. Dave T, Dave V, Pappuru R. Combined hamartoma of the retina and retinal pigment epithelium with hypo-autofluorescence and cystic degeneration at the macula. *Clin Exp Optom*. 2014; 97: 475–6.
14. Cormos D, Ocusan C. Complication of combined retinal and retinal pigment epithelium hamartoma involving optic disc in a child, treated with Avastin — a review of the literature and case presentation. *Romanian Journal of Ophtalmology*. 2015; 59 (4): 255–62.
15. Tari SR, Vidne-Hay O, Greenstein VC, et al. Functional and structural measurements for the assessment of internal limiting membrane peeling in idiopathic macular pucker. *Retina*. 2007; 27 (5): 567–72.
16. Kumagai K, Ogino N, Furukawa M. Retinal thickness after vitrectomy and internal limiting membrane peeling for macular hole and epiretinal membrane. *Clin Ophthalmol*. 2012; 6: 679–88.
17. Wolf S, Schnurbusch U, Wiedemann P. Peeling of the basal membrane in the human retina: ultrastructural effects. *Ophthalmology*. 2004; 111: 238–43.
18. Karimov AI, Lyskin PV, Zgoba MI, Makarenko IR. Hirurgicheskoe lechenie makuljarnyh otverstij bez pilinga vnutrennej pogranichnoj membrany. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2018; 4: 137–9. Russian.

СЛОЖНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОЖНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Р. Т. Таирова^{1,2}, Т. А. Гайдина^{1,2}✉, А. С. Дворников², А. Д. Тазартукова¹, О. В. Лянг¹

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

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

При лечении мультиморбидных пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), необходимо проявлять внимание к возможному развитию лекарственной экзантемы (ЛЭ) в любой период времени лечения. Представлено клиническое наблюдение больной 92 лет с тяжелым течением подтвержденного ПЦР COVID-19. На фоне лечения амоксициллином/клавулановой кислотой, моксифлоксацином, ацетилцистеином, омега-3, эноксапарином натрия на 9-й день лечения появились умеренно зудящие макулезные высыпания с тенденцией к слиянию без отрицательной динамики соматического статуса. На 15-й день лечения на фоне приема дексаметазона и хлоропирамина кожные высыпания регрессировали. Появление сыпи может быть обусловлено применением β-лактамов антибактериальных препаратов и фторхинолонов, присоединением бактериальной инфекции и иммуносупрессивным статусом пациентки старческого возраста, а также высокой вирусной нагрузкой, ассоциированной с появлением дерматологических симптомов. Отсроченное появление кожных изменений на фоне COVID-19 возможно рассматривать как «маркер» тяжести заболевания.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, кожные проявления, токсидермия, лекарственная экзантема

Вклад авторов: Р. Т. Таирова, Т. А. Гайдина — интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; А. С. Дворников — анализ литературы; А. Д. Тазартукова — интерпретация данных; О. В. Лянг — подготовка черновика рукописи.

Соблюдение этических стандартов: пациентка подписала добровольное информированное согласие на лечение и публикацию данных.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Анатольевна Гайдина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; doc429@yandex.ru

Статья получена: 23.09.2020 **Статья принята к печати:** 08.10.2020 **Опубликована онлайн:** 21.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.062

DIFFICULTIES IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CUTANEOUS MANIFESTATIONS IN PATIENTS WITH CORONAVIRUS INFECTION

Tairova RT^{1,2}, Gaydina TA^{1,2}✉, Dvornikov AS², Tazartukova AD¹, Lyang OV¹

¹ Federal Center for Brain Research and Neurotechnology of FMBA, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Patients with severe SARS-CoV-2 infection (COVID-19) and multiple comorbidities should be monitored for possible adverse reactions to prescribed drugs, including drug eruptions (DE) at any stage of treatment. Below, we describe a clinical case of a 92-year-old female patient with severe PCR-confirmed COVID-19. The patient was treated with amoxicillin/clavulanic acid, moxifloxacin, acetylcysteine, and sodium enoxaparin. On day 9 into treatment, the patient developed moderately itching macular rashes showing a tendency to coalesce, but overall showed no signs of deterioration. On day 15, the rashes regressed, following a short course of dexamethasone and chloropyramine. This kind of skin reaction might have been provoked by β-lactams and fluoroquinolones included in the treatment regimen, a secondary bacterial infection, compromised immunity due to advanced age, and high viral load associated with dermatological symptoms. Delayed onset of skin symptoms might be regarded as a marker of COVID-19 severity.

Keywords: coronavirus infection, skin manifestations, toxidermia, drug eruptions

Author contribution: Tairova RT, Gaydina TA: interpretation of the obtained data, manuscript draft; Dvornikov AS: literature analysis; Tazartukova AD: interpretation of the obtained data; Lyang OV: manuscript draft.

Compliance with ethical standards: the patient gave informed consent to medical treatment and publication of this case report.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Gaydina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; doc429@yandex.ru

Received: 23.09.2020 **Accepted:** 08.10.2020 **Published online:** 21.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.062

Этиологическая диагностика экзантем на фоне коронавирусной инфекции (КВИ), вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), является сложной задачей [1–3]. Данная проблема особенно актуальна в эпидемиологический период, когда необходимо соблюдать требования по дистанцированию и использованию средств индивидуальной защиты, в том числе при осмотре кожного покрова и слизистой оболочки полости рта у пациентов с COVID-19 [2, 4].

При тяжелом течении КВИ требуется назначение системной терапии несколькими препаратами без отмены жизненно необходимых, которые больные уже принимают по поводу сопутствующей патологии [5]. Эффективная стратегия фармакотерапии больных КВИ должна учитывать не только сопутствующую патологию,

но и возможные нежелательные реакции, в том числе со стороны кожного покрова. Из таких реакций наиболее распространены лекарственные экзантемы (ЛЭ), которые трудно диагностировать на ранней стадии развития; еще труднее установить причинно-следственную связь ЛЭ с приемом конкретного лекарственного препарата в случае назначения нескольких средств одновременно [6–8].

С момента начала пандемии КВИ в литературе были описаны разные кожные проявления у больных, однако специфические кожные симптомы, помогающие верифицировать диагноз КВИ, выделить пока трудно [1, 9–11]. Кожные проявления при КВИ требуют дальнейшего наблюдения, систематизации и изучения возможной связи с тяжестью процесса.

Описание клинического случая

Больная Ч., 92 года, заболела остро с появлением кашля, слабости, повышения температуры тела до 37,8 °С. Через два дня состояние резко ухудшилось, появилась одышка, озноб. Бригадой врачей скоро медицинской помощи доставлена в стационар. Со слов пациентки, контактов с пациентами с симптомами ОРВИ, похожими на COVID-19, за последние 14 дней не было. Проживает в семье с племянницей, племянница здорова. В анамнезе гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, постоянная форма фибрилляции предсердий, желчекаменная болезнь. Аллергический анамнез не отягощен. Лекарственную непереносимость отрицает.

При поступлении состояние было тяжелое. Кожный покров и видимые слизистые имели физиологическую окраску и влажность. Склеры обычной окраски. Периферические лимфоузлы не увеличены. Отеки отсутствовали. Грудная клетка цилиндрической формы, симметрична. Показатель SpO₂ составлял 70%, на фоне инсuffляции увлажненного кислорода со скоростью 10 л/мин его значение достигало 95%. Аускультацию легких и сердца не проводили в связи с эпидемической обстановкой. АД — 160/80 мм рт. ст. ЧСС — 80 уд./мин. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень не увеличена. Симптомы раздражения брюшины отсутствовали. Стул регулярный. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Дизурии нет. Неврологический статус без особенностей.

Компьютерная томография (КТ): картина внебольничной полисегментарной вирусной пневмонии (КТ-3) на фоне начальных проявлений гемодинамических нарушений (интерстициальный отек легких). Результаты анализа крови: лейкоциты $9,7 \times 10^9/\text{л}$, абсолютная и относительная лимфопения ($0,7 \times 10^9/\text{л}$; 7,2%), относительная моноцитопения (1,3%), абсолютный и относительный гранулоцитоз ($8,9 \times 10^9/\text{л}$; 91,5%). Результаты биохимического анализа крови: повышение С-реактивного

белка до 67 мг/л, АСТ — до 56 Ед/л, АЛТ — до 41 Ед/л, D-димера — до 1817 нг/мл.

Исследование методом ПЦР соскоба из носо- и ротоглотки выявило РНК коронавируса SARS-CoV-2. Исследование проб пациентки Ч. проводили с помощью набора реагентов, предназначенных для выявления РНК вирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV (качественный формат) в биологическом материале человека методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени («ДНК-Технология ТС»; Россия).

Биологические образцы для тестирования методом ПЦР отбирали из носоглотки и ротоглотки.

Вирусную РНК экстрагировали из 400 мкл клинических образцов, применяя ручную методику, с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в комплектации ПРОБА-НК («ДНК-Технология»; Россия) и элюировали в 50 мкл РНК буфера.

В наборе RT-PCR SARS-CoV-2/SARS-CoV («ДНК-Технология ТС»; Россия) в качестве мишеней выбраны три участка генома: специфичные для коронавируса SARS-CoV-2 участки (канал детекции Cy5/Red) и гена E (канал детекции Rox/Orange), а также консервативный участок гена E (канал детекции Fam/Green), общий для группы коронавирусов подобных SARS-CoV (включая SARS-CoV и SARS-CoV-2).

Анализ включает гетерологичную систему амплификации (внутренний контрольный образец (РНК-ВК) — канал детекции Hex/Yellow) для выявления возможного ингибирования ОТ-ПЦР и подтверждения целостности набора реагентов. В состав набора входит положительный контрольный образец. Детекцию проводили на амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология»; Россия).

Исследовали четыре биологических образца. Взятие проб производили 28.05.20; 03.06.20; 09.06.20; 16.06.20.

В образце от 28.05.20 (первые сутки) выявлен ранний экспоненциальный рост флуоресценции по каналам детекции Fam/Green (консервативный участок гена E; рис. 1)



Рис. 1. Ранний экспоненциальный рост флуоресценции по каналам детекции Fam/Green (консервативный участок гена E) от 28.05.20 (первые сутки)



Рис. 2. Ранний экспоненциальный рост флуоресценции по каналу детекции Rox/Orange от 28.05.20 (первые сутки)

$C_t = 24,6$, что указывает на обнаружение РНК коронавирусов подобных SARS-CoV.

По каналу детекции Rox/Orange (ген E SARS-CoV-2; рис. 2) $C_t = 24,5$.

По каналу Cy5/Red (ген N SARS-CoV-2; рис. 3) $C_t = 23,9$ — РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Отсутствие детекции по каналу Hex/Yellow (рис. 4) (при наличии в постановке валидного отрицательного и положительных контролей) косвенно свидетельствует о высоком содержании РНК вируса SARS-CoV-2 в данной пробе. В образце от 03.06.20 (седьмые сутки) выявлен рост флуоресценции по каналам детекции Fam/Green



Рис. 3. Ранний экспоненциальный рост флуоресценции по каналу Cy5/Red от 28.05.20 (первые сутки)

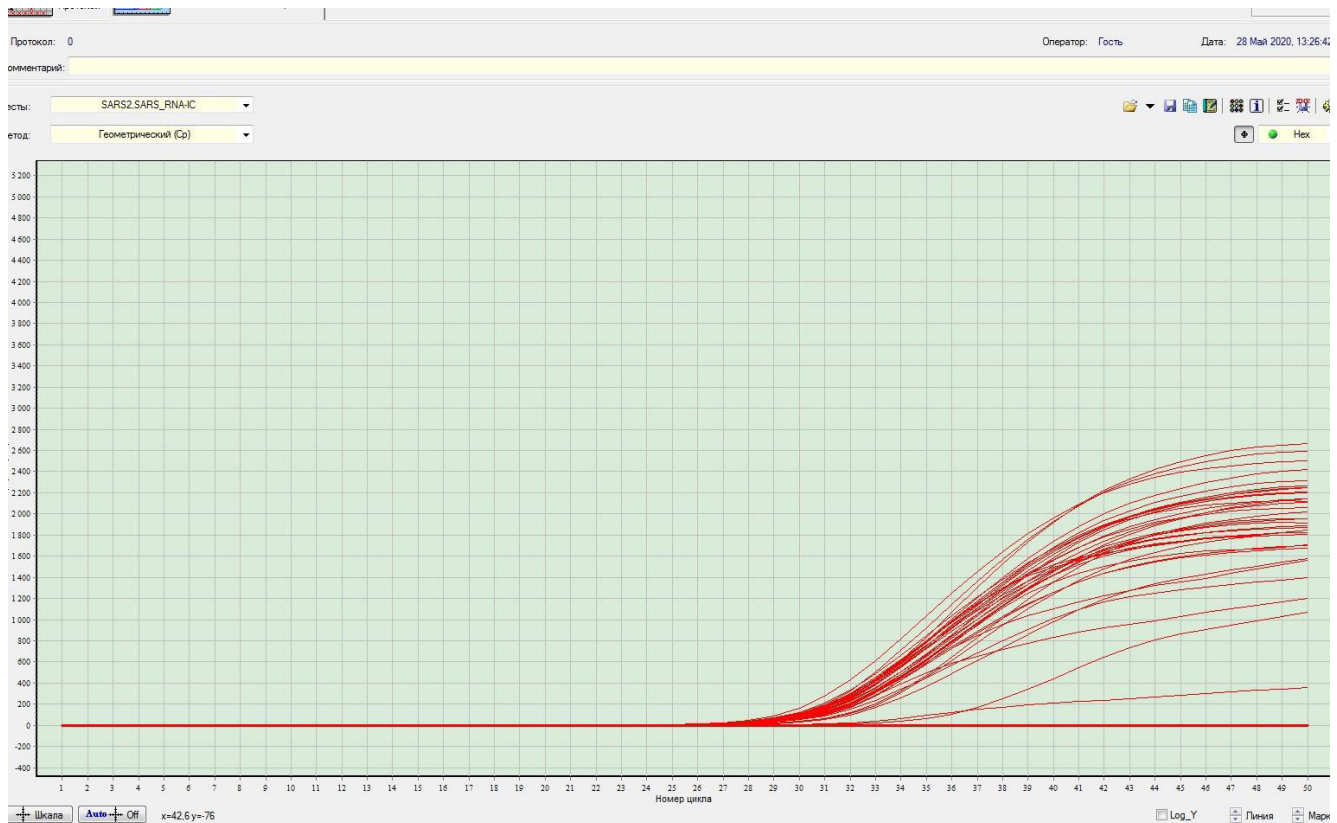


Рис. 4. Отсутствие детекции по каналу Hex/Yellow (при наличии в постановке валидного отрицательного и положительных контролей)

(коронавирусов подобных SARS-CoV) Ct = 37,4; Hex/Yellow (BK) Ct = 31,0; Rox/Orange (ген E SARS-CoV-2) Ct = 37,5, Cy5/Red (ген N SARS-CoV-2) Ct = 38,1 — PHK коронавируса SARS-CoV-2.

В образце от 09.06.20 (13-е сутки) выявлен рост флуоресценции по каналам детекции Fam/Green (коронавирусов подобных SARS-CoV) Ct = 31,9; Hex/Yellow (BK) Ct = 30,0; Rox/Orange (ген E SARS-CoV-2) Ct = 32,1; Cy5/Red (ген N SARS-CoV-2) Ct = 31,8 — PHK коронавируса SARS-CoV-2.

В образце от 20.06.20 (20-е сутки) выявлен рост флуоресценции по каналам детекции Fam/Green (коронавирусов подобных SARS-CoV) Ct = 34,6; Hex/Yellow (BK) Ct = 31,0; Rox/Orange (ген E SARS-CoV-2) Ct = 34,5; Cy5/Red (ген N SARS-CoV-2) Ct = 34,7 — PHK коронавируса SARS-CoV-2.

Ген E и ген N SARS-CoV-2 были обнаружены в каждом из четырех образцов.

С учетом данных анамнеза, клинической картины, лабораторных и инструментальных методов обследования поставлен диагноз: *КВИ, вызванная COVID-19, подтвержденная, тяжелое течение. Внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония*. По тяжести состояния пациентка госпитализирована в отделение реанимации и интенсивной терапии, где получала раствор натрия хлорида 0,9%, амоксициллин + клавулановую кислоту, моксифлоксацин, парацетамол, аскорбиновую кислоту, ацетилцистеин, омепразол, бисопролол, эноксапарин натрия. Через два дня состояние стабилизировалось, пациентка была переведена в терапевтическое отделение. На девятый день лечения на теле пациентки появились умеренно зудящие макулезные высыпания с тенденцией к слиянию (рис. 5–7). Соматический статус без отрицательной динамики. После окончания курса

антибактериальной терапии был назначен дексаметазон 16 мг/сут. внутримышечно и хлоропирамин 20 мг — 2 раза/сут. внутримышечно. На 15-й день лечения на фоне проводимой терапии кожные высыпания регрессировали. При КТ грудной клетки была выявлена положительная динамика. На 20-й день лечения пациентку выписали домой в удовлетворительном состоянии.

Обсуждение клинического случая

На сегодняшний день в литературе представлены разные клинические наблюдения, методические рекомендации, посвященные ведению пациентов с КВИ [12, 13].

Особый интерес вызывают описания кожных проявлений инфекции, имеющих разные морфологический характер и временной период. Возможные причины кожных изменений в настоящее время изучают, а их точная диагностика необходима для выработки верной тактики ведения пациента [4].

Так, сообщалось о наличии кожных проявлений у 18 из 88 (20,4%) госпитализированных пациентов с тяжелым течением КВИ в виде «эритематозной сыпи», «широко распространенной крапивницы» и «везикул, похожих на ветряную оспу», причем у восьми пациентов сыпь появилась в начале заболевания, у 10 — после госпитализации [14].

Описаны петехиальные и пурпурные высыпания, преходящие ретикулярные ливедо и акроишемические изменения [15]. Остается открытым вопрос, связаны ли эти проявления напрямую с COVID-19, поскольку и вирусные инфекции, и нежелательные лекарственные реакции являются частыми причинами экзантем.

Мы наблюдали пациентку старческого возраста с тяжелым течением КВИ и наличием сопутствующей

патологии. На девятый день лечения на теле пациентки появились умеренно зудящие макулезные высыпания с тенденцией к слиянию. Установить взаимосвязь кожных проявлений, представляющих собой инфекционно-аллергическое поражение кожи, с COVID-19 представляется сложным. Литературные данные свидетельствуют о появлении многообразных кожных реакций в период со второго дня до второй недели заболевания.

Важным критерием для различия между вирусными инфекциями и нежелательными лекарственными реакциями является наличие энантемы. Как показывает практика, из-за проблемы безопасности многих пациентов с симптомами КВИ не обследовали согласно общепринятому физикальному осмотру, включающему обследование полости рта. Так, при наблюдении 21 пациента с подтвержденным с помощью ПЦР COVID-19 и кожной сыпью, шесть (29%) имели энантему [15], четыре из шести (66%) были женщины, ни у одного пациента не было эритематовезикулярной энантемы. Средний период от момента появления симптомов COVID-19 и кожно-слизистых очагов поражения составил 12,3 дня (от двух до 24 дней). По мнению авторов этого наблюдения, определение морфологии сыпи, сопутствующих симптомов и наличия энантемы может быть полезным при проведении дифференциального диагноза между вирусным и лекарственным поражением кожи. Наличие пустул и пятен позволяет предположить лекарственную этиологию, в то время как петехии или везикулы с локализацией на ягодицах или акральных участках конечностей в комбинации с энантемой свидетельствуют в пользу инфекционной этиологии, особенно вирусной [15]. Некоторые гистологические особенности (паракератоз, спонгиоз, экстравазация эритроцитов) могут предположительно указывать на вирусный генез заболевания [16].

Особенностью нашего наблюдения является необходимость применения множественных ЛП у пациентки старческого возраста, что увеличивает риск развития лекарственных взаимодействий. Еще одно весомое подтверждение ЛЭ — появление сыпи после назначения лекарственной терапии, в состав которой входили β-лактамы антибактериальные препараты и фторхинолоны.

Нельзя исключить и вероятность развития кожных проявлений на фоне присоединения бактериальной инфекции и иммуносупрессивного статуса пациентки. В пользу последней версии свидетельствует сохранение антигена до 20-х суток, что свидетельствует о снижении иммунного ответа. В силу инволютивных изменений в стареющем организме снижается активность иммунокомпетентных клеток.

С дерматологическими симптомами может ассоциироваться высокая вирусная нагрузка, что позволяет рассматривать отсроченное (на девятые сутки болезни) появление кожных симптомов в качестве «маркера» осложненного течения заболевания, которые регрессировали по мере улучшения состояния пациента.

ВЫВОДЫ

Клиническое наблюдение свидетельствует о сложности дифференциальной диагностики кожных проявлений на фоне новой КВИ. Особенно сложно определить их истинный характер у лиц старческого возраста с множественной патологией, требующей назначения многих ЛП, способных привести к ЛЭ. Следует



Рис. 5. Макулезные высыпания на коже живота с тенденцией к слиянию на девятый день лечения



Рис. 6. Макулезные высыпания на коже спины с тенденцией к слиянию на девятый день лечения



Рис. 7. Макулезные высыпания на коже бедер с тенденцией к слиянию на девятый день лечения

помнить и об особенностях инволютивных процессов, сопровождающихся снижением иммунитета. Отсроченное

появление кожных изменений возможно рассматривать как «маркер» тяжести заболевания.

Литература

- Casas C, Catala A, Hernandez G, Rodríguez-Jimenez P, Nieto D, Rodríguez-Villa A, et al. Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *British Journal of Dermatology*. 2020; 183 (1): 71–77. DOI: 10.1111/bjd.19163.
- Almutairi N, Schwartz RA. COVID-2019 with dermatologic manifestations and implications: an unfolding conundrum. *Dermatol Therapy*. 2020; e13544. Available from: <https://doi.org/10.1111/dth.13544>.
- Recalcati S, Barbagallo T, Frasin LA, Prestinari F, Cogliardi A, Provero MC, et al. Acral cutaneous lesions in the time of COVID-19. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (8): e346–e347. DOI: 10.1111/jdv.16533.
- Criado PR, Abdalla BMZ, Assis IC, Blarcum de Graaff Mello C, Caputo GC, Vieira IC. Are the cutaneous manifestations during or due to SARS-CoV-2 infection/COVID-19 frequent or not? Revision of possible pathophysiologic mechanisms. *Inflamm Res*. 2020; 69 (8): 745–56. DOI: 10.1007/s00011-020-01370-w.
- Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 470–73. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- Formica D, Sultana J, Cutroneo P, et al. The economic burden of preventable adverse drug reactions: a systematic review of observational studies. *Expert Opin Drug Saf*. 2018; 17 (7): 681–95. DOI: 10.1080/14740338.2018.1491547
- Aung A, Tang M, Adler N, et al. Adverse Drug Reactions Reported by Healthcare Professionals: Reaction Characteristics and Time to Reporting. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2018; 58 (10): 1332–9. DOI: 10.1002/jcph.1148.
- Gelincik A, Brockow K, Celik GE, Dona I, Mayorga C, Romano A, et al. Diagnosis and management of the drug hypersensitivity reactions in Coronavirus disease 19. *Allergy*. 2020; 10.1111/all.14439. DOI: 10.1111/all.14439.
- Marzano AV, Cassano N, Genovese G, Moltrasio C, Vena GA. Cutaneous manifestations in patients with COVID-19: a preliminary review of an emerging issue. *British Journal of Dermatology*. 2020; 183 (3): 431–42. DOI: 10.1111/bjd.19264.
- Su CJ, Lee CH. Viral exanthem in COVID-19, a clinical enigma with biological significance. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (6): e251–e252. DOI: 10.1111/jdv.16469.
- Henry D, Ackerman M, Sancelme E, Finon A, Esteve E. Urticarial eruption in COVID-19 infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (6): e244–e245. DOI: 10.1111/jdv.16472.
- Tang K, Wang Y, Zhang H, Zheng Q, Fang R, Sun Q. Cutaneous manifestations of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A brief review. *Dermatol Ther*. 2020; e13528. DOI: 10.1111/dth.13528.
- Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 8.1 (01.10.2020), утвержденные Министерством здравоохранения РФ. Доступно по ссылке: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/052/219/original/%D0%92%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.8.1%29.pdf?1601561462.
- Recalcati S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (5): e212–e213. DOI: 10.1111/jdv.16387.
- Jimenez-Cauhe J, Ortega-Quijano D, Prieto-Barrios M, Moreno-Arrones OM, Fernandez-Nieto D. Reply to "COVID-19 can present with a rash and be mistaken for dengue": Petechial rash in a patient with COVID-19 infection. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 83 (2): e141–e142. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.016.
- Diaz-Guimaraens B, Dominguez-Santas M, Suarez-Valle A, Pindado-Ortega C, Selda-Enriquez G, Bea-Ardebol S, et al. Petechial Skin Rash Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *JAMA Dermatol*. 2020; 156 (7): 820–22. DOI: 10.1001/jamadermatol.2020.1741.

References

- Casas C, Catala A, Hernandez G, Rodríguez-Jimenez P, Nieto D, Rodríguez-Villa A, et al. Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. *British Journal of Dermatology*. 2020; 183 (1): 71–77. DOI: 10.1111/bjd.19163.
- Almutairi N, Schwartz RA. COVID-2019 with dermatologic manifestations and implications: an unfolding conundrum. *Dermatol Therapy*. 2020; e13544. Available from: <https://doi.org/10.1111/dth.13544>.
- Recalcati S, Barbagallo T, Frasin LA, Prestinari F, Cogliardi A, Provero MC, et al. Acral cutaneous lesions in the time of COVID-19. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (8): e346–e347. DOI: 10.1111/jdv.16533.
- Criado PR, Abdalla BMZ, Assis IC, Blarcum de Graaff Mello C, Caputo GC, Vieira IC. Are the cutaneous manifestations during or due to SARS-CoV-2 infection/COVID-19 frequent or not? Revision of possible pathophysiologic mechanisms. *Inflamm Res*. 2020; 69 (8): 745–56. DOI: 10.1007/s00011-020-01370-w.
- Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 470–73. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- Formica D, Sultana J, Cutroneo P, et al. The economic burden of preventable adverse drug reactions: a systematic review of observational studies. *Expert Opin Drug Saf*. 2018; 17 (7): 681–95. DOI: 10.1080/14740338.2018.1491547
- Aung A, Tang M, Adler N, et al. Adverse Drug Reactions Reported by Healthcare Professionals: Reaction Characteristics and Time to Reporting. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2018; 58 (10): 1332–9. DOI: 10.1002/jcph.1148.
- Gelincik A, Brockow K, Celik GE, Dona I, Mayorga C, Romano A, et al. Diagnosis and management of the drug hypersensitivity reactions in Coronavirus disease 19. *Allergy*. 2020; 10.1111/all.14439. DOI: 10.1111/all.14439.
- Marzano AV, Cassano N, Genovese G, Moltrasio C, Vena GA. Cutaneous manifestations in patients with COVID-19: a preliminary review of an emerging issue. *British Journal of Dermatology*. 2020; 183 (3): 431–42. DOI: 10.1111/bjd.19264.
- Su CJ, Lee CH. Viral exanthem in COVID-19, a clinical enigma with biological significance. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (6): e251–e252. DOI: 10.1111/jdv.16469.
- Henry D, Ackerman M, Sancelme E, Finon A, Esteve E. Urticarial eruption in COVID-19 infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (6): e244–e245. DOI: 10.1111/jdv.16472.
- Tang K, Wang Y, Zhang H, Zheng Q, Fang R, Sun Q. Cutaneous manifestations of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A brief review. *Dermatol Ther*. 2020; e13528. DOI: 10.1111/dth.13528.
- Vremennye metodicheskie rekomendacii 'Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19)'. Versija 8.1 (01.10.2020), utverzhdennye Ministerstvom zdravoohraneniya RF. Available from: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/052/219/original/%D0%92%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.8.1%29.pdf?1601561462.

80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.8.1%29.pdf?1601561462. Russian.

14. Recalcati S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020; 34 (5): e212–e213. DOI: 10.1111/jdv.16387.
15. Jimenez-Cauhe J, Ortega-Quijano D, Prieto-Barrios M, Moreno-Arrones OM, Fernandez-Nieto D. Reply to "COVID-19 can

present with a rash and be mistaken for dengue": Petechial rash in a patient with COVID-19 infection. *J Am Acad Dermatol.* 2020; 83 (2): e141–e142. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.04.016.

16. Diaz-Guimaraens B, Dominguez-Santas M, Suarez-Valle A, Pindado-Ortega C, Selda-Enriquez G, Bea-Ardebol S, et al. Petechial Skin Rash Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *JAMA Dermatol.* 2020; 156 (7): 820–22. DOI: 10.1001/jamadermatol.2020.1741.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СМАРТФОНА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ МЕЛАНОЦИТАРНЫХ НЕВУСОВ

Т. А. Гайдина ✉, Е. Г. Дворникова

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

Ранняя диагностика злокачественной трансформации меланоцитарных невусов в меланому кожи (МК) является актуальной проблемой современной медицины. Общеизвестная тактика ведения пациентов с множественными меланоцитарными невусами кожи (ММНК) представляет собой динамическое наблюдение с проведением эксцизионной биопсии отдельных онкологически подозрительных или меланомоопасных меланоцитарных невусов кожи (МНК). Данная тактика требует дорогостоящего оборудования и огромных временных затрат врача и пациента. Целью работы было оценить эффективность использования оптической системы смартфона для определения злокачественности меланоцитарных невусов. Семь пациентов в возрасте 43–65 лет с ММНК на коже туловища и конечностей находились под наблюдением в течение четырех лет. Получение дерматоскопических микроснимков и оценку злокачественности МНК проводили при помощи оптического устройства Handyscope с 20-кратным увеличением, сопряженного со смартфоном под управлением мобильного приложения Handyscope3. За период наблюдения пациентам было удалено 74 МНК, МК не было обнаружено ни в одном случае. Оценка злокачественности всех удаленных 74 МНК, проведенная сверточной нейронной сетью, совпала с результатами гистологических исследований. Оптический адаптер к смартфону показал эффективность в диагностике злокачественности МНК. Для скрининговой первичной диагностики дерматоскопических изображений ММНК возможно использовать искусственный интеллект (ИИ), однако необходимо гистологическое исследование для верификации диагноза.

Ключевые слова: меланоцитарный невус кожи, искусственный интеллект, мобильные приложения, биопсия кожи, ранняя диагностика меланомы

Вклад авторов: авторы внесли равнозначный вклад в работу.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 201 от 21 октября 2020 г.); все пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение оперативного лечения.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Анатольевна Гайдина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; doc429@yandex.ru

Статья получена: 11.09.2020 **Статья принята к печати:** 25.09.2020 **Опубликована онлайн:** 27.10.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.065

EFFICACY OF SMARTPHONE-COMPATIBLE OPTICAL INSTRUMENT FOR ASSESSING MELANOCYTIC NEVI FOR MALIGNANCY

Gaydina TA ✉, Dvornikova EG

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Early detection of melanocytic nevus progression to malignant melanoma is a pressing concern. Traditionally, patients with multiple melanocytic nevi (MMN) are monitored for extended periods of time and excisional biopsies are performed on individual suspicious melanocytic nevi (MN). This approach is costly and tremendously time-consuming for both doctors and patients. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a smartphone-compatible optical instrument in the assessment of MN for malignancy. Seven patients aged 43 to 65 years with MMN on the trunk and upper/lower extremities were followed-up for 4 years. Dermoscopy images of MN were taken and analyzed using a Handyscope smartphone-compatible optical system operated at 20x magnification and a Handyscope3 application. A total of 74 MN were surgically removed during the follow-up period. None of the patients had melanoma. The results of dermoscopy image analysis generated by the convolutional neural network coincided with histopathology findings in all cases. The optical Handyscope system demonstrated its efficacy in assessing MN for malignancy. AI can be used for primary screening of MMN dermoscopy images. However, histopathological verification of the diagnosis is still needed.

Keywords: melanocytic nevus, artificial intelligence, mobile application, skin biopsy, early melanoma detection

Author contribution: both authors equally contributed to this manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 201 dated October 21, 2020); all patients gave voluntary consent to surgery.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana A. Gaydina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; doc429@yandex.ru

Received: 11.09.2020 **Accepted:** 25.09.2020 **Published online:** 27.10.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.065

Новообразования кожи возможно наблюдать с помощью портативных детекторов для смартфонов и анализировать полученные микроснимки с использованием ИИ, что значительно экономит время врача и пациента, а также дает возможность мониторинга изменений в меланоцитарных невусах кожи (МНК). Процесс злокачественной трансформации МНК в меланому кожи (МК) изучен недостаточно, что обязывает врача быть настороженным по отношению к большинству МНК. Согласно статистике, за 2018 г. в Российской Федерации

(РФ) в структуре онкологической заболеваемости ведущей локализацией у обоих полов является кожа (12,6% — без меланомы; 14,4% — с меланомой) [1]. Прирост смертности от МК у мужчин и женщин в нашей стране за период с 2008 по 2018 г. составил 11,19% [1]. В то же время, по данным Американского онкологического общества (The American Cancer Society), в США за период с 2013 по 2017 г. наблюдалось снижение смертности от МК (на 6,1% в год у мужчин и на 6,3% в год у женщин) при увеличении показателей заболеваемости (на 2,2% в год у мужчин и

на 1,9% в год у женщин) [2]. Продолжительность жизни пациентов с МК зависит в первую очередь от стадии опухолевого процесса, на которой было начато лечение, и неутешительная статистика в РФ свидетельствует о недостаточном развитии ранней диагностики МК. Лишь каждый третий пациент с МК в РФ в 2017 г. был выявлен активно. В 2016–2017 гг. показатель запущенности по МК сохранился на уровне 19,0%, что является недопустимо высоким показателем при визуальной локализации опухолей [3]. Значительно улучшить раннюю диагностику новообразований кожи (НК) можно с помощью оптических устройств, сопряженных со смартфоном под управлением мобильного приложения.

Факторы риска развития МК — воздействие на кожу избыточного ультрафиолетового излучения, солнечные ожоги в детском возрасте, I и II фототипы кожи по Фитцпатрику, генетическая мутация CDKN2A, наличие 10 и более диспластических невусов или наличие более 100 множественных меланоцитарных невусов кожи (ММНК), рак кожи в анамнезе, семейные случаи меланомы [4–6]. При наличии у одного пациента нескольких факторов риска вероятность развития МК возрастает. В таких случаях оптимально проводить тотальное картирование всего кожного покрова пациента один раз в 3–6 месяцев с применением цифровой дерматоскопии, последующим компьютерным анализом всех МНК с помощью искусственного интеллекта (ИИ) и эксцизионной биопсией отдельных онкологически подозрительных образований [7–9]. При наличии у пациентов ММНК (одного из факторов риска развития МК) необходимо посещать дерматолога 1–2 раза в год для динамического наблюдения с использованием неинвазивных методов ранней диагностики МК. Использование цифровой дерматоскопии позволяет фиксировать изменения, происходящие в МНК, и анализировать их с помощью ИИ, повышая качество диагностики [10–12]. Все неинвазивные методы ранней диагностики МК условно можно разделить на три группы:

1-я группа — скрининг всех МНК для первичной диагностики в широкой клинической практике;

2-я группа — исследование предварительно выбранных потенциально меланомоопасных МНК;

3-я группа — исследование предварительно выбранных потенциально меланомоопасных МНК в специализированных медицинских учреждениях с целью предоперационного определения объема хирургического вмешательства для их удаления [13].

Новыми перспективными методами неинвазивной диагностики МНК являются оптические системы, позволяющие делать дерматоскопические микроснимки с помощью смартфона. Полное картирование кожного покрова требует стационарного размещения крупногабаритного дорогостоящего оборудования, в то время как оптические адаптеры к смартфону портативны и более удобны в эксплуатации. Смартфон — доступное средство телекоммуникации, что позволяет использовать его не только для съемки и хранения дерматоскопических микроснимков, но и для отправки микроснимков и других медицинских данных с целью экспертной оценки и получения второго мнения [14].

При динамическом наблюдении пациентов с ММНК важно анализировать изменения, происходящие в уже существующих МНК, а также следить за возможным развитием МК *de novo*. Даже при использовании нескольких дополнительных неинвазивных методов исследования

МНК определить начальные признаки злокачественной трансформации достаточно сложно. Начиная клиническую практику дерматологам не всегда удается правильно интерпретировать дерматоскопические признаки изменений, происходящих в МНК, что может привести, с одной стороны, к гипердиагностике и большому числу нерациональных удалений, а, с другой стороны — к поздней постановке диагноза МК. Для принятия решения в сложных диагностических случаях актуальна дистанционная теледиагностика, позволяющая экономить время пациента и врача. Интенсивное развитие высоких технологий и цифровизация медицины позволяют врачам работать в новом формате цифрового здравоохранения, повышая эффективность и качество оказываемой медицинской помощи. Активное развитие портативных детекторов дает возможность мониторинга широкого спектра клинически важных параметров человека. Целью работы было оценить эффективность использования оптической системы смартфона для определения злокачественности меланоцитарных невусов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В течение четырех лет мы наблюдали семь пациентов (четверо мужчин и трое женщин) в возрасте 43–65 лет (средний возраст 51,14 лет). Критерии включения: пациенты любого пола; возраст 18 лет и старше; наличие ММНК на коже туловища и/или конечностей. Критерии исключения: возраст до 18 лет; любые хронические заболевания в стадии декомпенсации. МНК считали множественными при наличии более 100 у одного пациента. В общей сложности за период наблюдения у семи пациентов было обнаружено и обследовано 875 МНК. В течение четырех лет пациентам было удалено 74 МНК. Получение дерматоскопических микроснимков и оценку злокачественности МНК проводили при помощи оптического устройства Handyscope с 20-кратным увеличением (FotoFinder; Германия) сопряженного со смартфоном под управлением мобильного приложения Handyscope3. В данном приложении ИИ представляет из себя сверточную нейронную сеть, предварительно обученную на большом количестве микроснимков новообразований с гистологически подтвержденным диагнозом.

Качественные дерматоскопические микроснимки удобно делать с помощью цифровой камеры смартфона, что значительно облегчает работу практических врачей. Однако без использования дополнительной оптики и освещения камера обычного смартфона не может обеспечить единообразие условий съемки и точной передачи деталей изображения новообразования в высоком разрешении. Из большого количества оптических систем, которые сейчас предложены на рынке, мы выбрали для исследования систему «Handyscope». Компанией-производителем разработано мобильное приложение, которое позволяет делать оценку микроснимков с помощью ИИ и хранить полученную информацию в мобильном приложении. В затруднительных для диагностики случаях в приложении разработан сервис «второе мнение», позволяющий запросить мнение опытного эксперта в области дерматоскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам обследования у всех пациентов ММНК локализовались преимущественно на коже туловища

($n = 699$; 79,89%), а также на коже верхних ($n = 117$; 13,37%) и нижних конечностей ($n = 59$; 6,74%). У одной женщины 65 лет было обнаружено наибольшее число МНК ($n = 183$, в том числе три диспластических невуса); ей было проведено максимальное число удалений ($n = 25$) за четыре года. Наименьшее число МНК ($n = 126$) было обнаружено у мужчины 45 лет, ему было удалено пять МНК за четыре года. Максимальное число онкологически подозрительных МНК было выявлено при первичном осмотре в первый год наблюдения (47 МНК; 63,5%). В последующем все пациенты посещали дерматолога два раза в год, при каждом посещении им проводили цифровую дерматоскопию с помощью смартфона, сопряженного с оптической системой. В мобильном приложении Handyscore3 встроенный модуль ИИ анализировал полученные микроснимки МНК и давал оценку злокачественности. В результате оценки модуля ИИ получали число в диапазоне от 0 до 1, при этом число в диапазоне от 0,5 до 1 следует расценивать как подозрительное новообразование, а число в диапазоне от 0 до 0,2 как неподозрительное. С пациентами проводили разъяснительную образовательную беседу о том, что они находятся в группе риска по развитию МК и должны два раза в год проходить профилактическое обследование у дерматолога. Всем пациентам были даны следующие рекомендации: избегать прямого воздействия солнечных лучей на открытую кожу, всегда использовать солнцезащитный крем с максимальным фактором защиты при пребывании на солнце, полностью отказаться от посещения соляриев. При обнаружении онкологически подозрительных МНК пациентов направляли на консультацию к онкологу для определения дальнейшей тактики ведения и проведения при необходимости биопсии с последующим гистологическим исследованием. Согласно протоколу, принятому Международным агентством по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), меланомоопасными диспластическими невусами являются МНК со следующими клиническими признаками: размером невуса более 5 мм в диаметре, неравномерной пигментацией, асимметрией, неровными краями, периферической гиперемией. По классическому правилу «ABCD» МК не была выявлена ни у одного пациента. Однако были обнаружены 10 диспластических невусов у пяти пациентов, и у двух пациентов постановка диагноза по дерматоскопической картине была затруднена. Все МНК были проанализированы программой в мобильном приложении к смартфону на предмет злокачественности. Все пациенты были направлены на консультацию к онкологу.

Удаление МНК осуществлял онколог в специализированном учреждении. В отдельных случаях пациенты сами настаивали на удалении МНК по различным причинам (эстетические проблемы, постоянная травматизация, локализация в местах постоянного трения). Перед удалением МНК проводили его дерматоскопическое исследование и фотофиксацию. Для удаления пациенту проводили инфильтрационную анестезию, затем осуществляли или эксцизионную биопсию, или «shave biopsy» МНК с последующим гистологическим исследованием. Пример использования системы ИИ для диагностики злокачественности МНК с этапами диагностических исследований представлен на рис. 1.

В общей сложности за весь период наблюдения пациентам было удалено 74 МНК, МК не было обнаружено ни в одном случае. Оценка злокачественности всех

удаленных 74 МНК сверточной нейронной сетью совпала с гистологическим диагнозом. У пяти пациентов были обнаружены и удалены 10 (13,5%) диспластических невусов с гистологическим подтверждением. В 35 (47,3%) случаях удалений МНК гистологически был поставлен диагноз внутридермального меланоцитарного невуса. В девяти (12,2%) случаях — смешанный меланоцитарный невус. В двух (2,7%) случаях — невус Сеттона. В одном (1,6%) случае — простое лентиго. В 17 случаях (22,97%) МНК не вызывали опасений, но пациенты по разным причинам сами настаивали на их удалении. В основном удаленные МНК локализовались на коже туловища

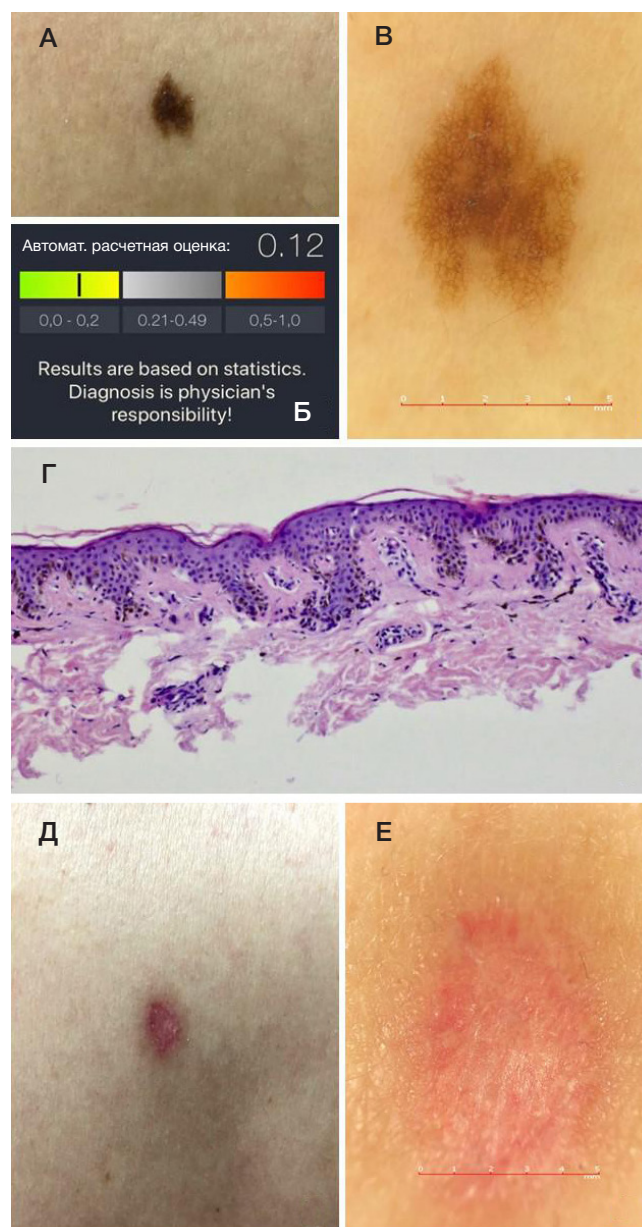


Рис. 1. Пример использования системы ИИ для диагностики злокачественности МНК. **А.** Клиническая картина МНК. **Б.** Оценка дерматоскопической картины МНК искусственным интеллектом. **В.** Дерматоскопическая картина МНК (ув. $\times 20$): ретикулярный тип диспластического невуса с центральной гиперпигментацией. **Г.** Гистологическая картина (окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$): фрагмент кожи покрыт многослойным плоским ороговевающим эпителием со слабо выраженным акантозом. Заметны множественные невусные клетки, располагающиеся гнездно, плотно прилегающие к эпидермису. Заключение: D22. Меланоцитарный пограничный невус. ICD-O code: 8740/0. В краях резекции невоидные клетки отсутствуют. **Д.** Формирование нормотрофического рубца. **Е.** Дерматоскопическая картина нормотрофического рубца (ув. $\times 20$)

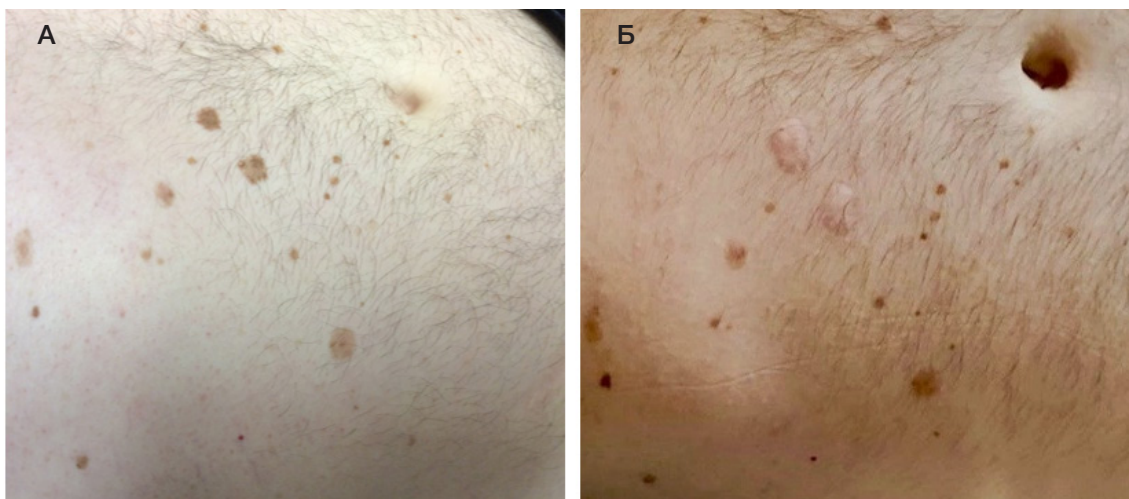


Рис. 2. А. Клиническая картина ММНК на коже живота. Б. Рубцы после удалений МНК

(60 МНК; 81,1%), гораздо меньше — на коже верхних (8 МНК; 10,8%) и нижних конечностей (6 МНК; 8,1%) (рис. 2).

При образовании гипертрофических рубцов пациенты жаловались на периодический зуд и болезненность в области рубца, эстетический дискомфорт. Для лечения рубцов в этом случае им назначали препараты для наружного применения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверные данные об эпидемиологии МНК в мире отсутствуют. С одной стороны, существуют противоречия в терминологии МНК, с другой стороны, строгий статистический учет ведется только для злокачественных НК. Ретроспективный анализ оцифрованных биопсий позволяет приблизиться к пониманию распространенности МНК, но пока его проводят только в отдельных регионах [15]. В литературе используют большое число терминов для описания потенциально меланомоопасных МНК [16]. В 1978 г. Кларк описал две семьи с ММНК и высокой частотой возникновения меланомы. Термин «ВК-tole syndrome» происходит от первых букв фамилий этих семей.

По некоторым данным, случаи злокачественной трансформации МНК в МК варьируют от 4 до 54,2% и более [17, 18]. Существуют МНК с неопределенным злокачественным потенциалом [19]. Пациенты с ММНК представляют собой группу риска по развитию меланомы, причем риск развития меланомы возрастает с увеличением числа невусов. При наличии у пациента 100 и более пограничных невусов риск развития МК увеличивается в семь раз, по сравнению с пациентами, у которых менее 15 простых невусов [4]. Риск развития меланомы возрастает при наличии у пациентов с ММНК диспластических невусов [5]. Тем не менее ряд авторов не считают целесообразным «профилактическое» удаление МНК [4, 16], предлагая активнее использовать неинвазивные методы диагностики: дерматоскопию, последовательную цифровую дерматоскопию, компьютерную диагностику, тотальное картирование всего кожного покрова, визуализацию и высокочастотную ультрасонографию, конфокальную микроскопию, мультифотонную томографию, спектроскопию электрического импеданса, ступенчатую двухфотонно лазерную спектроскопию и количественную динамическую инфракрасную спектроскопию [13].

А. Zink с соавторами сравнили результаты анализа дерматоскопических микроснимков с клиническими

исследованиями и гистологическими результатами. Дерматоскопические микроснимки были сделаны у 26 пациентов с помощью мобильного телефона и оптической системы «Handyscope». Результаты обследования, проведенного пятью врачами независимо друг от друга, сравнивали в отношении точности диагноза, дифференциальных диагнозов и рекомендуемого дальнейшего ведения. Согласованность диагнозов составила 92,3%; согласованность рекомендуемого дальнейшего лечения — 76,9%. Из 6 гистологически подтвержденных диагнозов 66,7% были поставлены с помощью цифровых дерматоскопических микроснимков и клинического исследования. Авторы делают вывод, что цифровые дерматоскопические микроснимки единичных поражений, в том числе МНК, в сочетании с макрофотографиями могут быть дистанционно качественно оценены и мобильная цифровая дерматоскопия является хорошей альтернативой обычному дерматоскопическому исследованию [20]. В нашем исследовании анализ цифровых дерматоскопических микроснимков ИИ на предмет злокачественности совпал в 74 (100%) случаях с гистологическим заключением. Оптический адаптер для смартфона в сочетании с мобильным приложением удобно использовать в работе. Оценка злокачественности ИИ в приложении занимает несколько секунд, что значительно экономит время. Важна также возможность дистанционной теледиагностики, позволяющая экономить время пациента и врача [21].

Неинвазивные методы диагностики кожи пока не могут заменить гистологическое исследование. На обучение дерматоскопии и накопление опыта специалистом уходит около двух лет, а при диагностике сложных или редких случаев возможна субъективная интерпретация дерматоскопической картины. Использование ИИ для скрининговой первичной диагностики НК оказывает значительную помощь в постановке диагноза [22].

Продолжается разработка скрининга МК в России, в том числе в виртуальном формате [23].

ВЫВОДЫ

Необходимость динамического наблюдения пациентов с ММНК делает актуальным поиск новых, более точных неинвазивных методов диагностики. В проведенном исследовании анализ дерматоскопических микроснимков

МНК, сделанных при помощи оптического устройства с 20-кратным увеличением, сопряженного со смартфоном, и оценка злокачественности ИИ в мобильном приложении позволили на высоком уровне определить

злокачественность МНК. Цифровизация медицины и развитие портативных детекторов открывает перед врачами новые возможности для оказания медицинских услуг на новом высокотехнологичном уровне.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019; 250 с.
- Henley SJ, Ward EM, Scott S, Ma JM, Anderson RN, Firth AU, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*. 2020; 126 (10): 2225–49.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 236 с.
- Кубанов А. А., Сысоева Т. А., Галлямова Ю. А., Бишарова А. С., Мерцалова И. Б. Алгоритм обследования пациентов с новообразованиями кожи. *Лечащий врач*. 2018; (3): 83–88.
- Саламова И. В., Мордовцева В. В., Ламоткин И. А. Проблема профилактики меланомы кожи у пациентов с множественными невусами. *Клиническая дерматология и венерология*. 2014; 12 (2): 110–115.
- Клинические рекомендации: меланома кожи и слизистых оболочек (утв. Минздравом России) (17 июля, 2020). Доступно по ссылке: https://melanomapro.ru/page/clinical-guidelines-melanoma_2020.
- Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, et al. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy ("two-step method of digital follow-up") in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 67 (1): e17–e27.
- Романова О. А., Артемьева Н. Г., Ягубова Э. А., Рудакова И. М., Марычева В. Н., Вещевайлов А. А. Принципы эксцизионной биопсии диспластического невуса в амбулаторных условиях. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2016; 5 (1): 36–41.
- Сергеев Ю. Ю., Сергеев В. Ю., Мордовцева В. В. Динамическое наблюдение за меланоцитарными образованиями при помощи дерматоскопии (обзор литературы). *Медицинский алфавит*. 2020; (6): 66–71.
- Sondermann W, Utikal J, Enk A, Schadendorf D, Klode J, Hauschild A, et al. Prediction of melanoma evolution in melanocytic nevi via artificial intelligence: A call for prospective data. *Eur J Cancer*. 2019; 119: 30–4.
- Hekler A, Utikal J, Enk A, Hauschild A, Weichenthal M, Maron RC, et al. Superior skin cancer classification by the combination of human and artificial intelligence. *Eur J Cancer*. 2019; 120: 114–121.
- Glotsos D, Kostopoulos S, Lalissidou S, Sidiropoulos K, Asvestas P, Konstandinou C, et al. Design of a decision support system, trained on GPU, for assisting melanoma diagnosis in dermatoscopy images. *Journal of Physics: Conference Series*. 2015; 633: 012079.
- Grajdeanu I, Vata D, Stasescu L, Popescu I, Porumb-Andres E, Patrascu A, et al. Use of imaging techniques for melanocytic naevi and basal cell carcinoma in integrative analysis (Review). *Exp Ther Med*. 2020; 78–86.
- Doukas C, Stagkopoulos P, Maglogiannis I. Skin lesions image analysis utilizing smartphones and cloud platforms. *Mobile Health Technologies*. 2015; 1256: 435–458.
- Lott J, Boudreau D, Barnhill R, Weinstock MA, Knopp E, Piepkorn MW, et al. Population-Based Analysis of Histologically Confirmed Melanocytic Proliferations Using Natural Language Processing. *JAMA Dermatol*. 2018; 154 (1): 24–9.
- Emiroglu N, Sallahoglu K, Cengiz F, Cemil B, Onsun N. Three years dermoscopic follow-up of atypical nevi. *Dermatol Ther*. 2020; 33 (1): e13205.
- Haenssle H, Mograbry N, Ngassa A, Buhl T, Emmert S, Schön MP, et al. Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatol*. 2016; 152 (3): 291–298.
- Melamed R, Aydin I, Rajan G, Phelps R, Silvers DN, Emmett KJ, et al. Genomic Characterization of Dysplastic Nevi Unveils Implications for Diagnosis of Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017; 137 (4): 905–909.
- Woltsche N, Schmid-Zaladek K, Deinlein T, Rammel K, Hofmann-Wellenhof R, Zaladek I. Abundance of the benign melanocytic universe: Dermoscopic-histopathological correlation in nevi. *J Dermatol*. 2017; 44 (5): 499–506.
- Zink A, Kolbinger A, Leibl M, Suarez I, Gloning J, Merkel C, et al. Teledermoscopy by mobile phones. Reliable help in the diagnosis of skin lesions? *Der Hautarzt*. 2017; 68 (11): 890–895.
- Wu X, Oliveria S, Yagerman S, Chen L, Defazio J, Braun R, et al. Feasibility and Efficacy of Patient-Initiated Mobile Teledermoscopy for Short-term Monitoring of Clinically Atypical Nevi. *JAMA Dermatol*. 2015; 151 (5): 489–496.
- Гайдина Т. А., Дворников А. С., Скрипкина П. А. Клинический случай: удаление пролиферирующей пиломатрикомы CO₂-лазером. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2019; 6: 110–113.
- Демидов Л. В., Синельников И. Е., Барышников К. А., Утяшев И. А., Назарова В. В. Перспективы скрининга меланомы кожи в России. *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»*, 2017; 28 (1–2): 28–35.
- Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019; 250 с. Russian.
- Henley SJ, Ward EM, Scott S, Ma JM, Anderson RN, Firth AU, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*. 2020; 126 (10): 2225–49.
- Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018; 236 с. Russian.
- Kubanov AA, Sysoeva TA, Galljamova YuA, Bisharova AS, Mercalova IB. Algorithm of examination of patients with skin neoplasms. *Lechashij vrach*. 2018; (3): 83–88. Russian.
- Salamova IV, Mordovceva VV, Lamotkin IA. Problema profilaktiki melanomy kozhi u pacientov s mnozhestvennymi nevusami. *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2014; 12 (2): 110–115. Russian.
- Klinicheskie rekomendacii: melanoma kozhi i slizistyh obolochek (utv. Minzdravom Rossii) (17 iulja, 2020). Dostupno po ssylke: https://melanomapro.ru/page/clinical-guidelines-melanoma_2020. Russian.
- Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, et al. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy ("two-step method of digital follow-up") in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 67 (1): e17–e27.
- Romanova OA, Artemyeva NG, Yagubova EA, Rudakova IM,

References

- Marycheva VN, Veshchevailov AA. Principles of excisional biopsy of dysplastic nevus in outpatient settings. *Onkologiya Zhurnal imeni PA Gertsena*. 2016; 5 (1): 36–41.
9. Sergeev YuYu, Sergeev VYu, Mordovceva VV. Dinamicheskoe nabljudenie za melanocitarnymi obrazovanijami pri pomoshhi dermatoskopii (obzor literatury). *Medicinskij alfavit*. 2020; (6): 66–71. Russian.
 10. Sondermann W, Utikal J, Enk A, Schadendorf D, Klode J, Hauschild A, et al. Prediction of melanoma evolution in melanocytic nevi via artificial intelligence: A call for prospective data. *Eur J Cancer*. 2019; 119: 30–4.
 11. Hekler A, Utikal J, Enk A, Hauschild A, Weichenthal M, Maron RC, et al. Superior skin cancer classification by the combination of human and artificial intelligence. *Eur J Cancer*. 2019; 120: 114–121.
 12. Glotsos D, Kostopoulos S, Lalissidou S, Sidiropoulos K, Asvestas P, Konstandinou C, et al. Design of a decision support system, trained on GPU, for assisting melanoma diagnosis in dermatoscopy images. *Journal of Physics: Conference Series*. 2015; 633: 012079.
 13. Grajdeanu I, Vata D, Statescu L, Popescu I, Porumb-Andrese E, Patrascu A, et al. Use of imaging techniques for melanocytic naevi and basal cell carcinoma in integrative analysis (Review). *Exp Ther Med*. 2020; 78–86.
 14. Doukas C, Stagkopoulos P, Maglogiannis I. Skin lesions image analysis utilizing smartphones and cloud platforms. *Mobile Health Technologies*. 2015; 1256: 435–458.
 15. Lott J, Boudreau D, Barnhill R, Weinstock MA, Knopp E, Piepkorn MW, et al. Population-Based Analysis of Histologically Confirmed Melanocytic Proliferations Using Natural Language Processing. *JAMA Dermatol*. 2018; 154 (1): 24–9.
 16. Emiroglu N, Sallahoglu K, Cengiz F, Cemil B, Onsun N. Three years dermoscopic follow-up of atypical nevi. *Dermatol Ther*. 2020; 33 (1): e13205.
 17. Haenssle H, Mognaby N, Ngassa A, Buhl T, Emmert S, Schön MP, et al. Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatol*. 2016; 152 (3): 291–298.
 18. Melamed R, Aydin I, Rajan G, Phelps R, Silvers DN, Emmett KJ, et al. Genomic Characterization of Dysplastic Nevi Unveils Implications for Diagnosis of Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017; 137 (4): 905–909.
 19. Woltsche N, Schmid-Zalaudek K, Deinlein T, Rammel K, Hofmann-Wellenhof R, Zalaudek I. Abundance of the benign melanocytic universe: Dermoscopic-histopathological correlation in nevi. *J Dermatol*. 2017; 44 (5): 499–506.
 20. Zink A, Kolbinger A, Leibl M, Suarez I, Gloning J, Merkel C, et al. Teledermoscopy by mobile phones. Reliable help in the diagnosis of skin lesions? *Der Hautarzt*. 2017; 68 (11): 890–895.
 21. Wu X, Oliveria S, Yagerman S, Chen L, Defazio J, Braun R, et al. Feasibility and Efficacy of Patient-Initiated Mobile Teledermoscopy for Short-term Monitoring of Clinically Atypical Nevi. *JAMA Dermatol*. 2015; 151 (5): 489–496.
 22. Gaydina TA, Dvornikov AS, Skripkina PA. Case report: removal of a proliferating pilomatricoma with a CO₂ laser. *Bulletin of Russian state medical university*. 2019; 6: 110–113. Russian.
 23. Demidov LV, Sinel'nikov IE, Baryshnikov KA, Utjashev IA, Nazarova VV. Perspektivy skrininga melanomy kozhi v Rossii. *Vestnik FGBU «RONC im. N.N. Blohina»*. 2017; 28 (1–2): 28–35.

В журнале Вестник РГМУ (июль–август 2020/04, с. 63–69) были допущены ошибки в статье:

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. Тоневицкий

✉ 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

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.049

Редакция просит учесть следующие изменения:

	Напечатано:	Должно быть:
с. 63, пункт "Финансирование"	Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения: RFMEFI60519X0184).	Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения: RFMEFI61719X0056).
с. 63, пункт "Funding"	The study received public financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project ID RFMEFI60519X0184).	The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project ID RFMEFI61719X0056).