

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.2020-06

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 31.12.2020
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)
Skoblina 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.2020-06

The mass media registration certificate № 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 31.12.2020
Circulation: 100 copies. Printed by PrintFormula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
Генетические аспекты этиологии билиарной атрезии М. Х. Исаева, В. А. Белова, Д. О. Коростин, А. В. Дегтярева Genetic aspects of biliary atresia etiology Isaeva MKh, Belova VA, Korostin DO, Degtyareva AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	15
Взаимодействие генофондов русского и финноязычного населения Тверской области: анализ 4 млн SNP-маркеров О. П. Балановский, И. О. Горин, Ю. С. Записецкая, А. А. Голубева, Е. С. Кострюкова, Е. В. Балановская Interactions between gene pools of Russian and Finnish-speaking populations from Tver region: analysis of 4 million SNP markers Balanovsky OP, Gorin IO, Zapiseckaya YuS, Golubeva AA, Kostryukova EV, Balanovska EV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	23
Избирательное изменение экспрессии α -субъединиц интегринов в клетках кишечного эпителия Caco-2 при гипоксии в условиях микроциркуляции Д. В. Мальцева, А. А. Полозников, В. Г. Артюшенко Selective changes in expression of integrin α -subunits in the intestinal epithelial Caco-2 cells under conditions of hypoxia and microcirculation Maltseva DV, Poloznikov AA, Artyushenko VG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	32
Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена <i>ADRB2</i> с ответом на β 2-агонисты у пациентов с редким типом бронхиальной астмы Д. С. Мдинарадзе, И. Б. Козлов, К. С. Павлова, И. А. Кофиади, О. М. Курбачева Analysis of the polymorphic variants of <i>ADRB2</i> gene association with the β 2-agonists response in patients with a rare theratype of asthma Mdinardze DS, Kozlov IB, Pavlova KS, Kofiadi IA, Kurbacheva OM	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	39
Картографический атлас распространения 45 фармакогенетических маркеров в народонаселении России и сопредельных стран Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель, Э. А. Почешкова, Д. К. Черневский, К. Б. Мирзаев, Ш. П. Абдуллаев, О. П. Балановский Cartographic atlas of frequency variation for 45 pharmacogenetic markers in populations of Russia and its neighbor states Balanovska EV, Petrushenko VS, Kosheh SM, Pocheshkhova EA, Chernevskiy DK, Mirzaev KB, Abdullaev SP, Balanovsky OP	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	53
Взаимосвязь изменения экспрессии микроРНК и мРНК в клетках линии HT-29 в условиях гипоксии С. А. Нерсисян, А. В. Галатенко, Д. В. Мальцева, Ю. А. Ушкарев, А. Г. Тоневский Interrelation between miRNA and mRNA expression in HT-29 line cells under hypoxia Nersisyan SA, Galatenko AV, Maltseva DV, Ushkaryov YuA, AG Tonevitskiy AG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	60
Влияние модуляции активности p53 на взаимодействие членов семейства p53 в процессе дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT А. Л. Русанов, П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, М. Н. Карагяур, Н. Г. Лузгина Impact of p53 modulation on interactions between p53 family members during HaCaT keratinocytes differentiation Rusanov AL, Kozhin PM, Romashin DD, Karagyaur MN, Luzgina NG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	68
Структура и нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника у здоровых детей разного возраста А. С. Ковтун, О. В. Аверина, Е. У. Полуэктова, Г. П. Костюк, В. Н. Даниленко Altered neurometabolic potential of gut microbiome in healthy children of different age Kovtun AS, Averina OV, Poluektova EU, Kostyuk GP, Danilenko VN	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	80
Современный подход к диагностике патогенетических вариантов ишемического инсульта при атеросклерозе и артериальной гипертензии П. Л. Ануфриев, М. М. Танашян, Т. С. Гулевская Contemporary approach to diagnosis of ischemic stroke pathogenetic variants in patients with atherosclerosis and arterial hypertension Anufriev PL, Tanashjan MM, Gulevskaja TS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	87
Паттерны атрофии головного мозга при лобно-височной деменции: данные воксель-ориентированной морфометрии Д. Р. Ахмадуллина, Р. Н. Коновалов, Ю. А. Шпилюкова, Д. А. Гришина, Е. С. Бердникович, С. С. Фоменко, Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин Brain atrophy patterns in patients with frontotemporal dementia: voxel-based morphometry Akhmadullina DR, Konovalov RN, Shpiyukova YuA, Grishina DA, Berdnikovich ES, Fomenko SS, Fedotova EYu, Illarioshkin SN	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

94

Изменчивость интерлейкинов при когнитивной нагрузке у больных с хронической ишемией мозга

В. Ф. Фокин, А. А. Шабалина, Н. В. Пономарева, Р. Б. Медведев, О. В. Лагода, М. М. Танашян

Interleukin dynamics during cognitive stress in patients with chronic cerebral ischemia

Fokin VF, Shabalina AA, Ponomareva NV, Medvedev RB, Lagoda OV, Tanashyan MM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

101

Методика ускоренного получения модельных кишечных барьеров *in vitro*

С. В. Никулин, А. А. Полозников, Д. А. Сахаров

A method for rapid generation of model intestinal barriers *in vitro*

Nikuln SV, Poloznikov AA, Sakharov DA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

108

Локальный антиоксидантный эффект оригинальной дермальной пленки с мелатонином при термической травме

М. В. Осиков, Е. В. Симонян, А. А. Агеева, Ю. И. Агеев, А. А. Федосов, А. И. Синицкий

Local antioxidant effect of original dermal film with melatonin in thermal injury

Osikov MV, Simonyan EV, Ageeva AA, Ageev Yul, Fedosov AA, Sinitsky AI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

117

Буккальная уретеропластика при рецидивных протяженных стриктурах и облитерациях дистального отдела мочеточника

А. А. Волков, Н. В. Будник, О. Н. Зубань, М. А. Абдулаев, Д. В. Плоткин, М. Н. Решетников

Buccal ureteroplasty for recurrent extended strictures and obliterations of distal ureter

Volkov AA, Budnik NV, Zuban ON, Abdulaev MA, Plotkin DV, Reshetnikov MN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

126

Диссомнические расстройства при ювенильном ревматоидном артрите: влияние на качество жизни

А. А. Елезаров, А. С. Кучерявый, Л. Н. Гуменюк, Л. Е. Сорокина, С. Р. Арифджанова, О. Ю. Гербали

Dissomic disorders associated with juvenile rheumatoid arthritis: impact on quality of life

Elezarov AA, Kucheryavyy AS, Gumenyuk LN, Sorokina LE, Arifdzhanova SR, Gerbali OYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

135

Качество жизни пациентов в резидуальном периоде ишемического инсульта и определяющие его факторы

Е. Е. Молчанова, В. В. Полунина, Б. А. Поляев, В. П. Плотников, А. Н. Лобов, С. А. Парастаев

Quality of life in stroke patients in residual stroke period and its determinants

Molchanova EE, Polunina VV, Polyayev BA, Plotnikov VP, Lobov AN, Parastaev SA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

142

Удовлетворенность пациентов с COVID-19 качеством медицинской помощи, оказанной в форме дистанционных телемедицинских консультаций

Н. В. Полунина, А. А. Тяжельников, А. В. Погонин, Е. В. Костенко

COVID-19 patients' satisfaction with quality of medical care provided in the form of telemedicine consultations

Polunina NV, Tyazhelnikov AA, Pogonin AV, Kostenko EV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

149

Оценка эффективности гигиенического воспитания школьников и студентов по формированию навыков безопасного использования электронных устройств

О. Ю. Милушкина, С. В. Маркелова, Н. А. Скоблина, А. Б. Моисеев, А. А. Аль-Сабунчи, А. А. Татаринчик, П. О. Савчук, О. В. Иевлева

Evaluation of efficacy of providing hygiene education to schoolchildren and students in the process of development of the safe electronic device use skills

Milushkina OYu, Markelova SV, Skoblina NA, Moiseev AB, Alsabunchi AA, Tatarinchik AA, Savchuk PO, Ievleva OV

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭТИОЛОГИИ БИЛИАРНОЙ АТРЕЗИИ

М. Х. Исаева¹ ✉, В. А. Белова², Д. О. Коростин², А. В. Дегтярева^{1,3}¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

Билиарная атрезия (БА) — это холестатическое заболевание печени, которое дебютирует в младенческом возрасте и при отсутствии своевременного лечения приводит к циррозу печени с прогрессирующей печеночной недостаточностью. Несмотря на многолетние исследования, этиология билиарной атрезии остается не до конца изученной. Среди факторов, вовлеченных в этиопатогенез БА, выделяют иммунную дисрегуляцию, факторы окружающей среды и генетическую предрасположенность. Роль генотипа пациента в развитии заболевания активно изучается, выявлены гены-кандидаты, ассоциированные с БА в определенных популяциях, гены, влияющие на функционирование ресничек холангиоцитов, а также гены, участвующие в стресс-реакциях. Однако, исходя из многолетних результатов наблюдений близнецов с БА, можно сделать вывод о том, что роль генотипа не является первостепенной в развитии заболевания. Предположительно, в этиологию заболевания могут вносить вклад как эпигенетические механизмы, так и постзиготические соматические мутации. В последнее время накапливаются также данные о возможной генетической предрасположенности к исходу портоэнтеростомии по Касаи, проводимой при БА. Вместе с тем, наличие многих факторов, играющих роль в развитии заболевания, создает трудности в выявлении точных генетических маркеров.

Ключевые слова: билиарная атрезия, этиология билиарной атрезии, холестаз, заболевание печени, генетические факторы

Финансирование: работа была поддержана грантом №075-15-2019-1789 Министерства образования и науки РФ, выделенным на осуществление государственной поддержки создания и развития «Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины».

Вклад авторов: М. Х. Исаева, В. А. Белова — изучение литературы, написание обзора; Д. О. Коростин, А. В. Дегтярева — вклад в концепцию и структуру обзора, редактирование.

✉ **Для корреспонденции:** Медан Хасановна Исаева
ул. Академика Опарина, д. 4Б, г. Москва, 117513; median.isayeva@bk.ru

Статья получена: 08.10.2020 **Статья принята к печати:** 24.10.2020 **Опубликована онлайн:** 06.11.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.069

GENETIC ASPECTS OF BILIARY ATRESIA ETIOLOGY

Isaeva MKh¹ ✉, Belova VA², Korostin DO², Degtyareva AV^{1,3}¹ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia³ Sechenov University, Moscow, Russia

Biliary atresia (BA) is a cholestatic disorder of infancy that is fatal if untreated. Despite years of study the etiology of BA remains unknown. Three etiopathogenic mechanisms may be involved, such as immune dysregulation, environmental factors and genetic susceptibility. Genetic predisposition is being actively studied. Candidate genes associated with BA in certain populations, genes affecting the cholangiocyte cilia function, as well as genes involved in stress responses have been identified. However, the long-term follow-up of twins with BA suggests that genotype is not of paramount importance for the disease development. Both epigenetic patterns and postzygotic somatic mutations may contribute to etiology of the disease. Recently, some evidence is being accumulated on the possible genetic predisposition to certain outcome of Kasai portoenterostomy performed in patients with BA. However, the presence of a number of factors contributing to the development of the disease makes it difficult to identify the genetic markers.

Keywords: biliary atresia, biliary atresia etiology, cholestasis, liver disease, genetic factors

Funding: the study was supported by grant № 075-15-2019-1789 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation issued to ensure state support for the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

Author contribution: Isaeva MKh, Belova VA — literature analysis, manuscript writing; Korostin DO, Degtyareva AV — concept and structure of the review, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Medan Kh. Isaeva
Oparina, 4B, Moscow, 117513; median.isayeva@bk.ru

Received: 08.10.2020 **Accepted:** 24.10.2020 **Published online:** 06.11.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.069

Билиарная атрезия (БА) — это воспалительная и фиброзирующая облитерация внепеченочных желчных протоков с постепенным вовлечением в процесс внутрипеченочной желчной системы и формированием цирроза печени. Заболевание чаще встречается в изолированной (несиндромальной/перинатальной) форме (85% случаев), реже — в синдромальной (эмбриональной) форме (10–15% случаев) и в 5–8% случаев выявляется кистозная форма. Частота встречаемости БА в популяции колеблется в различных странах от 1 : 8000 (в Азии и Африке)

до 1 : 18 000 (в Европе), среди больных преобладают девочки [1, 2]. Клинически заболевание проявляется неонатальным холестазом. При этом дифференциальная диагностика включает обширную группу врожденных и наследственных заболеваний, многие из которых в течение первых месяцев жизни протекают под видом БА [3, 4]. Диагноз подтверждают морфологическим исследованием биоптатов печени и желчного протока во время операции. Хирургическая коррекция (гепатопортоэнтеростомия по Касаи, КРЕ) и трансплантация печени позволяют

улучшить общую выживаемость детей с БА до 90% [4–6]. Однако причины развития БА, а также предпосылки, определяющие исход лечения, на сегодняшний день остаются малоизученными.

Этиология заболевания

Перед ознакомлением с исследованиями генетических механизмов, связанных с развитием БА и влиянием на исход лечения стоит кратко упомянуть о других факторах, вовлеченных в патогенез БА, — иммунной дисрегуляции и факторах окружающей среды (вирусах, токсинах).

Существует множество данных об этиологических факторах, среди которых важная роль принадлежит факторам иммунной дисрегуляции. БА — это фибровоспалительное заболевание, характеризующееся инфильтрацией воспалительными клетками, избыточной экспрессией цитокинов и/или хемокинов при морфологическом исследовании биоптатов печени больных. Ключевое звено в иммунопатогенезе БА — врожденный иммунный ответ с активацией NK-клеток и субпопуляции Т-хелперов 1-го типа, известный как Th1-тип ответ адаптивного иммунитета с привлечением эффекторных Т-клеток, ведущий к воспалению и обструкции [7]. При этом наблюдается снижение количества Treg-клеток, оказывающих супрессорный эффект на воспаление. После возникновения обструкции, независимо от восстановления оттока желчи, иммуноопосредованное повреждение желчных путей сохраняется [8] в результате активации Th2- и Th17-ответа. Тем не менее рецидивы после трансплантации печени отсутствуют, как это происходит при других иммунных заболеваниях желчных протоков [9].

Вирусное или токсическое воздействие на эпителий желчных протоков потенциально может приводить к появлению новых эпитопов антигенов, которые будут инициировать или усиливать аутоиммунное воспаление [8, 10]. Среди возможных патогенных вирусов рассматриваются: ЦМВ, ВПЧ, вирус герпеса 6-го типа, ЭБВ, реовирус и ротавирус [11]. Во многих исследованиях, в которых использовался метод ПЦР (на вирусные ДНК/РНК) или иммуноокрашивание на вирусные IgM+ или на белок Мх, в некоторых, но не во всех, образцах тканей печени обнаруживались следы перенесенной вирусной инфекции [12, 13]. В настоящее время нет четких доказательств развития БА вследствие вирусной инфекции из-за противоречивых результатов исследований с отсутствием контрольных образцов, методологических неточностей и неоднозначной интерпретации данных [10, 11, 14]. Парадоксально, но БА не развивается у взрослых, зараженных этими вирусами. Убедительным остается тот факт, что наличие вирусной инфекции отягощает течение БА и повышает вероятность неблагоприятного исхода [12, 13, 15].

Среди экзогенных токсинов, которые могут быть триггерными факторами в развитии атрезии желчных путей у животных, в Австралии был выявлен растительный изофлавоноид билиатрезон, содержащийся в растениях, употребляемых скотом в условиях засухи [16]. У личинок рыб *Danio rerio* (Zebrafish) — классического модельного объекта биологических исследований — билиатрезон вызывает разрушение внепеченочных желчных протоков, но не внутрипеченочных [17]. Несмотря на то что человек не подвергается воздействию билиатрезона, распознавание ключевых механизмов повреждения желчных протоков может привести к раскрытию токсинов, имеющих отношение к человеку.

Генетические факторы и БА

В современной литературе появляется все больше данных о том, что пациенты с БА имеют генетическую предрасположенность к развитию и течению заболевания. Наследование БА не подчиняется законам Менделя. По этой причине заболевание не наследуется генетически, хотя несколько таких случаев и было описано [18]. Высокая заболеваемость БА в ряде регионов Азии наводит на мысль о большем распространении в этих популяциях генетических вариантов, ассоциированных с БА, однако не стоит исключать и особенности внешней среды (питание, вирусную нагрузку и др.) и отличия в диагностических критериях, используемых азиатскими специалистами [19].

Близнецы с БА

Далее мы рассмотрим гены, которые могут быть вовлечены в развитие атрезии желчных путей. Стоит остановиться на интригующих результатах, представленных в метаанализе, опубликованном в 2020 г.: авторы просуммировали общемировые данные по известным клиническим случаям рождения близнецов с БА и обнаружили, что из 35 известных пар (19 монозиготных, 15 дизиготных, одной неизвестной), конкордантной по БА была только одна пара (дизиготная), а остальные оказались дискордантными, т. е. БА была диагностирована только у одного из близнецов (97,1%) [20]. В ретроспективном наблюдении китайских исследователей тоже сообщается о 19 парах близнецов с БА, которые абсолютно все были дискордантными по БА (8 монозиготных и 11 дизиготных) [21].

Дискордантность близнецов по БА наводит на мысль, что в развитии заболевания наследственные факторы не являются доминирующими, ведь, как правило, монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип. При этом поражение инфекционным или токсическим агентом скорее должно было бы затрагивать обоих близнецов в утробе матери и приводить к развитию заболевания. Среди известных случаев токсических или инфекционных эмбриопатий конкордантность для близнецов (особенно монозиготных) составляет около 80% [22]. Известно, что помимо изменений непосредственно в нуклеотидной последовательности гена на фенотип могут оказывать влияние их эпигенетические модификации, имеющие неклассический характер наследования. Так, у монозиготных дискордантных близнецов с БА были фенотипические различия, что повышает вероятность вклада эпигенетических факторов в патогенез БА [20].

Не стоит также исключать вероятность возникновения постзиготических соматических патогенных вариантов у одного из близнецов в генах, регуляторных областях и т. п., предположительно запускающих облитерирующую холангиопатию. Гипотеза о развитии БА вследствие соматической мутации (более корректно употреблять термин «патогенный вариант») была выдвинута в 2016 г., и для ее проверки авторы предлагают проанализировать ДНК тканей печени, билиарного тракта больных и геномы их родителей [22].

Гены-кандидаты БА

Генетические подходы к пониманию БА включают анализ генов-кандидатов, исследование числа копий генов (CNV, copy number variation), полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, genome-wide association studies),

Таблица. Гены-кандидаты, ассоциированные с БА по результатам GWAS

Локус	Этническая группа	Вариант	Ген-кандидат	GWAS
2q37.3	Европеоидная	Гетерозиготная делеция	<i>GPC1/AGXT</i>	23/24
14q21.3	Европеоидная	Некодирующий ОНП	<i>ARF6</i>	25
10q24.2	Ханьская/тайская	Некодирующий ОНП	<i>ADD3/XPNPEP1</i>	26/27/28
2p.16.1	Европеоидная	Некодирующий ОНП	<i>EFEMP1</i>	29

Примечание: ОНП — однонуклеотидный полиморфизм.

секвенирование экзома (WES, whole exome sequencing). При GWAS оценивают связь между заболеванием и распространенными генетическими вариантами в разных популяциях исследуемой группы пациентов и в контрольной здоровой. В таблице представлены некоторые ассоциированные с БА гены-кандидаты, выявленные в различных GWAS.

Гены *GPC1*, *AGXT* в развитии БА

В одном из GWAS, у двух из 35 неродственных детей с подтвержденной БА (против контрольной группы 2026 здоровых человек) была обнаружена гетерозиготная делеция на участке 2q37.3 хромосомы [23]. Перекрывающийся у обоих пациентов делетированный регион (1,76 млн п.о.) состоял из 30 генов, среди которых авторы выделили ген-кандидат *AGXT*, экспрессирующийся в печени. Этот ген кодирует аланинглиоксилатаминотрансферазу (*AGXT*) — фермент пероксисом гепатоцитов, играющий роль в метаболизме токсических веществ и расщеплении жиров. Можно предположить, что снижение активности *AGXT*, участвующей в детоксикации, имеет важное значение в контексте гипотезы о том, что опосредованное токсином повреждение билиарного тракта вовлечено в патогенез БА. Авторы подробно описывают двух пациентов с делецией 2q37.3. В одном случае женщина во время беременности работала в клининговой компании и часто контактировала с потенциально токсичными химическими средствами. Вторая перенесла ветряную оспу на 15-й неделе беременности, и ей проводили лечение ацикловиром, который проникает через плацентарный барьер и метаболизируется в клетках печени. Однако отец одного из пациентов тоже являлся носителем делеции 2q37.3, но не имел заболеваний печени. Следовательно, наличие гетерозиготной делеции 2q37.3 можно рассматривать в качестве фактора, предрасполагающего к развитию БА, возможно в результате биотрансформации ксенобиотиков.

В другом исследовании те же авторы увеличили выборку до 61 пациента с БА против 5088 здоровых человек группы контроля [24]. Делеции того же участка 2q37.3 различной протяженности были найдены у шести пациентов (9,84%) и четырех здоровых человек (0,08%), но в этот раз в ассоциированном регионе с делецией находился только один ген *GPC1*, кодирующий глипикан, снижающий активность Hedgehog-сигналинга и участвующий в реакциях воспаления. У рыбок *Danio rerio* отсутствие экспрессии гена *gpc1* сверхактивировало Hedgehog-сигналинг, что приводило к нарушению формирования билиарного тракта, уменьшению размеров желчного пузыря и плохой экскреции желчи из печени. В образцах пациентов с БА наблюдали снижение *GPC1* в апикальной поверхности холангиоцитов. Авторы заключают, что ген *GPC1*, по-видимому, является геном восприимчивости к БА.

В исследовании «случай-контроль» авторы из Китая доложили о предположительной ассоциации

со снижением риска БА на 50% у пациентов, имеющих следующие гаплотипы по гену *GPC1*: $C_{rs2292832}-C_{rs3828336}$ или $T_{rs3828336}-T_{rs2292832}$ [30].

Гены *ADD3* и *XPNPEP1* в развитии БА

В самом первом GWAS в китайской популяции было проанализировано 500 000 олигонуклеотидных повторов (ОНП) у 200 пациентов с БА и контрольной группы, состоящей из 481 здорового человека [26]. Наиболее значимая ассоциация была выявлена для rs17095355, расположенного в локусе 10q24.2 между генами X-пролиламинопептидазы Р (*XPNPEP1*) и аддукцина 3 (*ADD3*). Авторы, однако, не смогли установить, как этот межгенный вариант может влиять на чувствительность к БА, но предположили, что затронута регуляция соседних генов.

ADD3 кодирует белок аддукцин 3, который относится к семейству мембранных скелетных белков, участвующих в актин-спектриновых взаимодействиях в эритроцитах и межклеточных контактах эпителиальных тканей, включая органы желудочно-кишечного тракта, печень и билиарный тракт [31, 32]. Экспрессия *ADD3* наиболее выражена в эпителиальных клетках печени и желчных путей у плода по сравнению со взрослым человеком [32]. Сокращения канальцевых мембран желчных протоков, способствующие оттоку желчи, находятся под контролем актин-миозиновых взаимодействий. Важно заметить, что нарушение этих взаимодействий в эксперименте с использованием лекарственных препаратов приводило к тяжелому холестазу [33]. Повышенное отложение актина и миозина вокруг желчных канальцев наблюдали и у пациентов с БА, у которых после операции был нарушен отток желчи [34]. Кроме того, интенсивность экспрессии α -гладкомышечного актина коррелирует со степенью фиброза у пациентов с БА [35].

Экспрессия *XPNPEP1* происходит в эпителиальных клетках гепатобилиарной системы [36] и кодирует растворимую X-пролиламинопептидазу Р или растворимую аминопептидазу Р (*APP1*). Фермент *APP1* участвует в расщеплении брадикинина (БК) и субстанции Р (SP) [37]. Брадикинин принимает участие в вазодилатации и проницаемости капилляров, его экспрессию напрямую регулирует нуклеарный рецептор желчной кислоты FXR (фарнезоид-X-рецептор), играющий роль в регуляции метаболизма и секреции желчных кислот, а также процессов воспаления [38–39]. В регуляции секреции желчи, динамики желчевыводящих путей и иннервации печени участвует также медиатор воспаления SP. Роль гепатобилиарных переносчиков (в частности FXR) была изучена на мышиных моделях [40].

Это исследование вызвало повышенный интерес к локусу 10q24.2. Было выполнено несколько исследований по его изучению в разных популяциях [41–46]. Интересно, что упомянутый полиморфизм rs17095355 был статистически достоверно ассоциирован с БА и в тайской когорте [42].

Однако в работе, проведенной на группе североамериканских пациентов, ассоциации rs17095355 с БА не было выявлено, но отмечена связь БА с другим ОНП (rs7099604), локализованным в первом интроне *ADD3* [41]. При помощи количественной ПЦР были обнаружены различия в дифференциальной экспрессии гена *ADD3*, но не *XPNPEP1*, в тканях печени у больных и здоровых, при этом никаких особенностей в нуклеотидной последовательности гена *ADD3* между группами выявлено не было. Поэтому не исключено, что у больных могут быть различия в регуляторных некодирующих участках ДНК или эпигенетические изменения.

В 2020 г. была повторно продемонстрирована ассоциация с БА трех ОНП в гене *ADD3* (rs17095355, rs10509906 и rs2501577), двух ОНП в гене *GPC1* (rs6750380 и rs6707262) в группе пациентов из Китая ($n = 340$) [59].

В 2019 г. создана первая модель БА с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) [60]. Полученные из образцов крови пациентов с БА иПСК *in vitro* вновь дифференцировались в патологичные холангиоциты с признаками фиброза. Используя технологию CRISPR/Cas9, авторы внедрили ОНП в генах *GPC1* и *ADD3*, ассоциированные с БА, в здоровую человеческую линию иПСК и индуцировали билиарную дифференцировку. Эти клетки воспроизвели патологическое развитие холангиоцитов как иПСК пациентов с БА. Модель БА на иПСК имеет большие перспективы для дальнейшего изучения патогенеза БА.

Ген *ARF6* в развитии БА

В 2015 г. была выявлена ассоциация риска развития БА и ОНП rs3126184 и rs10140366 в гене *ARF* (аденозиндифосфатрибозилирующий фактор), расположенном в локусе 14q21.3 [25]. Минорные аллели этих полиморфизмов связаны с пониженной экспрессией *ARF6*.

Гены *ARF6*, *GPC1* и *ADD3* имеют схожие функции в формировании и развитии билиарного тракта. *GPC1* и *ARF6* задействованы в сигналинге фактора роста фибробластов (FGF) и эпидермального фактора роста (EGF), важных в органогенезе. Так же как и ген *ADD3*, *ARF6* участвует в ремоделировании актинового цитоскелета, влияет на подвижность клеток, межклеточные контакты. *ARF6* активируется при связывании с рецептором EGF (EGFR) с его активатором GEP100, который в свою очередь последовательно запускает остальные реакции. Дальнейшая активация EGFR-GEP100-ARF6 приводит к активации сигнального каскада ERK/MAPK и CREB, что в итоге влияет на нормальное клеточное развитие и пролиферацию [49–52].

В настоящее время нет единой точки зрения, являются ли изменения во внутрипеченочных желчных протоках вторичными или формируются независимо. Так, четырем детям с ранним постнатальным диагнозом БА в первые дни после рождения была проведена серия биопсий, на которой выявлена недостаточность внутрипеченочных желчных протоков без признаков фиброза и цирроза печени, всегда обнаруживаемых при выполнении портоэнтеростомии по Касаи или трансплантации печени [53]. Еще в 1974 г. Landing выдвинул гипотезу о том, что при обструктивных холангиопатиях в патологический процесс вовлечено все билиарное дерево: будут в большей степени вовлечены внутри- или внепеченочные протоки, зависит от времени и характера повреждающего воздействия [54].

При нокдауне *arf6* у личинок рыбок *Danio rerio* были отмечены уменьшение размеров печени и числа билиарных эпителиальных клеток, нарушение секреции желчи и развития как вне-, так и внутрипеченочных желчных протоков. Схожие эффекты наблюдали и при введении ингибитора EGFR. Авторы констатируют, что сигнальный путь EGFR-Arf6 может регулировать морфогенез внутрипеченочных желчных протоков [25].

Так, в двух из 29 биоптатов печени пациентов с БА было выявлено слабое иммуноокрашивание на *ARF6* и отмечено снижение количества внутрипеченочных желчных протоков с признаками фиброза. На основании этих данных авторы предположили, что снижение экспрессии *ARF6* способствует нарушению формирования не только внепеченочных желчных протоков, но и внутрипеченочных [25].

Ген *EFEMP1* в развитии БА

Был установлен новый локус восприимчивости к БА — участок 2p.16.1 как среди детей с изолированной формой БА, так и среди тех, у кого БА сочеталась с другими аномалиями [55]. В этом локусе в пятом интроне гена *EFEMP1* обнаружили три БА-ассоциированных ОНП: rs10865291, rs6761893 и rs727878. Количество транскриптов *EFEMP1* было выше в тканях печени (преимущественно в холангиоцитах и портальных фибробластах), не только при БА, но и при других холестатических заболеваниях по сравнению с группой контроля.

Ген *EFEMP1* кодирует фибулин-3, принимающий участие в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, в регенерации тканей и органогенезе [56, 57]. Кроме того, *EFEMP1* активирует сигнальный путь Notch *in vitro*, хотя и с меньшей эффективностью, чем *JAG1* [58]. Известно, что фибулины тесно взаимодействуют с ламининами и другими экстрацеллюлярными протеинами. Учитывая тесную связь и близость развивающихся желчных протоков с экстрацеллюлярным матриксом портальной мезенхимальной ткани, можно предположить, что белок EFEMP1 участвует в развитии билиарного тракта.

Однако в 2020 г. в исследовании группы пациентов с БА из Китая не было обнаружено ассоциации с генами *EFEMP1* и *ARF6* [59].

Гены *STIP1* и *REV1* в развитии БА

В 2020 г. при проведении трио-анализов экзому в 30 семьях с БА у детей были идентифицированы в 66 генах 66 вариантов *de novo*, среди которых авторы выделили потенциально патогенные в генах *STIP1* и *REV1* [61]. Белки этих генов взаимодействуют с белком теплового шока HSP90 и участвуют в стресс-ответах. Другие авторы провели эксперименты по введению мутаций в гены *stip1* и *rev1* с помощью CRISPR/Cas9 у рыбок *Danio rerio* и подвергли их воздействию билиатрезона: мутантные рыбки оказались чувствительны к низким дозам, в отличие от рыбок дикого типа [62]. Нокдаун этих генов в клетках холангиоцитов *in vitro* и воздействие на них билиатрезон приводили к нарушениям цитоскелета. Данные результаты подкрепляют гипотезу о вкладе окружающей среды в развитие БА у генетически восприимчивых людей.

Гены ресничек холангиоцитов в развитии БА

В 2020 г. были проведены трио-WES-исследования в 89 семьях с БА у детей [63]. Авторы обнаружили у 31,5%

пациентов редкие патогенные *de novo* варианты в генах ресничек холангиоцитов, среди которых выделили три гена-кандидата — *KIF3B*, *PCNT* и *TTC17*. Число белков KIF3B и TTC17 в тканях печени пациентов с мутациями в соответствующих генах было снижено. Нокаут *kif3b*, *pcnt* и *ttc17* с помощью CRISPR/Cas9-системы редактирования у личинок *Danio rerio* привел к нарушению у них оттока желчи. Авторы предполагают, что дефектные реснички могут гиперактивировать Hedgehog-сигналинг, либо желчь повреждает аномальные холангиоциты, что также повышает Hh-сигналинг и ведет к воспалению и фиброгенезу.

Генетические факторы, влияющие на прогноз БА

Индивидуальные генетические особенности каждого больного могут значительно влиять на клиническую тяжесть заболевания, и, несмотря на фенотипическую гетерогенность БА, довольно мало исследований посвящено изучению генетических факторов, которые оказывали бы влияние на исход хирургического лечения — портоэнтеростомии Касаи. По данным некоторых авторов, на исход операции могут влиять такие гены, как *A1AT*, *JAG1*, *CFTF* [64–68].

Дефицит α 1-антитрипсина вызывает моногенное аутосомно-рецессивное заболевание (генотип ZZ по гену *A1AT*), приводящее к патологии печени у детей. Показано, что патологические аллели Z, S и др. (в гетерозиготном состоянии) встречаются чаще у детей с хроническими заболеваниями печени ($n = 241$), в том числе и с БА ($n = 67$), чем в общей популяции [69]. При этом с такими генотипами больным БА детям потребовалась трансплантация печени раньше, чем детям с БА с нормальным генотипом MM.

В Таиланде был проведен WES-анализ ДНК, выделенной из печени при биопсии у 20 пациентов с БА после проведения портоэнтеростомии [70]. Только у семи пациентов после операции отмечалось купирование желтухи, у троих было частичное улучшение и у 10 пациентов операция оказалась неэффективной. У пациентов с БА были выявлены 13 редких вариантов в девяти генах, ответственных за известные заболевания, в том числе холестатические (но клинических признаков этих болезней диагностировано не было): *JAG1* (синдром Алажилль, AGS); *MYO5B* (врожденная атрофия микроворсинок/прогрессирующий внутрипеченочный холестаз тип 6); *ABCB11* (семейный внутрипеченочный холестаз тип 2); *ABCC2* (синдром Дубина–Джонса); *ERCC4* (анемия Фанкони); *KCNH1* (синдром Циммермана–Лабанда); *MLL2* (синдром Кабуки); *RFX6* (синдром Митчелла–Рейя) и *UG1A1* (синдром Криглера–Найяра тип I). Авторы предполагают, что БА и другие заболевания печени могут иметь общий этиопатогенез. Наличие данных ассоциаций определяет тяжесть состояния и неблагоприятный прогноз жизни пациентов с БА с нативной печенью.

Выявлена миссенс-мутация в гене *JAG1* у девяти из 102 пациентов с БА, при этом характерных фенотипических проявлений синдрома Алажилль не было [71]. Согласно мнению авторов, у детей с таким вариантом прогноз заболевания и исход портоэнтеростомии был хуже. Однако проведенные недавно исследования показали, что синдром Алажилля (AGS) может проявляться клиническими признаками БА: у пяти детей с диагностированной в младенчестве БА и патогенными вариантами в гене *JAG1* к трем годам развился типичный симптомокомплекс AGS [72].

Влияние гепатоцеллюлярных транспортеров и ядерных рецепторов желчных кислот на исход портоэнтеростомии

За последнее десятилетие накоплено большое количество данных, которые описывают компенсаторные возможности печени при холестазах благодаря регуляции активности гепатоцеллюлярных транспортеров (BSEP, MDR1, MDR3, OSTb) и ядерных рецепторов желчных кислот (ЖК) (FXR, PXR, CAR) [73–75].

Печень хорошо адаптируется к накоплению желчных кислот. Установлено, что у здоровых детей генетически обусловленный дефицит этих рецепторов не имеет клинического значения за счет существующих компенсаторных механизмов. Однако при наличии холестатических заболеваний, включая БА, данные изменения могут стать дополнительными факторами, влияющими на течение патологического процесса. При нормальном функционировании гепатоцеллюлярных транспортеров гепатоциты защищены от токсического действия ЖК благодаря их выведению BSEP-транспортером, а билиарный эпителий защищен благодаря основным транспортерам FIC1 и MDR3 [76].

С учетом этих данных на сегодняшний день проведены исследования по оценке уровня экспрессии печеночных нуклеарных факторов и гепатоцеллюлярных транспортеров как предикторов исхода КРЕ у детей с БА.

Обнаружено, что в группе пациентов с неблагоприятным исходом КРЕ в тканях печени экспрессия генов рецепторов PXR и/или CAR значительно ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом. Из шести пациентов с пониженной экспрессией обоих генов у пяти потребовалась трансплантация печени в возрасте до года (7–11 месяцев) [75]. Ранее было также показано, что у крыс, нокаутных по Pxr, повреждение печени от накопления ЖК было значительно выше, чем у здоровых [77, 78]. Полагают, что низкий уровень CAR и PXR у пациентов может быть связан как с генетическими факторами, так и с воспалительными процессами. Установлено, что эти ядерные рецепторы ЖК принимают участие в регуляции гомеостаза желчи путем связывания с ЖК, транспортируются в ядро и снижают экспрессию генов ферментов, синтезирующих и реабсорбирующих ЖК, но при этом усиливают экспрессию генов, кодирующих транспортеры BSEP, MRP4 и OST α -OST β , выводящих ЖК из гепатоцита [79–90].

Был проведен WES-анализ для поиска генетических вариантов, встречающихся чаще среди пациентов с БА, которым потребовалась ранняя трансплантация печени вследствие неэффективности КРЕ по сравнению с детьми, у которых функционировала нативная печень [91]. Среди 98 детей, которым потребовалась ранняя трансплантация печени, несинонимичный вариант p.A934T в гене *ABCB4* обнаруживали чаще, чем в группе детей ($n = 97$) с нативной печенью после портоэнтеростомии. Понижение экспрессии *ABCB4*, кодирующего MDR3, приводит к уменьшению концентрации фосфолипидов в желчи, вследствие чего ЖК могут повреждать холангиоциты.

В 2020 г. при полнотранскриптомном секвенировании мРНК 25 образцов печени больных БА [92] анализ дифференциальной экспрессии выявил потенциальные детерминанты исхода КРЕ: матричную металлопротеиназу 7 (MMP7) и фосфоенолпируваткарбоксикиназу (PCK1). Фермент MMP7 ремоделирует внеклеточный матрикс во время фиброза печени; PCK1 принимает участие в

глюконеогенезе, про его роль при БА известно меньше. Экспрессия *MMP7* была значительно выше у пациентов, у которых не прошла желтуха после КРЕ, а также у пациентов с терминальной стадией заболевания печени. Напротив, уровень экспрессии *PCSK1* был выше у пациентов с благоприятным исходом КРЕ, в то время как у пациентов с плохим прогнозом КРЕ наблюдалось его значительное снижение.

Так, паттерны экспрессии различных генов в тканях печени и желчных протоков могут быть потенциально использованы в качестве биомаркеров для прогнозирования исхода КРЕ, что позволило бы врачам разрабатывать новые стратегии лечения БА.

Эпигенетические факторы и БА

В основе патогенеза БА могут лежать и эпигенетические модификации (например, метилирование ДНК, модификации гистонов, экспрессия некодирующих РНК и др.). Метилирование ДНК было значительно снижено в клетках желчных протоков пациентов с БА по сравнению с пациентами с другими холестатическими заболеваниями печени [93]. Это могло приводить к активации *IFN*-сигналинга и началу воспаления. Ранее были также отмечены различные эпигенетические модификации в периферических лейкоцитах (например, $CD4^+ T$, T_{reg}) у некоторых пациентов с БА [94–97].

Показано, что гипометилированный ген фактора роста тромбоцитов *A PDGFA* избыточно экспрессируется в биоптатах печени больных, вероятно, участвуя в патогенезе БА [98]. Белки семейства PDGF индуцируют пролиферативные и фиброзные патологии во многих органах. Так, вариант rs9690350 (G>C) в *PDGFA* был связан

с повышенным риском БА в группе 506 пациентов с БА против 1473 здоровых [99].

Уровни экспрессии некоторых микроРНК в печени различались у больных БА и в группе здоровых людей. Например, *mir-29b* и *mir-142-5p* избыточно экспрессировались в печени при БА, при том что они нацелены на гены ключевых ферментов DNMT1 и DNMT3, вовлеченных в метилирование ДНК [100]. Другая микроРНК *mir-145-5p* нацелена на ген *ADD3*, ее экспрессия была пониженной в тканях печени некоторых больных БА [101].

Выводы

Несмотря на многолетние исследования, этиология БА остается малоизученной. Проведенные исследования в области генетики не выявили уникальных изменений, характерных для данного заболевания. Вероятно, что его развитие мультифакторное и включает в себя изменения в генетическом аппарате (наследственные или соматические мутации), а также эпигенетические механизмы, возникающие как вследствие генетических изменений, так и под воздействием факторов окружающей среды (токсинов, вирусов).

Хирургическое лечение БА (гепатопортоэнтеростомия по Касаи), предложенное еще в 1955 г., позволяет сохранить функциональное состояние печени и отсрочить проведение трансплантации. В настоящее время факторы, влияющие на эффективность данной операции и выживаемость пациентов с нативной печенью, плохо изучены. Генетические особенности каждого больного и уровень экспрессии различных генов в тканях печени и желчных протоков рассматриваются в качестве прогностических биомаркеров, однако требуются дальнейшие подтверждающие исследования.

Литература

1. Davenport M, et al. Biliary atresia in England and Wales: results of centralization and new benchmark. *Journal of Pediatric Surgery*. 2011; 46 (9): 1689–94.
2. Tiao MM, et al. Epidemiological features of biliary atresia in Taiwan, a national study 1996–2003. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008; 23 (1): 62–66.
3. Волюнец Г. В. и др. Дифференциальная диагностика врожденных холестатических болезней у детей. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017; 8 (144): 67–74.
4. Филиппова Е. А. и др. Эхографические изменения органов брюшной полости у детей с билиарной атрезией и синдромом Алажиля в течение первых 3 месяцев жизни. Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. 2017; 4, 93.
5. Разумовский А. Ю., Дегтярева А. В., Куликова Н. В., Рачков В. Е., Ратников С. А., Филиппова Е. А. и др. Отдаленные результаты лечения детей с билиарной атрезией. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2019; 64 (1): 46–55.
6. Козлов Ю. А. и др. Современный взгляд на происхождение билиарной атрезии. *Анналы хирургии*. 2017; 22 (2): 73–80.
7. Ortiz-Perez A, et al. Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 329.
8. Lampela H, et al. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia. *Journal of clinical gastroenterology*. 2014; 48 (8): 721–8.
9. Soufi N, Bazerbachi F, Deneau M. Post-transplant disease recurrence in pediatric PSC. *Current gastroenterology reports*. 2018; 20 (9): 44.
10. Vij M, Rela M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis. *Future Science OA*. 2020; 00: FSO466. <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/foa-2019-0153>
11. Averbukh LD, Wu GY. Evidence for viral induction of biliary atresia: a review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2018; 6 (49): 410.
12. Rauschenfels S, et al. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *European journal of pediatrics*. 2009; 168 (4): 469–76.
13. Zani A, et al. Cytomegalovirus-associated biliary atresia: an aetiological and prognostic subgroup. *Journal of pediatric surgery*. 2015; 50 (910): 1739–45.
14. Sergi CM. Genetics of biliary atresia: a work in progress for a disease with an unavoidable sequela into liver cirrhosis following failure of hepatic portoenterostomy. *Liver Cirrhosis-Debates and Current Challenges*. IntechOpen, 2019. Доступно по ссылке: <https://www.intechopen.com/books/liver-cirrhosis-debates-and-current-challenges/genetics-of-biliary-atresia-a-work-in-progress-for-a-disease-with-an-unavoidable-sequela-into-liver>.
15. Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2016; 73: 1–9.
16. Lorent K, et al. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia. *Science translational medicine*. 2015; 7 (286): 286ra67–286ra67.
17. Zhao X, et al. Glutathione antioxidant pathway activity and reserve determine toxicity and specificity of the biliary toxin biliatresone in zebrafish. *Hepatology*. 2016; 64 (3): 894–907.
18. Kobayashi K, et al. Mother-to-daughter occurrence of biliary atresia: a case report. *Journal of pediatric surgery*. 2008; 43 (8): 1566–8.
19. Girard M, Panasyuk G. Genetics in biliary atresia. *Current opinion in gastroenterology*. 2019; 35 (2): 73–81.
20. Xu X, Zhan J. Biliary atresia in twins: a systematic review and

- meta-analysis. *Pediatric Surgery International*, 2020. Доступно по ссылке: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00383-020-04690-4>.
21. Gou Q, et al. Biliary atresia in twins' population: a retrospective multicenter study in mainland China. *Pediatric Surgery International*. 2020; p. 1–8.
 22. Fabre A, Roman C, Roquelaure B. Somatic mutation, a cause of biliary atresia: A hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2017; 102: 91–93.
 23. Leyva-Vega M, et al. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37. 3. *American journal of medical genetics Part A*. 2010; 152 (4): 886–95.
 24. Cui S, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 1107–15.
 25. Ningappa M, et al. The role of ARF6 in biliary atresia. *PloS one*. 2015; 10 (9): e0138381.
 26. Garcia-Barceló MM, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24. 2. *Human molecular genetics*. 2010; 19 (14): 2917–25.
 27. Tsai EA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Human genetics*. 2014; 133 (2): 235–43.
 28. Kaewkiattiyot S, et al. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatology Research*. 2011; 41 (12): 1249–52.
 29. Chen Y, et al. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16. 1 within the gene EFEMP1. *PLoS genetics*. 2018; 14 (8): e1007532.
 30. Ke J, et al. Common genetic variants of GPC1 gene reduce risk of biliary atresia in a Chinese population. *Journal of pediatric surgery*. 2016; 51 (10): 1661–4.
 31. Citterio L, et al. Expression analysis of the human adducin gene family and evidence of ADD2 β 4 multiple splicing variants. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 309 (2): 359–67.
 32. Ku NO, et al. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999; 277 (6): G1108–G1137.
 33. Oshio C, Phillips MJ. Contractility of bile canaliculi: implications for liver function. *Science*. 1981; 212 (4498): 1041–2.
 34. Segawa O, et al. Actin and myosin deposition around bile canaliculi: a predictor of clinical outcome in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1993; 28 (6): 851–6.
 35. Shteyer E, et al. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2006; 42 (1): 93–99.
 36. Nagasaka T, et al. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reproduction, fertility and development*. 1997; 9 (8): 747–54.
 37. Hooper NM, et al. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. *Essays in Biochemistry*. 2002; 38: 169–83.
 38. Sharma JN. Hypertension and the bradykinin system. *Current hypertension reports*. 2009; 11 (3): 178–81.
 39. Zhao A, et al. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (31): 28765–70.
 40. Yang H, et al. Inflammation mediated down-regulation of hepatobiliary transporters contributes to intrahepatic cholestasis and liver damage in murine biliary atresia. *Pediatric research*. 2009; 66 (4): 380–5.
 41. Tsai EA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Human genetics*. 2014; 133 (2): 235–43.
 42. Kaewkiattiyot S, et al. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatology Research*. 2011; 41 (12): 1249–52.
 43. Cheng G, et al. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk. *Journal of hepatology*. 2013; 59 (6): 1285–91.
 44. Zeng S, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the ADD3 gene and susceptibility to biliary atresia. *PloS one*. 2014; 9 (10): e107977.
 45. Wang Z, et al. The intragenic epistatic association of ADD3 with biliary atresia in Southern Han Chinese population. *Bioscience reports*. 2018; 38 (3). Доступно по ссылке: <https://portlandpress.com/bioscierep/article/38/3/BSR20171688/57837/The-intragenic-epistatic-association-of-ADD3-with>.
 46. Laochareonsuk W, Chiengkriwate P, Sangkhathat S. Single nucleotide polymorphisms within Adducin 3 and Adducin 3 antisense RNA1 genes are associated with biliary atresia in Thai infants. *Pediatric surgery international*. 2018; 34 (5): 515–20.
 47. Jing Li, et al. Association between rs17095355 polymorphism on 10q24 and susceptibility to biliary atresia: a meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017; 30 (15): 1882–6.
 48. Tang, Vivian, et al. Loss of a candidate biliary atresia susceptibility gene, add3a, causes biliary developmental defects in zebrafish. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2016; 63 (5): 524.
 49. Iguchi H, et al. cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice. *Endocrine journal*. 2011; 1106100583–1106100583.
 50. Sarró E, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney international*. 2008; 73 (1): 77–85.
 51. Hu ZZ, et al. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells. *PloS one*. 2012; 7 (6): e38777.
 52. Sabe H, et al. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic*. 2009; 10 (8): 982–93.
 53. Azar G, et al. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2002; 34 (2): 212–5.
 54. Landing BH, Wells TR, Ramicone E. Time course of the intrahepatic lesion of extrahepatic biliary atresia: a morphometric study. *Pediatric pathology*. 1985; 4 (3–4): 309–19.
 55. Chen Y, et al. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16. 1 within the gene EFEMP1. *PLoS genetics*. 2018; 14 (8): e1007532.
 56. De Vega S, Iwamoto T, Yamada Y. Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66 (11–12): 1890–902.
 57. Timpl R, et al. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003; 4 (6): 479–89.
 58. Hu B, et al. Fibulin-3 promotes glioma growth and resistance through a novel paracrine regulation of Notch signaling. *Cancer research*. 2012; 72 (15): 3873–85.
 59. Bai MR, et al. Association of common variation in ADD3 and GPC1 with biliary atresia susceptibility. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (8): 7163.
 60. Tian L, et al. Biliary atresia relevant human induced pluripotent stem cells recapitulate key disease features in a dish. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2019; 68 (1): 56.
 61. Rajagopalan R, et al. exome Sequencing in individuals with isolated Biliary Atresia. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 1–8.
 62. Zhao X, et al. Impaired redox and protein homeostasis as risk factors and therapeutic targets in toxin-induced biliary atresia. *Gastroenterology*. 2020. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508520347545>.
 63. Lam WY, et al. Whole exome sequencing reveals a wide spectrum of ciliary gene mutations in nonsyndromic biliary atresia. *medRxiv*. 2020. Доступно по ссылке: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.05.20091504v1.full.pdf>.
 64. Petersen C, Davenport M. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? *Orphanet journal of rare diseases*. 2013; 8 (1): 128.
 65. Cui S, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 1107–15.
 66. Rock N, McLin V. Liver involvement in children with ciliopathies.

- Clinics and research in hepatology and gastroenterology. 2014; 38 (4): 407–14.
67. Miethke AG, Huppert SS. Fishing for biliary atresia susceptibility genes. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 878.
 68. Zhao D, Long XD, Xia Q. Recent advances in etiology of biliary atresia. *Clinical pediatrics*. 2015; 54 (8): 723–31.
 69. Campbell KM, et al. High prevalence of α -1-antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2007; 44 (1): 99–103.
 70. Sangkhathat S, et al. Variants associated with infantile cholestatic syndromes detected in extrahepatic biliary atresia by whole exome studies: a 20-case series from Thailand. *Journal of pediatric genetics*. 2018; 7 (2): 67.
 71. Kohsaka T, et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*. 2002; 36 (4): 904–12.
 72. Dedič T, et al. Alagille syndrome mimicking biliary atresia in early infancy. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0143939.
 73. Linton KJ. Lipid flopping in the liver. *Biochemical Society Transactions*. 2015; 43 (5): 1003–10.
 74. Groen A, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1927–37.
 75. Chen HL, et al. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia. *Pediatric research*. 2008; 63 (6): 667–3.
 76. Chen HL, et al. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *Journal of biomedical science*. 2018; 25 (1): 75.
 77. Wagner M, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology*. 2003; 125 (3): 825–38.
 78. Stedman CAM, et al. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102 (6): 2063–8.
 79. Wagner M, et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*. 2005; 42 (2): 420–30.
 80. Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *Journal of pharmacological sciences*. 2005; 97 (2): 177–83.
 81. Boyer JL. Nuclear receptor ligands: rational and effective therapy for chronic cholestatic liver disease? *Gastroenterology*. 2005; 129 (2): 735–40.
 82. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42 (4): 561–5.
 83. Schroeder RJ, et al. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273 (2): 1150–7.
 84. Guyot C, Stieger B. Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains. *Journal of hepatology*. 2011; 55 (6): 1368–76.
 85. Linton KJ. Lipid flopping in the liver. *Biochemical Society Transactions*. 2015; 43 (5): 1003–10.
 86. Groen A, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1927–37.
 87. Wang H, et al. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular cell*. 1999; 3 (5): 543–53.
 88. Parks DJ, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999; 284 (5418): 1365–8.
 89. Makishima M, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999; 284 (5418): 1362–5.
 90. Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear receptor signaling*. 2010; 8 (1): nrs. 08005. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1621/nrs.08005>.
 91. Mezina A, et al. 845 Whole Exome Sequencing Identifies ABCB4 Gene Variants As Modifiers of Biliary Atresia Outcomes. *Gastroenterology*. 2014; 146 (5): S-928.
 92. Ramachandran P, et al. RNA-seq reveals outcome-specific gene expression of MMP7 and PCK1 in biliary atresia. *Molecular biology reports*. 2019; 46 (5): 5123–30.
 93. Matthews RP, et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology*. 2011; 53 (3): 905–14.
 94. Dong R, Zhao R, Zheng S. Changes in epigenetic regulation of CD4⁺ T lymphocytes in biliary atresia. *Pediatric research*. 2011; 70 (6): 555–9.
 95. Dong R, et al. Abnormal DNA methylation of ITGAL (CD11a) in CD4⁺ T cells from infants with biliary atresia. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 417 (3): 986–90.
 96. Udomsinprasert W, et al. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Scientific reports*. 2016; 6: 26969.
 97. Li K, et al. Foxp3 promoter methylation impairs suppressive function of regulatory T cells in biliary atresia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016; 311 (6): G989–G997.
 98. Cofer ZC, et al. Methylation microarray studies highlight PDGFA expression as a factor in biliary atresia. *PloS one*. 2016; 11 (3): e0151521.
 99. Liu F, et al. PDGFA gene rs9690350 polymorphism increases biliary atresia risk in Chinese children. *Bioscience reports*. 202; 40 (7). Available from: <https://portlandpress.com/bioscierep/article/40/7/BSR20200068/225782/PDGFA-gene-rs9690350-polymorphism-increases>.
 100. Yang Y, et al. MicroRNA-29b/142-5p contribute to the pathogenesis of biliary atresia by regulating the IFN- γ gene. *Cell death & disease*. 2018; 9 (5): 1–9.
 101. Ye Y, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3. *PloS one*. 2017; 12 (9): e0180896.

References

1. Davenport M, et al. Biliary atresia in England and Wales: results of centralization and new benchmark. *Journal of Pediatric Surgery*. 2011; 46 (9): 1689–94.
2. Tiao MM, et al. Epidemiological features of biliary atresia in Taiwan, a national study 1996–2003. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008; 23 (1): 62–66.
3. Volynec GV, i dr. Differencial'naja diagnostika vrozhdennyh holesticheskih boleznej u detej. Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija. 2017; 8 (144): 67–74. Russian.
4. Filippova EA, i dr. Jehograficheskie izmenenija organov brjushnoj polosti u detej s biliarnoj atreziej i sindromom Alazhilja v techenie pervyh 3 mesjacev zhizni. *Pediatrija. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum*. 2017; 4, 93. Russian.
5. Razumovskij AYU, Degtjareva AV, Kulikova NV, Rachkov VE, Ratnikov S A, Filippova EA, i dr. Otdalennye rezul'taty lechenija detej s biliarnoj atreziej. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64 (1): 46–55. Russian.
6. Kozlov YuA, i dr. Sovremennij vzgljad na proishozhdenie biliarnoj atrezii. *Annaly hirurgii*. 2017; 22 (2): 73–80. Russian.
7. Ortiz-Perez A, et al. Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 329.
8. Lampela H, et al. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia. *Journal of clinical gastroenterology*. 2014; 48 (8): 721–8.
9. Soufi N, Bazerbachi F, Deneau M. Post-transplant disease recurrence in pediatric PSC. *Current gastroenterology reports*. 2018; 20 (9): 44.
10. Vij M, Rela M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis.

- Future Science OA. 2020; 00: FSO466. <https://www.future-science.com/doi/full/10.2144/fsoa-2019-0153>
11. Averbukh LD, Wu GY. Evidence for viral induction of biliary atresia: a review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2018; 6 (49): 410.
 12. Rauschenfels S, et al. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *European journal of pediatrics*. 2009; 168 (4): 469–76.
 13. Zani A, et al. Cytomegalovirus-associated biliary atresia: an aetiological and prognostic subgroup. *Journal of pediatric surgery*. 2015; 50 (910): 1739–45.
 14. Sergi CM. Genetics of biliary atresia: a work in progress for a disease with an unavoidable sequela into liver cirrhosis following failure of hepatic portoenterostomy. *Liver Cirrhosis-Debates and Current Challenges*. IntechOpen, 2019. Dostupno po ssylke: <https://www.intechopen.com/books/liver-cirrhosis-debates-and-current-challenges/genetics-of-biliary-atresia-a-work-in-progress-for-a-disease-with-an-unavoidable-sequela-into-liver>.
 15. Lakshminarayanan B, Davenport M. Biliary atresia: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2016; 73: 1–9.
 16. Lorent K, et al. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia. *Science translational medicine*. 2015; 7 (286): 286ra67-286ra67.
 17. Zhao X, et al. Glutathione antioxidant pathway activity and reserve determine toxicity and specificity of the biliary toxin biliatresone in zebrafish. *Hepatology*. 2016; 64 (3): 894–907.
 18. Kobayashi K, et al. Mother-to-daughter occurrence of biliary atresia: a case report. *Journal of pediatric surgery*. 2008; 43 (8): 1566–8.
 19. Girard M, Panasyuk G. Genetics in biliary atresia. *Current opinion in gastroenterology*. 2019; 35 (2): 73–81.
 20. Xu X, Zhan J. Biliary atresia in twins: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric Surgery International*, 2020. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00383-020-04690-4>.
 21. Gou Q, et al. Biliary atresia in twins' population: a retrospective multicenter study in mainland China. *Pediatric Surgery International*. 2020; p. 1–8.
 22. Fabre A, Roman C, Roquelaure B. Somatic mutation, a cause of biliary atresia: A hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2017; 102: 91–93.
 23. Leyva-Vega M, et al. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37. 3. *American journal of medical genetics Part A*. 2010; 152 (4): 886–95.
 24. Cui S, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 1107–15.
 25. Ningappa M, et al. The role of ARF6 in biliary atresia. *PloS one*. 2015; 10 (9): e0138381.
 26. Garcia-Barceló MM, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24. 2. *Human molecular genetics*. 2010; 19 (14): 2917–25.
 27. Tsai EA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Human genetics*. 2014; 133 (2): 235–43.
 28. Kaewkiattiyot S, et al. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatology Research*. 2011; 41 (12): 1249–52.
 29. Chen Y, et al. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16. 1 within the gene EFEMP1. *PLoS genetics*. 2018; 14 (8): e1007532.
 30. Ke J, et al. Common genetic variants of GPC1 gene reduce risk of biliary atresia in a Chinese population. *Journal of pediatric surgery*. 2016; 51 (10): 1661–4.
 31. Citterio L, et al. Expression analysis of the human adducin gene family and evidence of ADD2 β 4 multiple splicing variants. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 309 (2): 359–67.
 32. Ku NO, et al. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999; 277 (6): G1108–G1137.
 33. Oshio C, Phillips MJ. Contractility of bile canaliculi: implications for liver function. *Science*. 1981; 212 (4498): 1041–2.
 34. Segawa O, et al. Actin and myosin deposition around bile canaliculi: a predictor of clinical outcome in biliary atresia. *Journal of pediatric surgery*. 1993; 28 (6): 851–6.
 35. Shteyer E, et al. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2006; 42 (1): 93–99.
 36. Nagasaka T, et al. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reproduction, fertility and development*. 1997; 9 (8): 747–54.
 37. Hooper NM, et al. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. *Essays in Biochemistry*. 2002; 38: 169–83.
 38. Sharma JN. Hypertension and the bradykinin system. *Current hypertension reports*. 2009; 11 (3): 178–81.
 39. Zhao A, et al. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (31): 28765–70.
 40. Yang H, et al. Inflammation mediated down-regulation of hepatobiliary transporters contributes to intrahepatic cholestasis and liver damage in murine biliary atresia. *Pediatric research*. 2009; 66 (4): 380–5.
 41. Tsai EA, et al. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Human genetics*. 2014; 133 (2): 235–43.
 42. Kaewkiattiyot S, et al. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children. *Hepatology Research*. 2011; 41 (12): 1249–52.
 43. Cheng G, et al. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk. *Journal of hepatology*. 2013; 59 (6): 1285–91.
 44. Zeng S, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the ADD3 gene and susceptibility to biliary atresia. *PloS one*. 2014; 9 (10): e107977.
 45. Wang Z, et al. The intragenic epistatic association of ADD3 with biliary atresia in Southern Han Chinese population. *Bioscience reports*. 2018; 38 (3). Dostupno po ssylke: <https://portlandpress.com/bioscierep/article/38/3/BSR20171688/57837/The-intragenic-epistatic-association-of-ADD3-with>.
 46. Laochareonsuk W, Chiengkriwate P, Sangkhatthath S. Single nucleotide polymorphisms within Adducin 3 and Adducin 3 antisense RNA1 genes are associated with biliary atresia in Thai infants. *Pediatric surgery international*. 2018; 34 (5): 515–20.
 47. Jing Li, et al. Association between rs17095355 polymorphism on 10q24 and susceptibility to biliary atresia: a meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017; 30 (15): 1882–6.
 48. Tang, Vivian, et al. Loss of a candidate biliary atresia susceptibility gene, add3a, causes biliary developmental defects in zebrafish. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2016; 63 (5): 524.
 49. Iguchi H, et al. cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice. *Endocrine journal*. 2011; 1106100583-1106100583.
 50. Sarró E, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney international*. 2008; 73 (1): 77–85.
 51. Hu ZZ, et al. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells. *PloS one*. 2012; 7 (6): e38777.
 52. Sabe H, et al. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic*. 2009; 10 (8): 982–93.
 53. Azar G, et al. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2002; 34 (2): 212–5.
 54. Landing BH, Wells TR, Ramicone E. Time course of the intrahepatic lesion of extrahepatic biliary atresia: a morphometric study. *Pediatric pathology*. 1985; 4 (3–4): 309–19.
 55. Chen Y, et al. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16. 1 within the gene

- EFEMP1. *PLoS genetics*. 2018; 14 (8): e1007532.
56. De Vega S, Iwamoto T, Yamada Y. Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66 (11–12): 1890–902.
 57. Timpl R, et al. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003; 4 (6): 479–89.
 58. Hu B, et al. Fibulin-3 promotes glioma growth and resistance through a novel paracrine regulation of Notch signaling. *Cancer research*. 2012; 72 (15): 3873–85.
 59. Bai MR, et al. Association of common variation in ADD3 and GPC1 with biliary atresia susceptibility. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (8): 7163.
 60. Tian L, et al. Biliary atresia relevant human induced pluripotent stem cells recapitulate key disease features in a dish. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2019; 68 (1): 56.
 61. Rajagopalan R, et al. exome Sequencing in individuals with isolated Biliary Atresia. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 1–8.
 62. Zhao X, et al. Impaired redox and protein homeostasis as risk factors and therapeutic targets in toxin-induced biliary atresia. *Gastroenterology*. 2020. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508520347545>.
 63. Lam WY, et al. Whole exome sequencing reveals a wide spectrum of ciliary gene mutations in nonsyndromic biliary atresia. *medRxiv*. 2020. Dostupno po ssylke: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.05.20091504v1.full.pdf>.
 64. Petersen C, Davenport M. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? *Orphanet journal of rare diseases*. 2013; 8 (1): 128.
 65. Cui S, et al. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 1107–15.
 66. Rock N, McLin V. Liver involvement in children with ciliopathies. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2014; 38 (4): 407–14.
 67. Miethke AG, Huppert SS. Fishing for biliary atresia susceptibility genes. *Gastroenterology*. 2013; 144 (5): 878.
 68. Zhao D, Long XD, Xia Q. Recent advances in etiology of biliary atresia. *Clinical pediatrics*. 2015; 54 (8): 723–31.
 69. Campbell KM, et al. High prevalence of α -1-antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2007; 44 (1): 99–103.
 70. Sangkhathat S, et al. Variants associated with infantile cholestatic syndromes detected in extrahepatic biliary atresia by whole exome studies: a 20-case series from Thailand. *Journal of pediatric genetics*. 2018; 7 (2): 67.
 71. Kohsaka T, et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*. 2002; 36 (4): 904–12.
 72. Dđiđ T, et al. Lagille syndrome mimicking biliary atresia in early infancy. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0143939.
 73. Linton KJ. Lipid flopping in the liver. *Biochemical Society Transactions*. 2015; 43 (5): 1003–10.
 74. Groen A, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1927–37.
 75. Chen HL, et al. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia. *Pediatric research*. 2008; 63 (6): 667–3.
 76. Chen HL, et al. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *Journal of biomedical science*. 2018; 25 (1): 75.
 77. Wagner M, et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology*. 2003; 125 (3): 825–38.
 78. Stedman CAM, et al. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102 (6): 2063–8.
 79. Wagner M, et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*. 2005; 42 (2): 420–30.
 80. Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *Journal of pharmacological sciences*. 2005; 97 (2): 177–83.
 81. Boyer JL. Nuclear receptor ligands: rational and effective therapy for chronic cholestatic liver disease? *Gastroenterology*. 2005; 129 (2): 735–40.
 82. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014; 42 (4): 561–5.
 83. Schroeder RJ, et al. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273 (2): 1150–7.
 84. Guyot C, Stieger B. Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains. *Journal of hepatology*. 2011; 55 (6): 1368–76.
 85. Linton KJ. Lipid flopping in the liver. *Biochemical Society Transactions*. 2015; 43 (5): 1003–10.
 86. Groen A, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011; 141 (5): 1927–37.
 87. Wang H, et al. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular cell*. 1999; 3 (5): 543–53.
 88. Parks DJ, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999; 284 (5418): 1365–8.
 89. Makishima M, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999; 284 (5418): 1362–5.
 90. Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear receptor signaling*. 2010; 8 (1): nrs. 08005. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1621/nrs.08005>.
 91. Mezina A, et al. 845 Whole Exome Sequencing Identifies ABCB4 Gene Variants As Modifiers of Biliary Atresia Outcomes. *Gastroenterology*. 2014; 146 (5): S-928.
 92. Ramachandran P, et al. RNA-seq reveals outcome-specific gene expression of MMP7 and PCK1 in biliary atresia. *Molecular biology reports*. 2019; 46 (5): 5123–30.
 93. Matthews RP, et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology*. 2011; 53 (3): 905–14.
 94. Dong R, Zhao R, Zheng S. Changes in epigenetic regulation of CD4⁺ T lymphocytes in biliary atresia. *Pediatric research*. 2011; 70 (6): 555–9.
 95. Dong R, et al. Abnormal DNA methylation of ITGAL (CD11a) in CD4⁺ T cells from infants with biliary atresia. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 417 (3): 986–90.
 96. Udomsinprasert W, et al. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Scientific reports*. 2016; 6: 26969.
 97. Li K, et al. Foxp3 promoter methylation impairs suppressive function of regulatory T cells in biliary atresia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016; 311 (6): G989–G997.
 98. Cofer ZC, et al. Methylation microarray studies highlight PDGFA expression as a factor in biliary atresia. *PloS one*. 2016; 11 (3): e0151521.
 99. Liu F, et al. PDGFA gene rs9690350 polymorphism increases biliary atresia risk in Chinese children. *Bioscience reports*. 202; 40 (7). Available from: <https://portlandpress.com/bioscierep/article/40/7/BSR20200068/225782/PDGFA-gene-rs9690350-polymorphism-increases>.
 100. Yang Y, et al. MicroRNA-29b/142-5p contribute to the pathogenesis of biliary atresia by regulating the IFN- γ gene. *Cell death & disease*. 2018; 9 (5): 1–9.
 101. Ye Y, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3. *PloS one*. 2017; 12 (9): e0180896.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОФОНДОВ РУССКОГО И ФИННОЯЗЫЧНОГО НАСЕЛЕНИЯ ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТИ: АНАЛИЗ 4 МЛН SNP-МАРКЕРОВ

О. П. Балановский^{1,2,3} ✉, И. О. Горин^{1,2}, Ю. С. Записецкая², А. А. Голубева², Е. С. Кострюкова⁴, Е. В. Балановская^{2,3}

¹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

² Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

³ Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва, Россия

Генофонды популяций Тверской области (русских и карел) изучены по широкогеномной панели из 4 млн аутосомных SNP-маркеров, типированной на суммарной выборке из 41 образца. Эти данные по популяции тверских карел ($n = 11$) и русских из западных, центральных и восточных районов Тверской области ($n = 30$) проанализированы на широком фоне русских популяций соседних областей, карел Карелии и других популяций Северо-Восточной Европы с целью изучения феномена взаимопроникновения генофондов славянского и финноязычного населения. Такое изучение генофондов населения России по наиболее обширной из существующих широкогеномных панелей важно для каталогизации геномного разнообразия населения России и характеристики региональных генофондов и имеет практическое применение в фармакогеномике и судебной медицине. Методами главных компонент, ADMIXTURE, d- и f3-статистик показано, что генофонд тверских карел, несмотря на их проживание среди преобладающего русского населения в течение 3–5 веков и 20-кратное сокращение численности в течение последнего столетия, сохраняет наибольшую близость к генофонду карел Карелии. Но при этом генофонд тверских карел более сходен с русским генофондом, чем генофонд других карельских популяций. Сближение генофондов русских и карел Тверской области происходит за счет более интенсивного потока генов от русских к карелам и при малозаметном потоке генов от карел к русским: тверские русские оказались столь же генетически отличны от карел, как, например, псковские. Сходство тверских карел с карелами Карелии по аутосомным маркерам (при небольшом смещении в сторону русского генофонда) согласуется с опубликованными данными по Y-хромосоме (отсутствие детектированного смещения тверских карел с русскими).

Ключевые слова: широкогеномные панели, SNP-маркер, чип Illumina, генофонд, карелы, русские, Тверская область, центральная Россия

Благодарности: мы благодарим всех доноров образцов, которые принимали участие в данном исследовании, АНО «Биобанк Северной Евразии» за предоставление коллекций ДНК и члена-корреспондента РАН В. В. Напольских за консультации при интерпретации результатов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (Госконтракт # 011–17 от 26.09.2017) в рамках научно-технической программы Союзного государства «ДНК-идентификация» (работы по генотипированию), Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. Н. П. Бочкова (биоинформатический анализ данных), гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-09-00479 а (анализ генеалогической информации, интерпретация результатов, написание текста).

✉ **Для корреспонденции:** Олег Павлович Балановский
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; balanovsky@inbox.ru

Статья получена: 10.10.2020 **Статья принята к печати:** 27.10.2020 **Опубликована онлайн:** 25.11.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.072

INTERACTIONS BETWEEN GENE POOLS OF RUSSIAN AND FINNISH-SPEAKING POPULATIONS FROM TVER REGION: ANALYSIS OF 4 MILLION SNP MARKERS

Balanovsky OP^{1,2,3} ✉, Gorin IO^{1,2}, Zapisetskaya YuS², Golubeva AA², Kostryukova EV⁴, Balanovska EV^{2,3}

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

² Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

³ Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

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

This study explored the gene pools of Russian and Karelian populations of Tver region. Forty-one samples representing Tver Karels ($n = 11$) and Russians residing in the Western, Central and Eastern districts of Tver region ($n = 30$) were genotyped using a genome-wide panel of 4,559,465 SNPs. In order to investigate the phenomenon of genetic admixture between Slavic and Finnish-speaking populations, the obtained results were compared to the data on the Russian populations inhabiting the neighboring territories, Karels from Karelia and other North Eastern Europeans. Studying the gene pools of Russian populations with a genome-wide SNP panel is essential for cataloging their genetic diversity and identifying the distinct features of regional gene pools; in addition, it provides valuable data for practical pharmacogenomics and forensics. Using the principal component analysis, the ADMIXTURE method and D- and f3-statistics, we demonstrated that the gene pool of Tver Karels is closest to the gene pool of Karelian Karels, despite a long (300 to 500 years) history of living among the larger Russian population and the twentyfold population decline during the 20th century. At the same time, the gene pool of Tver Karels exhibits more pronounced similarity to the gene pool of the studied Russian populations than does any other Karelian population. The genetic admixture between Tver Russians and Tver Karels occurred due to a more intense gene flow from Russians to Karels whereas the gene flow from Karels to Russians was much weaker: Tver Russians turned out to be as genetically different from Karels as Pskov Russians. The genetic similarity of Tver Karels to Karelian Karels assessed with the autosomal SNP panel exhibits a slight shift towards the Russian gene pool and is consistent with the previously published analysis of Y-chromosome lineages in these populations that detected no admixture between Tver Karels and Russians.

Keywords: genome-wide genotyping, SNP, Illumina array, gene pool, Karelians, Russians, Tver region, Central Russia

Acknowledgement: we thank all the donors who took part in this study, the Biobank of North Eurasia for DNA collections and Napolskikh VV, the corresponding member of RAS, for his contribution to data interpretation.

Funding: the study was supported by the Russian Ministry and Science and Higher Education (Government Contract # 011–17 dated September 26, 2017). Genotyping and manuscript preparation were done under the *DNA-based identification* Research and Technology Project of the Union State. Bioinformatic analysis and interpretation of the obtained results were carried out under the State Assignment of the Russian Ministry of Science and Higher Education for Bochkov Research Centre for Medical Genetics.

✉ **Correspondence should be addressed:** Oleg P. Balanovsky
Gubkina, 3, Moscow, 119991; balanovsky@inbox.ru

Received: 10.10.2020 **Accepted:** 27.10.2020 **Published online:** 25.11.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.072

Тверь и ее окрестности, лежащие на границе центральной и северо-западной России, играли важную роль не только в истории русского народа, но и в его взаимодействии с западным финноязычным населением. До славянской колонизации этот регион населяли финно-угорские племена, в основном меря, но с середины I тысячелетия его стали интенсивно осваивать славяне. В начале XII в. в устье Тверцы был известен крупный торгово-ремесленный посад, а с середины XIII в. Тверь стала одним из трех великих княжеств Руси монгольского периода, в течение двух веков соперничала с Москвой за лидерство в объединении русских земель и являлась одним из центров, вокруг которого концентрировалось население.

В XV–XVI вв. началось переселение карел с Карельского перешейка и из Приладожья в северо-восточные районы тверских земель. В XVII в. оно стало массовым из-за событий русско-шведской войны — к 1670 г. в тверские земли переселилось 25–30 тыс. православных карел. Беженцы были расселены на государственных землях Тверской земли, опустевших из-за голода и разорений Смутного времени. Карелы формировали собственные поселения, компактно расположенные отдельно от русских деревень. Затем последовали еще несколько волн менее значительных миграций карел [1, 2]. В итоге всех переселений сформировалась этнографическая группа тверских карел, сохранявшая свой язык (карельский язык относится к финской подгруппе финно-угорской языковой группы). В 1937 г. в ареале их компактного проживания в Тверской области был создан Карельский национальный округ со столицей в Лихославле. Однако в 1939 г. он был расформирован, а активисты карельского движения арестованы. Это могло привести к смене этнической самоидентификации части тверских карел. Их численность, согласно переписям, сократилась в XX в. в 20 раз: от 150 тыс. человек в 1930 г. (причем 95% населения говорило на карельском языке) до 7 тыс. в 2010 г. [3], однако компактный ареал карел оставался прежним [4].

Проживание бок о бок в течение трех веков популяций двух этносов разного происхождения — тверских русских и тверских карел — ставит вопрос о степени взаимопроникновения их генофондов. Отчасти ответ был нами дан при анализе генофонда тверских карел по панели 49 SNP-маркеров Y-хромосомы, включившей наиболее информативные для Восточной Европы генетические линии. Результаты [5] убедительно продемонстрировали генетическое сходство по Y-хромосоме тверских карел с коренным населением северо-востока Европы, особенно с южными карелами и вепсами Карелии. Полученные результаты указывают, что популяция тверских карел, несмотря на 20-кратное сокращение численности и проживание среди многочисленного русского населения на протяжении более десяти поколений, сохранила свой предковый Y-хромосомный генофонд. Однако резкое сокращение численности тверских карел могло быть связано с изменением их самоидентификации и ассимиляцией тверских карел русским населением. В этом случае в современных популяциях русских Тверской области можно ожидать повышенную долю генетического компонента, характерного для Северо-Востока Европы (и карел в частности). Известно также, что при межэтнических браках соседних этносов Y-хромосомный генофонд более устойчив, чем аутосомный, поскольку большинство браков патрилокальны (женщины переезжают в селения мужчин), что означает миграции в отношении митохондриальной ДНК и аутосом, но отсутствие миграций в отношении

Y-хромосомы. Оба эти фактора могут привести к тому, что аутосомные генофонды тверских карел и тверских русских испытали более интенсивное взаимодействие и сблизились больше, чем по Y-хромосоме.

Изучение аутосомных генофондов различных этнических групп коренного населения по столь подробной «широкогеномной» панели маркеров важно как для каталогизации геномного разнообразия населения России, так и для накопления данных об особенностях генофондов региональных популяций. Это требуется в том числе для исследований по фармакогеномике и для определения происхождения в рамках судебно-медицинских экспертиз. Значимость таких данных для фармакогенетики связана с тем, что подавляющее большинство фармакогенетических протоколов разработано для популяций европейского происхождения, поэтому они могут работать недостаточно эффективно из-за того, что в популяциях России встречаются иные аллели, а частоты хорошо изученных аллелей значительно различаются в разных этнических группах (аналогичная ситуация показана для популяций Восточной Азии и Африки [6, 7]; исследования российских популяций по частотам фармакогенетических маркеров обобщены в недавно проведенном обзоре [8]). Данные о генофондах народонаселения приобретают значимость и для судебно-медицинских экспертиз в тех случаях, когда перед криминалистом ставится задача определить вероятное происхождение индивида по следовым количествам его ДНК, для этого существует ряд тест-систем и идет разработка новых, но принципиальным вопросом является доступность генетических данных о возможных популяциях происхождения [9, 10].

Поэтому целью данного исследования стала характеристика по широкой (4 млн SNP) панели аутосомных маркеров генофондов тверских карел и тверских русских и анализ их взаимопроникновения. Проведение такого анализа на примере Тверской области и на широком фоне генофондов других групп населения Европейской части России, служит и более общей цели — изучению феномена взаимодействия славянского и финноязычного населения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Экспедиционное обследование и русского, и карельского населения Тверской области проведено по единой методологии, детально описанной в [11]. В исследование включены только неродственные между собой индивиды (на глубину до трех поколений, по данным анкетирования), все предки которых на глубине минимум трех поколений родились в Тверской области, причем все четверо бабушек и дедов относили себя либо к русским, либо к карелам, и не помнили, чтобы их более отдаленные предки были иной этнической принадлежности.

Критерии включения в исследование: самоидентификация четырех предков обследуемого (двух дедов и двух бабушек) как принадлежащих к данному народу; письменное информированное согласие на участие в обследовании.

Критерием исключения образцов было качество выделенной ДНК или ее концентрация, недостаточные для проведения полногеномного генотипирования.

Тверские карелы представлены в анализе аутосомного генофонда 11 индивидами, происхождение которых охватывает все центральное ядро ареала тверских карел: Лихославльский ($n = 4$), Максатихинский ($n = 1$), Спировский ($n = 2$) и Рамешковский ($n = 4$) районы Тверской области. В 1930 г. в этих четырех районах проживало 88 тыс. тверских

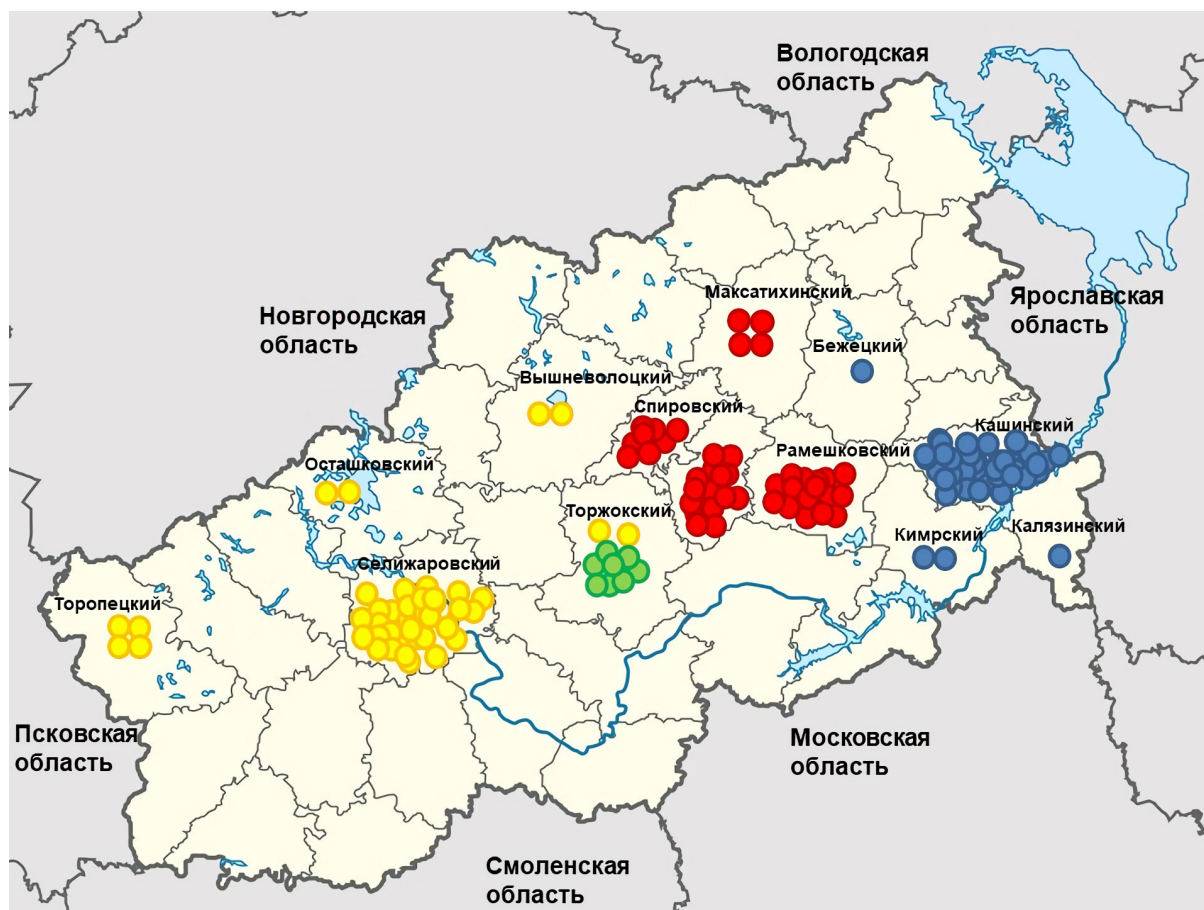


Рис. 1. Карта изученных популяций Тверской области. Кружками отмечены места рождения каждого из четырех предков (двух бабушек и двух дедов) обследованного; тверские карелы показаны **красным** цветом; восточные тверские русские — **синим**; южные тверские русские — **зеленым**; западные тверские русские — **желтым**

карел, т. е. более половины (58%,) их общей численности (в Лихославльском — 15%, Максатихинском — 19%, Спировском — 8%, Рамешковском — 16%). В 2010 г. в этих четырех районах проживало 5 тыс. тверских карел, составляющих 78% их общей численности (в Лихославльском — 36%, Максатихинском — 13%, Спировском — 15%, Рамешковском — 14%).

Общая выборка русских Тверской области, представленная в анализе аутосомного генофонда, составила 30 человек. Обследование русского населения Тверской области проводили целенаправленно для изучения взаимодействия генофондов русского и карельского населения: выборки были собраны нами так, чтобы они не перекрывали ареал расселения тверских карел, но находились вблизи. Такое планирование представляется оптимальным для определения степени потока генов от русских к карелам: при изучении отдаленных русских популяций, которые не могли непосредственно контактировать с карелами, уровень сходства тверских карел с ними мог бы быть занижен за счет различий разных русских популяций друг от друга, а при изучении русских, проживающих непосредственно в «карельских» селах, показатель сходства мог бы быть, наоборот, завышен за счет того, что русские в этих селах могли оказаться потомками карел, сменившими этническую самоидентификацию. Для дополнительного контроля были обследованы не одна, а несколько популяций русских, находящихся на разном удалении от ареала тверских карел. Восточная популяция тверских русских примыкает к ареалу тверских карел (рис. 1). В анализе аутосомного генофонда она представлена 13

индивидами — уроженцами Кашинского района Тверской области. Западная популяция тверских русских выбрана так, чтобы она находилась на большем, чем восточная, удалении от ареала тверских карел. Она представлена в анализе аутосомного генофонда 15 индивидами — уроженцами Селижаровского района Тверской области. В отдельную группу выделены два индивида из Торжокского района, находящегося прямо на юге от Лихославля, столицы тверских карел. Таким образом, суммарно в данной работе представлены генотипы 41 образца из Тверской области, изученных по широкогеномной панели маркеров. На рис. 1 указаны места происхождения каждого из четырех предков этих индивидов.

Анализ генофонда Тверской области проведен в сравнении как с русскими популяциями соседних областей (Архангельской, Вологодской, Воронежской, Курской, Новгородской, Псковской, Смоленской, Ярославской), так и с северными и южными карелами Карелии ($n = 16$). Суммарно анализировали 27 геномов карел, 100 геномов русских, а также ряд других популяций Восточной Европы (белорусы, вепсы, водь, ижора, литовцы, украинцы), изученных по той же широкогеномной панели маркеров. Большинство этих популяций были ранее изучены и по маркерам Y-хромосомы [5, 12, 13].

Генотипирование всех образцов ДНК (как Тверской области, так и популяций сравнения) проводили по панели Illumina, включающей 4,5 млн SNP-маркеров. Генотипирование выполняли с использованием набора реактивов Infinium Omni5Exome-4 v1.3 BeadChip Kit (Illumina; США) на приборе iScan (Illumina; США). Первичный анализ

и оценку качества проводили в программе GenomeStudio v2011.1 (Illumina; США). Для исследованных образцов показатель CallRate составлял не менее 0,99. В результате для изученных выборок были получены генотипы по 4 559 465 маркерам.

Полученные генотипы размещены в базе данных GGBase [14] и открыты для скачивания для популяций Тверской области (RussiansTverKashin, RussiansTverSelizharovo, RussiansTverTorzhok, TverKarelians).

Для первичного общего анализа применяли классический метод главных компонент, который позволяет увидеть общую структуру изучаемых генофондов. Для более подробного изучения «генетического расстояния» между популяциями использовали анализ f_3 -статистик, а анализ d -статистики — для определения направления потоков генов между изученными популяциями и образцами.

Фильтрацию данных проводили с помощью PLINK 1.9 [15, 16]. Конкретные фильтры описаны ниже для каждого метода отдельно.

Так, перед расчетом главных компонент (PCA) были исключены полиморфизмы, прочитанные менее чем у 95% образцов (geno 0,05) и встречаемые с частотой минорного аллеля менее 1% (maf 0,01); были исключены образцы, у которых прочитано менее 90% полиморфизмов (mind 0.1); исключение тесно сцепленных полиморфизмов ($r^2 > 0,2$) проведено методом движущегося окна, включающего на каждом шаге 1500 полиморфных сайтов и сдвигающегося за один шаг на 150 полиморфных сайтов (indep-pairwise 1500 150 0.2). После фильтрации осталось 274 036 полиморфизмов и 127 образцов (из 131). Расчет значений главных компонент проводили с помощью утилиты smartpca из программного пакета EIGENSTRAT [17, 18] с пятью итерациями исключения outliers. Результаты работы smartpca визуализировали с помощью Python 3, в том числе с использованием библиотек pandas [19, 20], matplotlib [21] и seaborn [22].

Для анализа методом ADMIXTURE фильтрацию проводили с такими же параметрами (mind 0,1, geno 0,05, maf 0,01). После этого исключали сцепленные полиморфизмы с коэффициентом r^2 более 0,2. Отфильтрованный датасет анализировали с помощью программного обеспечения ADMIXTURE v1.3.0 [23] и рассчитывали кроссвалидацию для вероятностной оценки каждого k .

Метод f_3 -статистик позволяет количественно оценить общий дрейф генов (т. е. степень общего происхождения) между двумя популяциями относительно дальней популяции (outgroup). Расчет f_3 -статистик проведен с помощью программы qp3Pop из пакета AdmixTools [24]. В качестве дальней популяции (outgroup) применяли образцы популяции йоруба из данных проекта «1000 геномов» [25]. Вместе с образцами популяции йоруба использовали 668 образцов по 3 757 004 маркерам. Применяли следующие фильтры: mind 0,1, geno 0,05, maf 0,01, исключение сцепленных полиморфизмов проведено с $r^2 > 0,5$. После фильтрации остались 1 144 136 маркеров у 635 образцов.

Метод d -статистик является тестом на генетическое смешение между четырьмя популяциями. Классически его применяют с одной дальней популяцией (африканской). В этом случае он позволяет понять направление потока генов между оставшимися тремя популяциями. Расчет d -статистик проводили с помощью программы qpDstat из того же пакета AdmixTools с использованием йоруба в качестве дальней популяции. Всего использовали 748 образцов по 3 757 004 маркерам. Параметры фильтрации: mind 0,05; geno 0,2; maf 0,01; $r^2 > 0,6$. После фильтрации остались 1 355 253 маркера у 633 образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Положение тверских русских и тверских карел в генетическом пространстве главных компонент, рассчитанных по широкогеномной панели из 4,5 млн маркеров, представлено на рис. 2. Выборка тверских карел оказалась близка в карелам Карелии и отдалена от всех проанализированных русских популяций (тверских, новгородских, вологодских и ярославских). Лишь один образец тверских карел на диаграмме генетически приближается к русским Вологодской области. Все остальные образцы тверских карел расположены очень компактно, демонстрируя генетическое сходство. Такое расположение согласуется с результатами, полученными при анализе Y-хромосомных линий [5]: диаспора тверских карел сохранила свой предковый генофонд.

Но при этом аутосомные маркеры (широкогеномная панель) выявляют и частичное сближение тверских карел с русскими. На рис. 2 виден четкий клинальный градиент: северные карелы – южные карелы – тверские карелы – русские популяции. При этом к карелам наиболее генетически близки русские не Тверской, а Вологодской области, а тверские русские образуют единое генетическое облако вместе с псковскими и с популяциями центральной России. Генетические различия между западной и восточной группой тверских русских невелики, но заметны и согласуются с географией: западные тверские русские на диаграмме занимают общую зону с образцами из Псковской области, в то время как восточные (Кашинский район) находятся на их периферии. Причем два образца из восточной популяции перешли в новгородско-ярославский тандем, который вторая компонента отличает от остальных русских популяций (см. рис. 2).

В целом анализ главных компонент выявляет наибольшее сходство генофонда тверских карел с карелами Карелии, а не с русскими популяциями, но позволяет выдвинуть

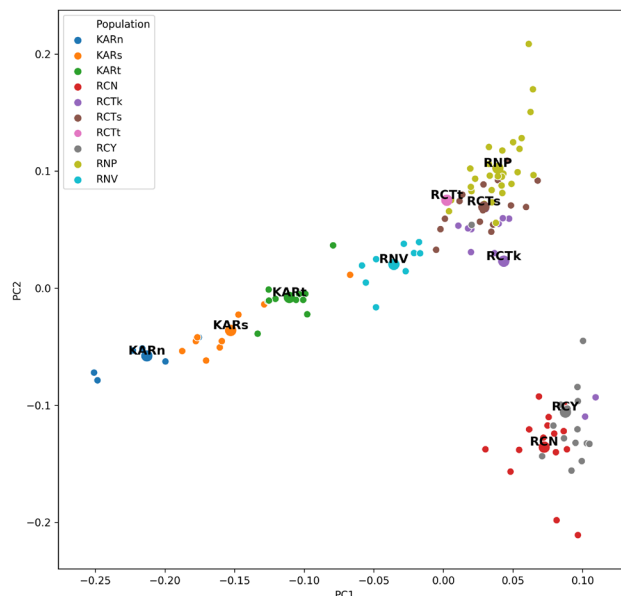


Рис. 2. Диаграмма главных компонент изменчивости изученных популяций. KARn — карелы северные, KARs — карелы южные, KARt — карелы тверские, RCN — русские новгородские, RCTk — русские тверские кашинские (восточные), RCTt — русские тверские торжокские (южные), RCTs — русские тверские селижаровские (западные), RCTy — русские ярославские, RNP — русские псковские, RNV — русские вологодские. Индивидуальные образцы отмечены малыми кружками, центроиды (центр тяжести для образцов каждой популяции) отмечены увеличенными кружками того же цвета

гипотезу незначительного сближения генофондов русских и карел Тверской области. Поскольку из трех популяций карел в сторону русских популяций сдвинута только тверская популяция карел, а среди всех изученных русских популяций тверская не сдвинута в сторону карел, можно предполагать наиболее интенсивный поток генов от русских к карелам, а не в обратном направлении. Анализ f_3 -статистики уточняет степень генетического сходства тверских карел с различными популяциями Восточной Европы: наиболее близки к ним генофонды народов Балтийского региона. По степени генетической близости к тверским карелам они расположились в таком порядке: ижора, водь, южные карелы, вепсы, литовцы, северные карелы. Сходство меньшее, чем для популяций балтийского региона, обнаруживается для русских популяций, среди которых тверских русских характеризует отнюдь не самое выраженное сходство с тверскими карелами (по убыванию сходства: псковские русские, новгородские, тверские западные, смоленские, курские, тверские восточные, ярославские, вологодские, воронежские, русские северо-востока Архангельской области).

Для уточненного описания генофонда мы применили метод ADMIXTURE, позволяющий дать качественную и количественную оценку вкладов различных «предковых популяций» в генофонды изучаемых популяций. Он позволяет варьировать число предковых популяций k для обнаружения общих предковых компонентов разной степени дробности.

При $k = 5$ (рис. 3; таблица) мы видим у всех рассматриваемых популяций основной вклад лишь двух компонентов: обозначенный синим цветом (максимальные значения которого обнаруживаются у народов уральской языковой семьи) и обозначенный рыжим цветом (характерным для литовцев, украинцев, белорусов и большинства русских популяций). Синий компонент «А» преобладает у карел Карелии (85%; см. таблицу). И если у них компонент «Б» встречается лишь у единичных образцов, то у тверских карел он присутствует во всех образцах, составляя в среднем 41% их геномов (см. таблицу). У тверских русских мы видим более высокую частоту компонента «Б» — его в 2 раза больше (в среднем 80%), чем у тверских карел. Таким образом, результаты ADMIXTURE при $k = 5$ не противоречат гипотезе частичного потока генов от русских к тверским карелам.

При $k = 6$ (рис. 3) картина становится более точной благодаря тому, что карельские геномы диагностируются компонентом, окрашенным на графике в ярко-желтый цвет («В»; см. таблицу): у карел Карелии он достигает

практически 100%, у тверских карел его в два раза меньше (52%), а у тверских русских (8%), как и у псковских (4%), он крайне редок, указывая, что поток генов к ним от карел был либо незначительным, либо отсутствовал (в последнем случае наличие компонента «В» у русских объясняется более древним общим родством всех популяций Восточной Европы). Значительно больший вклад компонента «В» неожиданно обнаруживается у других соседей Тверской земли — у новгородских (39%), ярославских (30%) и вологодских (20%) русских.

Но при $k = 8$ (см. рис. 3) эта картина меняется за счет дифференцировки компонента «В». Если у карел и вологодских русских ярко-желтый (условно «западно-финский») компонент сохраняет свои прежние позиции (на данном графике он обозначен как компонент «Е» и составляет 96% в Карелии, 53% — у тверских карел, 20% — у вологодских русских), то в остальных русских популяциях его доля минимальна. Наличие этого компонента у русских популяций может отражать не недавнее взаимодействие с карелами, а более древние события, например происхождение самих русских популяций в результате смешения славян с дославянским населением.

Таким образом, при $k = 8$ из рассмотренных русских популяций только у вологодских можно проследить заметный (пятая часть генома) вклад условно «западно-финского» компонента «Е». Вместо него в остальных русских популяциях выделяется иной генетический пласт (обозначен светло-серым компонентом «И»). Он достигает предельного максимума у новгородских (91%) и ярославских (90%) русских, составляя почти весь их геном. Больше трети генома светло-серый компонент «И» занимает у тверских (39%), псковских (36%) и вологодских (34%) русских. Этот (условно «новгородский») компонент «И» обнаружен во всех остальных изученных нами популяциях центральной и южной России, составляя в среднем около трети (38%) их геномов.

По пропорциям условно «новгородского» компонента «И» и условно «южнорусского» компонента «К» различаются две группы тверских русских, причем не совсем в ладах с географией: если на западе Тверской области, граничащей с Новгородской областью, «южнорусский» компонент резко преобладает над «новгородским» («К»/«И» = 63/27), то у восточной группы тверских русских он равноправен с «новгородским» компонентом («К»/«И» = 42/42), а у представителей центральной тверской группы «новгородский» компонент «И» составляет весь генофонд (100%).

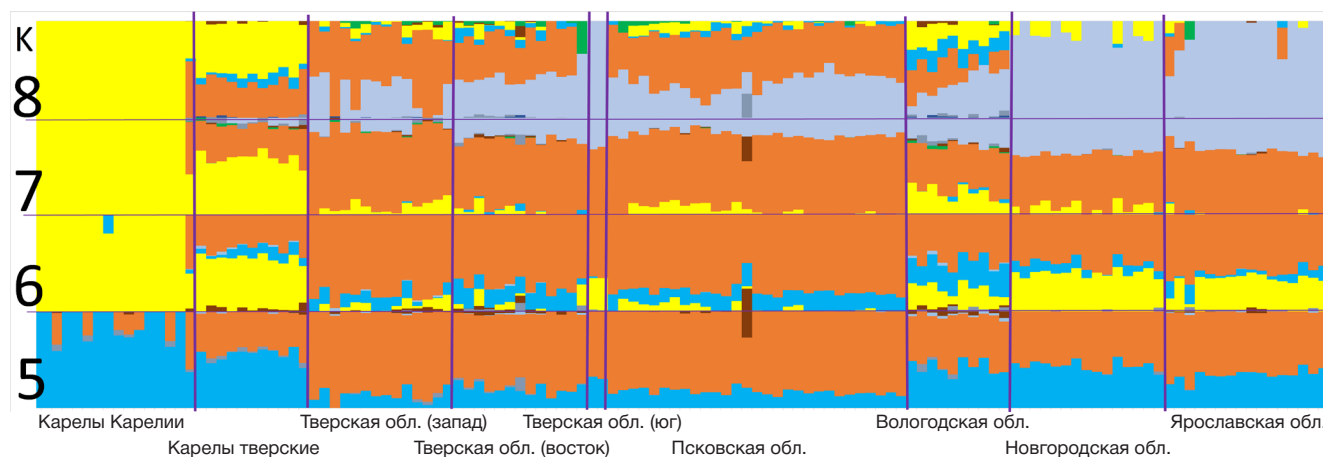


Рис. 3. Диаграмма результатов ADMIXTURE (вклад предковых компонентов в изучаемые популяции при разном числе компонентов k). Профили индивидуальных образцов показаны в отдельных столбиках, индивиды разных популяций разграничены вертикальными линиями

Таблица. Величины вкладов предковых компонентов ADMIXTURE в изучаемые популяции (при разном числе компонентов k)

Уровень	Код компонента	ЭТНОС	КАРЕЛЫ						РУССКИЕ																							
		Популяции	Карелии			Тверские			Тверские (запад)			Тверские (восток)			Тверские (юг)			Псковские			Вологодские			Новгородские			Ярославские					
			Объем выборки			n = 16			n = 11			n = 14			n = 13			n = 2			n = 29			n = 10			n = 15			n = 16		
			Цвет компонента на рис. 3	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN	MAX	MEAN	MIN
%	%	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		
К	5	A	Синий	85	37	100	55	41	63	13	0	24	20	10	29	31	30	33	17	11	25	42	30	52	43	34	53	34	18	45		
		Б	Рыжий	13	0	60	41	35	50	85	71	96	75	65	90	69	67	70	83	52	89	51	42	61	56	47	65	65	55	77		
6	В	Ярко-желтый	95	36	100	52	38	60	6	0	17	5	0	22	33	32	33	4	0	15	20	8	31	39	29	46	30	3	37			
	Г	Синий	2	0	20	9	3	14	10	0	18	18	6	27	1	1	2	16	8	24	28	20	35	9	0	14	8	2	20			
	Д	Рыжий	3	0	56	35	27	45	81	68	97	73	62	84	65	64	66	79	50	86	47	37	60	51	41	62	60	49	72			
8	Е	Ярко-желтый	96	38	100	53	40	59	7	0	19	3	0	16	0	0	0	5	0	13	20	10	30	9	0	23	1	0	13			
	Ж	Синий	0	0	3	8	2	13	2	0	7	6	0	15	0	0	0	3	0	11	18	12	22	0	0	4	1	0	7			
	И	Светло-серый	0	0	0	0	0	0	27	0	47	42	31	66	100	100	100	36	13	57	34	8	55	91	72	100	90	43	100			
	К	Рыжий	3	0	58	37	29	47	63	36	98	42	0	54	0	0	0	54	36	70	24	0	38	0	0	0	6	0	41			

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, анализ широкогеномной панели маркеров (аутосомных) подтвердил выводы, сделанные ранее по Y-хромосоме [5], что тверские карелы генетически более сходны с карелами Карелии, чем с окружающими русскими популяциями Тверской области. Важно, что этот вывод не только следует из описательных методов (PCA, ADMIXTURE), но подтверждается и значениями d-статистики. Метод d-статистик (f4-статистик) классически применяют с одной дальней популяцией (африканской). Он позволяет понять направление потока генов между оставшимися тремя популяциями, причем поток генов считают достоверным при параметре Z , по модулю превышающим 3. Метод d-статистики в форме d (Yoruba, TverKarelians; SouthKarelians, TverRussians) для восточной популяции тверских русских характеризуется величиной $Z = -6,9$, для западной $Z = -5,0$. Это доказывает, что генофонд тверских карел ближе к генофонду карел Карелии, чем к генофонду тверских русских. Но при этом у тверских карел генетическое сходство с русскими популяциями все же более выражено, чем у южных (и тем более северных) карел Карелии. Соответствующие d-статистики тверских карел принимают достоверные значения при включении в анализ целого ряда более южных, чем Тверь, русских популяций: например, для русских юга Смоленской области d-статистика в

форме d (Yoruba, RussiansSmolensk; TverKarelians, Karelians) характеризуется значением $Z = -3,4$. Это показывает, что генофонд тверских карел при общем сходстве с карелами Карелии по сравнению с ними достоверно приближен к генофонду смоленских и других русских популяций.

Таким образом, если предполагать, что изначально предки тверских карел и карел Карелии представляли собой единую популяцию [1, 2, 4], то d-статистики доказывают, что затем предки тверских карел приняли генетический вклад популяций, населяющих более южные территории Восточно-Европейской равнины. Для населения Восточной Европы характерна столь сложная сеть предшествующих и последующих перемещений населения, что генетические данные не позволяют однозначно идентифицировать источник этой южной примеси у тверских карел, но исторически на эту роль лучше всего подходят русские популяции Тверской области и соседних областей.

ВЫВОДЫ

Мы изучили генофонды популяций карел и русских Тверской области по панели 4,5 млн аутосомных SNP-маркеров, проанализировав их на широком фоне карел Карелии и русских областей, граничащих с Тверской (Псковской, Новгородской, Вологодской,

Ярославской). Применение различных методов анализа (главных компонент, ADMIXTURE, d- и f3-статистик) дало согласованные результаты.

Генофонд тверских карел сохраняет наибольшую близость к генофонду карел Карелии, несмотря на их проживание среди многочисленного русского населения в течение 3–5 веков и 20-кратное сокращение численности в течение последнего столетия. При этом генофонд тверских карел все же более сходен с русским генофондом, чем генофонд других обследованных карельских популяций. Сопоставление данных, полученных по аутосомным маркерам (частичное смещение в сторону русского генофонда) с опубликованными данными по Y-хромосоме (отсутствие детектированного смешения с русскими),

позволяет предположить, что основной формой потока генов от русских к тверским карелам были браки карелов с русскими женщинами.

Демографические данные (резкое сокращение численности тверских карел) и исторические события позволяли предполагать изменение самоидентификации тверских карел и их ассимиляции русским населением. В этом случае в геномах тех тверских русских, которые были потомками карел, сменивших этническую самоидентификацию, должна была быть велика доля генетического компонента, характерного для карел. Однако это явление не обнаружено: тверские русские оказались столь же генетически отличны от карел, как, например, псковские.

Литература

1. Савинова А. И., Степанова Ю. В. Карельская диаспора южных районов Тверского Поволжья: история формирования и историческая судьба. *CARELiCA*. 2018; 1 (19): 26–37.
2. Степанова Ю. В., Савинова А. И. Расселение карел в Верхневолжье в середине — второй половине XVII в.: опыт изучения с применением гис-технологий. *Историческая информатика*. 2018; 4: 57–72.
3. Вишневский А. Г., редактор. Переписи населения Российской Империи, СССР, 15 новых независимых государств. *Демоскоп Weekly* [Internet]. [cited 2020 Oct 9]. Available from: http://www.demoscope.ru/weekly/ssp/census_types.php?ct=6.
4. Головкин А. Н. История Тверской Карелии. Тверь: Студия-С, 2008; 432 с.
5. Агджоян А. Т., Дараган Д. М., Схаляхо Р. А., Реутов П. П., Балановский О. П., Балановская Е. В. и др. Возможность сохранения генофонда в диаспоре на примере тверских карел. *Генетика*. 2018; 54: 91–94.
6. Rajman I, Knapp L, Morgan T, Masimirembwa C. African Genetic Diversity: Implications for Cytochrome P450-mediated Drug Metabolism and Drug Development. *EBioMedicine*. 2017; 17: 67–74.
7. Jing L, Haiyi L, Xiong Y, Dongsheng L, Shilin L, Jin L, et al. Genetic architectures of ADME genes in five Eurasian admixed populations and implications for drug safety and efficacy. *Journal of Medical Genetics*. 2014; 51 (9): 614–22.
8. Mirzaev KB, Fedorinov DS, Ivashchenko I DV, Sychev DA. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia. *Pharmacogenomics*. 2019; 20 (11): 847–65.
9. Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Furtado MR, Fang R, Madbouly A, et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic Science International: Genetics*. 2014; 10: 23–32.
10. Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, et al. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genetics*. 2009; 10: 39.
11. Балановская Е. В., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. Балановский О. П. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика*. 2016; (12): 1371–87.
12. Агджоян А. Т., Схаляхо Р. А., Балаганская О. А., Козлов С. А., Палигана С. Д., Балановский О. П. и др. Генофонд новгородцев: между севером и югом. *Генетика*. 2017; 53 (11): 1338–48.
13. Чухряева М. И., Павлова Е. С., Напольских В. В., Гарин Э. В., Балановский О. П., Балановская Е. В. и др. Сохранились ли следы финно-угорского влияния в генофонде русского населения Ярославской области? Свидетельства Y-хромосомы. *Генетика*. 2017; 53 (3): 378–89.
14. GG-base [Internet]. [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.gg-base.org/>.
15. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*. 2007; 559–75.
16. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*. 2009; (19): 1655–64.
17. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015 Feb 25; 4 (7). Available from: DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
18. Price A, Patterson N, Plenge R. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*. 2006; 38: 904–9.
19. Patterson N, Price AL, Reich D. Population Structure and Eigenanalysis. *PLOS Genetics* [Internet]. 2006; 2 (12): e190 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>.
20. McKinney W. Data structures for statistical computing in Python. *SciPy 2010: Proceedings of the 9th Python in Science Conference*; 2010 Jun 28 – Jul 3. Austin, Texas. Available from: <https://conference.scipy.org/proceedings/scipy2010/mckinney.html>.
21. Reback J, McKinney W, jbrockmendl, Augspurger T, Cloud F, Mehryar M, et al. pandas-dev/pandas: Pandas 1.0.3. Version 1.0.3 [software]. Zenodo. 2020 Mar 18 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3715232>.
22. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering. IEEE Xplore*. 2007; 9 (3): 90–95.
23. Waskom M, Botvinnik O, O’Kane D, Hobson P, Lukauskas S, Qalieh A, et al. mwaskom/seaborn: v0.8.1 (September 2017). Version 0.8.1 [software]. Zenodo. 2017 Sep 3 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://doi.org/10.5281/zenodo.883859>.
24. Alexander DH, Novembre J, Lange K. ADMIXTURE Software. Version 1.3.0 [software]. 2020 May 3 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://dalexander.github.io/admixture/index.html>.
25. Patterson N, Moorjani P, Luo Y, Mallick S, Rohland N, Zhan Y, et al. Ancient Admixture in Human History. *GENETICS*. 2012; 192 (3): 1065–93.
26. Auton A, Abecasis G, Altshuler D, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; (526): 68–74.

References

1. Savinova AI, Stepanova UV. Karel'skaya diaspora uzhnih rayonov Tverskogo Povolgya: istoria formirovaniya i istoricheskaya sud'ba. CARELiCA. 2018; 1 (19): 26–37. Russian.
2. Savinova AI, Stepanova UV. Rasselenie karel v Verhnevolzhie v seredine — vtoroy polovine XVII v.: opit izucheniya s primeneniem gis-technologiy. Istoricheskaya informatika. 2018; 4: 57–72. Russian.
3. Vishnevskiy AG, editor. Perepisi naseleniya Rossiyskoy Imperii, SSSR, 15 novykh nezavisimyykh gosudarstv. Demoskop Weekly. [Internet]. [cited 2020 Oct 9]. Available from: http://www.demoscope.ru/weekly/ssp/census_types.php?ct=6.
4. Golovkin AN. Istoriya Tverskoy Karelii. Tver': Studiya-S, 2008; 432 s. Russian.
5. Agdzhoyan AT, Daragan DM, Skhalyakho RA, Reutov PP, Balanovskiy OP, Balanovskaya EV, et al. Vozmozhnost' sokhraneniya genofonda v diasfore na primere tverskikh karel. Genetika. 2018; 54 (Application S): 91–94. DOI: 10.1134/S0016675818130027. Russian.
6. Rajman I, Knapp L, Morgan T, Masimirembwa C. African Genetic Diversity: Implications for Cytochrome P450-mediated Drug Metabolism and Drug Development. EBioMedicine. 2017; 17: 67–74.
7. Jing L, Haiyi L, Xiong Y, Dongsheng L, Shilin L, Jin L, et al. Genetic architectures of ADME genes in five Eurasian admixed populations and implications for drug safety and efficacy. Journal of Medical Genetics. 2014; 51 (9): 614–22.
8. Mirzaev KB, Fedorin DS, Ivashchenko DV, Sychev DA. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia. Pharmacogenomics. 2019; 20 (11): 847–65.
9. Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Furtado MR, Fang R, Madbouly A, et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. Forensic Science International: Genetics. 2014; 10: 23–32.
10. Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, et al. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. BMC Genetics. 2009; 10: 39.
11. Balanovskaya EV, Agdzhoyan AT, Chukhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, Balanovskiy OP, et al. Populyatsionnye biobanki: printsipy organizatsii i perspektivy primeneniya v genogeografii i personalizirovannoy meditsine. Genetika. 2016; (12): 1371–87. Russian.
12. Agdzhoyan AT, Skhalyakho RA, Balaganskaya OA, Kozlov SA, Palipana SD, Balanovskiy OP, et al. Genofond novgorodtsev: mezhdz severom i yugom. Genetika. 2017; 53 (11): 1338–1348. Russian.
13. Chuhriaev MI, Pavlova ES, Napolskih VV, Garin EV, Balanovsky OP, Balanovska EV, et al. Sohranilis' li sledy finno-ugorskogo vliyaniya v genofonde russkogo naseleniya Yaroslavskoy oblasti? Svidetel'stva Y-chromosomi. Genetika. 2017; 53 (3): 378–89. GG-base [Internet]. [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.gg-base.org/>.
14. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. The American Journal of Human Genetics. 2007; 559–75.
15. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. Genome Research. 2009; (19): 1655–64.
16. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. GigaScience. 2015 Feb 25; 4 (7). Available from: DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
17. Price A, Patterson N, Plenge R. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. Nature Genetics. 2006; 38: 904–9.
18. Patterson N, Price AL, Reich D. Population Structure and Eigenanalysis. PLOS Genetics [Internet]. 2006; 2 (12): e190 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>.
19. McKinney W. Data structures for statistical computing in Python. SciPy 2010: Proceedings of the 9th Python in Science Conference; 2010 Jun 28 – Jul 3. Austin, Texas. Available from: <https://conference.scipy.org/proceedings/scipy2010/mckinney.html>.
20. Reback J, McKinney W, jbrockmendl, Augspurger T, Cloud F, Mehyar M, et al. pandas-dev/pandas: Pandas 1.0.3. Version 1.0.3 [software]. Zenodo. 2020 Mar 18 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3715232>.
21. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. Computing in Science & Engineering. IEEE Xplore. 2007; 9 (3): 90–95.
22. Waskom M, Botvinnik O, O'Kane D, Hobson P, Lukauskas S, Qalieh A, et al. mwaskom/seaborn: v0.8.1 (September 2017). Version 0.8.1 [software]. Zenodo. 2017 Sep 3 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://doi.org/10.5281/zenodo.883859>.
23. Alexander DH, Novembre J, Lange K. ADMIXTURE Software. Version 1.3.0 [software]. 2020 May 3 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <http://dalexander.github.io/admixture/index.html>.
24. Patterson N, Moorjani P, Luo Y, Mallick S, Rohland N, Zhan Y, et al. Ancient Admixture in Human History. GENETICS. 2012; 192 (3): 1065–93.
25. Auton A, Abecasis G, Altshuler D, et al. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015; (526): 68–74.

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ α -СУБЪЕДИНИЦ ИНТЕГРИНОВ В КЛЕТКАХ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ CACO-2 ПРИ ГИПОКСИИ В УСЛОВИЯХ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ

Д. В. Мальцева¹ ✉, А. А. Полозников¹, В. Г. Артюшенко²

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

² Art photonics GmbH, Берлин, Германия

Кишечный эпителий постоянно находится в условиях физиологической гипоксии. Дополнительная тканевая гипоксия способна приводить к нарушению его функций и является признаком активного воспалительного процесса. В исследованиях *in vitro* значительную роль играют условия культивирования, поскольку в свою очередь могут влиять на свойства клеток. Целью работы было провести оценку экспрессии интегрина рецепторов в клетках аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2 при моделировании условий гипоксии хлоридом кобальта (II) и микроциркуляции. С помощью транскриптомного анализа обнаружено значимое увеличение экспрессии генов $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина рецепторов *ITGA2* и *ITGA5* в условиях гипоксии и уменьшение *ITGA5* при инкубировании в микрофлюидном чипе. Экспрессия β -субъединиц при этом не изменилась. При анализе микроРНК-транскриптомов выявлено уменьшение экспрессии микроРНК hsa-miR-766-3p и hsa-miR-23b-5p. В число валидированных мишеней обеих микроРНК входит мРНК гена *ITGA5*. Показано, что микроциркуляция позволяет создать для энтероцитов кишечника условия культивирования, более близкие к физиологическим. Представлено обсуждение возможного биологического значения выявленных изменений экспрессии профиля интегрина и роли микроциркуляции.

Ключевые слова: гипоксия, интегрины, микроРНК, мРНК, микрофлюидный чип, протеом, кишечная микробиота, Caco-2

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ) за возможность использования оборудования для анализа протеома, Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия) за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Финансирование: результаты получены при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства образования и науки. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI61719X0056.

Вклад авторов: Д. В. Мальцева — работа с культурой клеток, молекулярно-биологические исследования, анализ данных, подготовка рукописи статьи; А. А. Полозников — обработка данных протеомного и транскриптомного анализа, биоинформатический анализ, функциональный анализ генов, статистический анализ, подготовка рукописи статьи, организация исследования; В. Г. Артюшенко — обсуждение результатов исследования, рецензирование рукописи статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

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

Статья получена: 09.11.2020 **Статья принята к печати:** 01.12.2020 **Опубликована онлайн:** 16.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.078

SELECTIVE CHANGES IN EXPRESSION OF INTEGRIN α -SUBUNITS IN THE INTESTINAL EPITHELIAL CACO-2 CELLS UNDER CONDITIONS OF HYPOXIA AND MICROCIRCULATION

Maltseva DV¹ ✉, Poloznikov AA¹, Artyushenko VG²

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

² Art photonics GmbH, Berlin, Germany

Intestinal epithelial cells are constantly exposed to physiologically hypoxic environment. The further reduction of tissue oxygen delivery may result in the intestinal epithelial cells function impairment, being a sign of active inflammation. The cell culture conditions are important when performing *in vitro* studies, since those may affect the cells' properties. The study was aimed to assess the integrin receptor expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cell line when simulating both the cobalt (II) chloride-induced hypoxia and microcirculation. Transcriptome analysis revealed the significantly increased expression of *ITGA2* and *ITGA5* genes, encoding $\alpha 2$ and $\alpha 5$ integrin subunits, under hypoxic conditions, as well as the reduction of *ITGA5* during incubation in the microfluidic chip. The expression of β -subunits did not change. Analysis of microRNA transcriptomes revealed the decreased expression of hsa-miR-766-3p and hsa-miR-23b-5p microRNA. One of the validated targets for both microRNAs is the *ITGA5* mRNA. It has been shown that microcirculation makes it possible to bring the intestinal epithelial cell culture conditions closer to physiological conditions. The possible biological significance of the detected integrin expression profile alterations and the role of microcirculation have been discussed.

Keywords: hypoxia, integrins, microfluidic chip, miRNA, mRNA, proteome, gut microbiota, Caco-2

Author contribution: Maltseva DV — working with cultured cells, molecular biology research, data analysis, manuscript writing; Poloznikov AA — proteomic and transcriptomic analysis data processing, bioinformatics analysis, functional analysis of genes, statistical analysis, manuscript writing, study management; Artyushenko VG — interpreting the study results, manuscript reviewing.

Acknowledgement: the authors express their appreciation to the Center for Collective Use "Human Proteome" (IBMC) for the opportunity to use the equipment for proteome analysis, and to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia) for the opportunity to use the molecular biology technologies.

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project ID RFMEFI61719X0056.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

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

Received: 09.11.2020 **Accepted:** 01.12.2020 **Published online:** 16.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.078

В результате метаболизма комменсалитических бактерий кишечный эпителий в норме находится в состоянии физиологической гипоксии [1]. Однако в ходе паталогических процессов, включая воспалительные и опухолевые заболевания, в кишечнике возникает дополнительная тканевая гипоксия [2]. При этом можно наблюдать значительные изменения в транскриптоме клеток и структуре поверхности энтероцитов кишечника [3], что может послужить причиной нарушения важнейших свойств эпителия кишечника, включая реализацию барьерной функции и свойство дифференциальной абсорбции, а также нарушение взаимодействия с микробиотой. В связи с этими изменениями с каждым годом растет внимание к исследованию гипоксии на функционирование кишечника.

Для моделирования условий гипоксии в исследованиях *in vitro* используют несколько подходов: применение газовой смеси с пониженным содержанием кислорода [4] либо миметики, механизм действия которых основан на увеличении внутриклеточной концентрации HIF-1 α — фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией. К таким миметикам гипоксии относят производные оксигинолина [5], хелаторы ионов Fe²⁺ и диметилксалилглицин (DMOG) [4], однако наиболее широко используют хлорид кобальта (II) (CoCl₂) [6], в том числе в исследованиях *in vitro* моделей кишечника [7]. Он стабилизирует факторы HIF-1 α и HIF-2 α , которые в норме быстро деградируют.

МикроРНК — класс коротких (в среднем 22 нуклеотида) некодирующих РНК, осуществляющих посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [8]. Около половины генов микроРНК млекопитающих кодируются в интронах других генов. МикроРНК в комплексе с белками семейства Argonaute способны комплементарно взаимодействовать с мРНК-мишенью, причем комплементарность обычно неполная [8]. Как правило, для эффективного взаимодействия с мРНК достаточно полной комплементарности только в пределах 2-7/8 н. микроРНК (так называемый seed region), хотя нередко присутствует несколько дополнительных комплементарных нуклеотидов. Белки Argonaute привлекают другие белковые комплексы, осуществляющие репрессию трансляции и деградацию мРНК-мишени. Около 60% всех кодирующих белки генов регулируются микроРНК. К настоящему времени накоплено множество данных о ключевой роли микроРНК в широком спектре патофизиологических процессов, включая внутриклеточные и межклеточные взаимодействия [9], онкологические заболевания, бактериальные и вирусные инфекции [10]. Так, недавно были обнаружены семейства человеческих микроРНК hsa-let-7e / hsa-mir-125a и hsa-mir-141 / hsa-mir-200, регулирующие экспрессию генов ACE2 и TMPRSS2, являющихся входными воротами для коронавирусной инфекции [10].

Для моделирования кишечного барьера *in vitro* широко используют линию клеток Caco-2 [11]. Данная клеточная линия изначально была получена от пациента с аденокарциномой толстой кишки, однако по мере роста в культуре клетки Caco-2 дифференцируются, образуют монослой поляризованных призматических клеток, экспрессирующих целый ряд ферментов щеточной каемки и мембранных транспортеров, характерных для клеток эпителия тонкого кишечника [12]. Данные протеомного анализа свидетельствуют о близости дифференцированных клеток Caco-2 к нативным энтероцитам кишечника [13]. Фокусом исследования в настоящей работе является влияние гипоксии на адгезионные свойства

эпителия кишечника. Существенная роль в процессах адгезии принадлежит интегринам — суперсемейству трансмембранных рецепторов, ответственных за взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса, а также с белками, расположенными на поверхности других клеток, в том числе бактериальных. Все интегрины представляют собой гетеродимеры, состоящие из α - и β -субъединиц. У млекопитающих имеются 18 α - и 8 β -субъединиц, в клетках Caco-2 одними из основных являются α -2, 5, V и β -1, 3, 4 субъединицы [14], что совпадает с профилем субъединиц интегринов в первичных энтероцитах человека [15]. Целью работы было провести оценку изменений в транскриптоме и протеоме клеток Caco-2 в норме и в условиях гипоксии и сравнить полученные результаты с изменениями в транскриптоме клеток Caco-2 при культивировании в микрофлюидном чипе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии Caco-2

Линию иммортализованных клеток аденокарциномы ободочной кишки Caco-2 (Институт цитологии РАН; Санкт-Петербург) культивировали в среде MEM (Gibco; США) с добавлением 20%-й фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, Gibco; США), 1%-го (v/v) раствора заменимых аминокислот (Gibco; США), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco; США). Клетки Caco-2 культивировали в шестилуночных планшетах (Corning; США) в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену среды производили каждые 2–3 суток. Для моделирования гипоксии в среду добавляли CoCl₂ (Sigma-Aldrich; США) до концентрации 300 мкМ и инкубировали 24 ч, как опубликовано ранее [7]. После инкубации клетки промывали 1 × DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома и протеома, как описано ранее [16].

Оценку влияния гипоксии на состояние монослоя клеток проводили с помощью импедансной спектроскопии. Для этого перед посевом клеток Caco-2 в 96-луночные планшеты с мембранными вставками (Corning; США) все лунки планшета заполняли средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Затем клетки Caco-2 рассеивали приблизительно по 5600 клеток на каждую мембранную вставку в объеме 50 мкл и культивировали в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену среды производили каждые 2–3 суток. Для индукции гипоксии в среду добавляли CoCl₂, как описано выше.

Для оценки влияния перфузии на транскриптом клеток Caco-2 проводили культивирование в микрофлюидном чипе BAWP:942514.001 МЧ, разработанном в ходе выполнения работ по гранту Министерства образования и науки РФ по теме «Исследование адгезии бактерий в микрофлюидной модели кишечного барьера человека». Данный чип представляет собой проточную систему, содержащую две ячейки для культивирования клеток, каждая из которых разделена мембраной с порами 0,4 мкм.

Предварительно лунки микрофлюидного чипа покрывали ламином 332 (Biolamina; Швеция). Для этого вносили по 57 мкл раствора ламилина 332 в DPBS (0,01 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч в холодильнике при 4 °С. Затем открепляли клетки Caco-2 от подложки при помощи раствора трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса, после

чего ресуспендировали клетки в питательной среде и проводили подсчет их числа при помощи автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen; Германия). В каждую лунку чипа добавляли по 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 20 000 клеток Caco-2, и инкубировали чипы в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в течение 2 ч. После инкубации подключали чип к перистальтическому насосу и включали перфузию жидкости в режиме 50 мкл/ч. Клетки культивировали 2 дня, регулярно проверяя трансэпителиальное сопротивление (не менее двух раз в сутки) до достижения значения 350 Ом·см² в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C). По достижении состояния дифференцированных энтероцитов клетки промывали 1× DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома, как описано ранее [16].

Исследование влияния покрытия мембраны коллагеном IV и ламинином 332 на пролиферацию клеток Caco-2

Поверхность мембранных вставок Transwell 96-луночного планшета Corning покрывали коллагеном IV и ламинином 332. Для этого в соответствующие вставки вносили 50 мкл раствора коллагена IV в DPBS (0,1 мг/мл) или 57 мкл раствора ламинина 332 в DPBS (0,01 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч в при 4 °C. Затем вставки отмывали от несвязавшегося компонента внеклеточного матрикса и заполняли лунки планшета питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру). Планшет помещали в клеточный инкубатор (5% CO₂, 37 °C) и инкубировали 1 ч. После инкубации среду из мембранных вставок отбирали и вносили 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 5000, 10 000 или 20 000 клеток, инкубировали в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в течение 96 ч. После культивирования в среду добавлялся реагент MTS в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Затем проводили измерение оптической плотности раствора при длине волны 590 нм.

Измерение импедансных спектров и вычисление электрических параметров

Измерение импедансных спектров проводили в диапазоне частот от 40 до 20 000 Гц при помощи системы импедансной спектроскопии («БиоКлиникум»; Россия) и

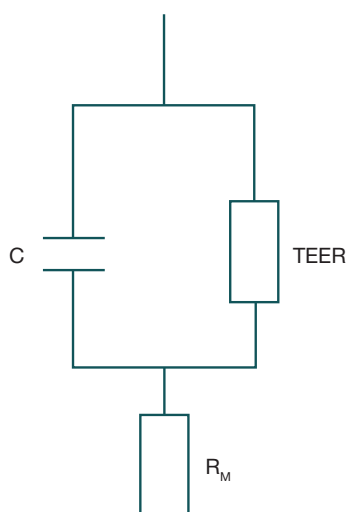


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема, использованная для вычисления основных электрических параметров монослоя клеток

электрода STX100C96 (World Precision Instruments; США) при комнатной температуре. Для получения средних значений электрических параметров использовали три независимые мембранные вставки с клетками. Расчет основных электрических параметров клеточного монослоя (трансэпителиального электрического сопротивления TEER (transepithelial electrical resistance), электрической емкости C, фонового сопротивления RM) проводили при помощи программного обеспечения CEISA Impedance fitting («БиоКлиникум»; Россия) по эквивалентной электрической схеме монослоя клеток (рис. 1). Дальнейшую статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с графической оболочкой RStudio. Для оценки статистической значимости наблюдаемых различий TEER применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Анализ транскриптомов

Анализ транскриптомов проводили с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 для мРНК и Gene Chip miRNA 4.0 для микроРНК (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [16]. Значение параметра качества RIN (RNA integrity number) для всех исследуемых образцов было выше 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов, гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили по методике производителя. CEL-файлы, полученные при сканировании микрочипов, обрабатывали с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Для каждого гена на микрочипе представлено несколько проб к разным участкам гена, которые вместе формируют набор проб (или пробсет). Наборы проб на микрочипе, не соответствующие ни одному из известных на сегодняшний момент генов (неаннотированные наборы проб), из анализа были исключены. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе было выбрано значение 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили, как описано ранее [16]. Детекцию накопления ПЦР-продукта в режиме реального времени проводили на основании разгорания флуоресценции SYBR Green I. В качестве референсных использовали транскрипты генов *ACTB* и *GAPDH* (средние значения пороговых циклов: 25,3 и 23,4 соответственно). Нуклеотидные последовательности праймеров («Синтол»; Россия) представлены в табл. 1.

Анализ протеомов клеток Caco-2

Подготовку проб клеток линии Caco-2, экстракцию тотального белка, гидролитическое расщепление и последующие процедуры проводили, как подробно описано ранее [16]. После трипсинолиза надосадочную жидкость анализировали на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Fisher Scientific; США) при напряжении на эмиттере 2,1 кВ и температуре капилляра 240 °C. Количественную оценку содержания

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ. Нуклеотидные последовательности приведены в направлении от 5'-к 3'-концу

Обозначение гена	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>DDIT4</i>	gtttgaccgctccacgagcc	cgaagtcgggcaacgacacc
<i>EGLN1</i>	gacctgatacgcactgtaac	cggataacaagcaaccatg
<i>ITGA2</i>	gccataatccaagagtgtgtt	tattttctgcatattgaattgcttc
<i>ITGA5</i>	agagctacgggccaagctaa	ttcccataaagtttggtccac
<i>LDHA</i>	atgggtgggtccttggggaa	tagcccaggatgtgtagccttga
<i>PFKFB3</i>	acgcctgtcgttatggctg	ggcttttgggtgggtcgggg
<i>SLC2A1</i>	gcagatgatcgaggagaagaaggt	atgaggatgggtggcggttag
<i>SLC2A3</i>	tggtttatttggccgaactc	ggtaatgaggaagccgggtga
<i>VEGFA</i>	tggcagaaggaggaggcgag	aggggcacacaggatggctt
<i>GAPDH</i>	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatgggtgatggatttc
<i>ACTB</i>	ctggaacggtgaaggtgaca	aagggactcctgtaacaacgca

белков проводили с использованием программного обеспечения Progenesis IQ (Waters; США), с параметрами, предлагаемыми производителем. Идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 и базы данных HumanDB (UniProt Release 2018_05) со следующими поисковыми параметрами: расщепляющий фермент — трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS (тандемного масс-спектрометрического анализа) ± 25 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления. Для оценки дифференциально экспрессированных белков полученные первичные данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant 1.6 (Max-Planck-Institute of Biochemistry; Германия) (алгоритм iBAQ). Дальнейшую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Perseus и языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1 (R-Tools Technology; США). Для определения статистической достоверности наблюдаемых различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Статистическая обработка данных

Исходные данные анализа микрочипов нормировали с использованием пакета *oligo* для языка программирования R [17]. Полученные данные логарифмировали по основанию 2. Анализ дифференциальной экспрессии генов и микроРНК проводили с помощью *t*-критерия



Рис. 2. Результаты оценки жизнеспособности клеток Caco-2 после 96 ч культивирования в мембранных вставках без покрытия белками, покрытых коллагеном IV и ламинином 332

Стьюдента. Поправку на множественную проверку гипотез осуществляли с помощью метода False Discovery Rate (FDR), представленного процедурой Бенджамини-Хохберга [18]. Для оценки индекса ложноположительности микроРНК использовали алгоритм, описанный ранее [19].

Функциональную аннотацию генов производили с помощью баз данных и алгоритмов DAVID версии 6.8 [20]. Валидированные взаимодействия микроРНК и генов-мишеней были экспортированы из базы данных DIANA-TarBase версии 8 [21]. Предсказание позиций связывания микроРНК на 3'-нетранслируемых областях мРНК-мишеней производили с помощью miRWalk [22]. Для поиска интронных микроРНК и их хост-генов использовали базу данных miRADI [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обработка CoCl_2 имитирует гипоксию в клетках Caco-2 и вызывает рост экспрессии генов α -субъединиц интегринов

Из литературных данных известно, что покрытие мембраны, на которой происходит культивирование клеток Caco-2, белками внеклеточного матрикса, такими как коллагены и ламинины [24], может существенно влиять на скорость образования монослоя и дифференцировки данных клеток. Поэтому при оптимизации условий культивирования клеток, входящих в состав микрофлюидной модели кишечного барьера, было оценено влияние покрытия мембраны коллагеном IV и ламинином 332 на пролиферацию клеток Caco-2. Исследование проводили с использованием мембранных вставок Transwell Corning. Покрытие мембраны ламинином 332 позволяло более чем в два раза повысить пролиферацию клеток Caco-2 (рис. 2). Поэтому для дальнейшей работы были выбраны условия культивирования с предварительным покрытием мембраны ламинином 332.

Для имитации гипоксии клетки Caco-2 обрабатывали CoCl_2 (см. Материалы и методы). Влияние гипоксии на состояние монослоя клеток оценивали с помощью импедансной спектроскопии. Импедансная спектроскопия — это измерение импеданса (полного электрического сопротивления переменному синусоидальному току) при разных частотах электрического тока (см. Материалы и методы) [25]. Возможность и информативность применения импедансной спектроскопии для указанных задач подробно описана ранее [25]. Средние значения TEER как при гипоксии, так и при нормоксии были

выше 3000 Ом (соответствует удельному сопротивлению 429 Ом·см²). Значения TEER зависят как от внутриклеточного сопротивления, которое обусловлено состоянием трансмембранных каналов, проводящих ионы через клетку, так и от состояния межклеточных плотных контактов, отвечающих за парацеллярное сопротивление. Например, известно, что значения TEER сильно падают при понижении концентрации кальция в среде, так как эти ионы необходимы для поддержания нормальной структуры плотных контактов. В то же время, при гибели клеток нарушается целостность мембраны и сильно снижается внутриклеточное сопротивление. Наблюдаемые высокие значения TEER на протяжении всего эксперимента свидетельствуют об интактном состоянии плотных контактов и об отсутствии выраженной цитотоксичности, приводящей к гибели клеток (рис. 3).

С помощью микрочипов Affymetrix (TermoFisher Scientific-Affymetrix; США) провели анализ транскриптомов обработанных и контрольных клеток. В обработанных CoCl_2 образцах выявлен значимый рост экспрессии генов, вовлеченных в ответ на гипоксию в соответствии с [26], полученные изменения валидированы с помощью ПЦР-РВ (табл. 2). Всего с помощью микрочипов значимые изменения экспрессии (в два и более раз; $\text{FDR} < 0,05$) выявлены у 165 генов. Их функциональная аннотация с помощью баз данных и алгоритмов DAVID [20] показала значимое обогащение для сигнального пути HIF-1 (KEGG-путь hsa04066, HIF-1 signaling pathway), опосредующего ответ на гипоксию (табл. 3). Та же функциональная аннотация не выявила обогащения генов антиоксидантной защиты (GO:0016209, antioxidant activity). Масс-спектрометрический анализ протеома обработанных и контрольных клеток также не смог выявить существенный рост количества четырех белков, кодируемых генами HIF-1 сигнального пути: *ENO2* в 19,6, *HMOX1* в 29,1, *PDK1* в 2,8 и *SLC2A1* в 2,2 раза соответственно. Всего в ходе протеомного анализа было выявлено 120 белков, значимо изменивших свою экспрессию в условиях имитации гипоксии.

При сравнении транскриптомов обработанных CoCl_2 и контрольных клеток обнаружено значимое увеличение экспрессии двух генов, кодирующих α -субъединицы интегринов: в условиях имитации гипоксии экспрессия гена *ITGA2* возросла в 3,2 ($p = 0,02$), а *ITGA5* — в 1,9 раза ($p = 0,0088$). Изменения также были валидированы с помощью ПЦР-РВ: экспрессия *ITGA2* и *ITGA5* возросла в 3,5 и 2,0 раза соответственно. У генов β -субъединиц рост экспрессии обнаружен не был. При анализе протеомов из всех β -субъединиц были детектированы только $\beta 1$ - и $\beta 4$ -субъединицы, и их экспрессия в условиях гипоксии не изменилась. В клетках Caco-2 эти две субъединицы составляют более 90% от общего количества β -субъединиц [14]. α -Субъединицы детектированы в протеоме не были. Вероятно, это связано с недостаточной чувствительностью использованного нами анализа. Кроме того, ранее показано, что в клетках Caco-2 количество $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц соответственно в 10 и 100 раз ниже, чем количество $\beta 1$ -субъединиц [14]. Важно, что при культивировании клеток Caco-2 в микрофлюидном чипе экспрессия в *ITGA5*, наоборот, снижалась в 2,1 раза. Наблюдалось также уменьшение в 1,6 раза экспрессии гена *LAMA1*, кодирующего $\alpha 1$ -цепь ламининов, которая в норме отсутствует в здоровом кишечнике. Это свидетельствует о создании более физиологических условий для клеток кишечника в микрофлюидном чипе. Отметим, что достоверных изменений генов, вовлеченных

в ответ на гипоксию и в сигнальные пути HIF-1, по сравнению со статическими условиями, обнаружено не было.

Изменение экспрессии гена *ITGA5* сопровождается измененной экспрессией регулирующих его микроРНК

Для поиска возможных причин изменения экспрессии генов субъединиц интегринов *ITGA2* и *ITGA5* в ответ на имитацию гипоксии был проведен анализ микроРНК, осуществляющих регуляцию данных генов. С помощью микроРНК-микрочипов Affymetrix проанализировали микроРНК-транскриптомов обработанных CoCl_2 и контрольных клеток. Экспрессия девяти микроРНК была значимо изменена при имитации гипоксии. Две из них, hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p, оказались экспериментально подтвержденными регуляторами экспрессии гена *ITGA5* [27, 28]. При этом в состоянии гипоксии их экспрессия уменьшилась в 2,2 и в 2,1 раза ($p = 0,046$) соответственно, что противоположно изменению экспрессии их гена-мишени *ITGA5*.

Анализ позиций связывания данных микроРНК с 3'-нетранслируемой областью мРНК *ITGA5* показал, что обе микроРНК имеют полную комплементарность с мРНК-мишенью в области seed region (нуклеотиды 2-7/8 микроРНК) (рис. 4). Полная комплементарность в этом регионе является необходимым условием эффективного взаимодействия микроРНК и мРНК. Более того, обе микроРНК способны комплементарно взаимодействовать с мРНК *ITGA5* и вне seed region, что дополнительно повышает прочность связывания (см. рис. 4).

Гены обеих микроРНК локализованы в интронах: hsa-miR-23b-5p расположена в интроне гена *AOPEP*, hsa-miR-766-3p — в интроне гена *SEPTIN6*. Интересно, что в условиях моделирования гипоксии экспрессия данных хост-генов значимо не изменилась. Это может свидетельствовать о наличии у данных микроРНК независимых промоторов, что было ранее обнаружено для многих микроРНК, кодируемых интронами [29].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В условиях гипоксии, имитированной с помощью обработки хлоридом кобальта (II) клеток аденокарциномы

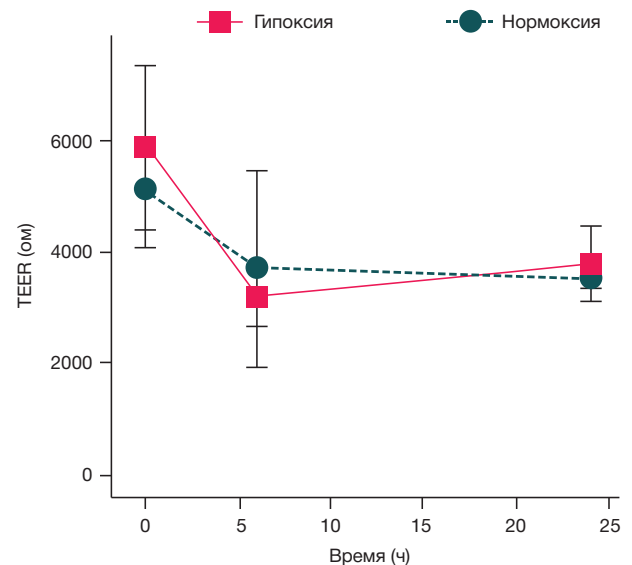


Рис. 3. Зависимость трансэпителиального сопротивления (TEER) от времени при нормоксии и гипоксии

Таблица 2. Дифференциальная экспрессия генов, вовлеченных в ответ на гипоксию*

Ген	ПЦР-РВ	Микрочипы
	Изменение экспрессии**	Изменение экспрессии**
<i>DDIT4</i>	2.7	2.4
<i>EGLN1</i>	3.4	2.7
<i>LDHA</i>	4	2.0
<i>PFKFB3</i>	4.3	2.1
<i>SLC2A1</i>	2.1	3.1
<i>SLC2A3</i>	6.1	3.0
<i>VEGFA</i>	2.4	1.4

Примечание: * — для анализа список генов, вовлеченных в ответ на гипоксию, сформирован на основании более ранних результатов [26]. ** — показано отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) в условиях моделирования гипоксии к контрольным образцам ($p < 0,05$ в ПЦР-РВ и микрочипах). Экспрессия всех представленных генов была увеличена при имитации гипоксии по отношению к контрольным образцам.

толстого кишечника Caco-2, обнаружен рост экспрессии генов, вовлеченных в сигнальный путь HIF-1. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными об изменении транскриптома при воздействии хлорида кобальта на клеточные линии Caco-2 [30] и Caki-1 [31].

При моделировании гипоксии было выявлено значимое повышение экспрессии генов *ITGA2* и *ITGA5*. Данные гены кодируют субъединицы $\alpha 2$ и $\alpha 5$ интегрина рецепторов. Поскольку значимых изменений экспрессии β -субъединиц обнаружено не было, можно полагать, что в условиях гипоксии возросла доля рецепторов, содержащих $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединицы. Нами обнаружено, что в статических условиях выращивания в клетках Caco-2 экспрессия *ITGA5* была в 2,1 раза выше, чем при культивировании этих клеток в микрофлюидном чипе. Благодаря микроциркуляции создаются более близкие к физиологическим условия и улучшается снабжение клеток питательными веществами. Таким образом, изменение профиля интегрина рецепторов (увеличение доли $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц) может быть реакцией клеток Caco-2 на ухудшение условий роста. В данной работе нами обнаружены возможные регуляторы изменения экспрессии *ITGA2* и *ITGA5* — микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p. Их экспрессия снижалась в условиях гипоксии. Стоит отметить, что помимо активности данных микроРНК могут присутствовать кофакторы, способствующие увеличению экспрессии *ITGA2* и *ITGA5*, например факторы транскрипции, регулирующие эти гены, экспрессия которых также была дифференциально изменена.

Существующая литература содержит небольшое количество информации о двух обнаруженных микроРНК. Так, известно, что уменьшение экспрессии hsa-miR-766-3p приводит к повышенной пролиферативной активности злокачественных клеток почки [32] и агрессивности

гепатоцеллюлярной карциномы [33]. Пониженная экспрессия hsa-miR-23b-5p приводит к повышенной пролиферативной и миграционной активности клеток аденокарциномы легкого [34].

Для выполнения функции рецептора цепи интергинов должны образоваться $\alpha\beta$ -гетеродимер. В клетках эпителия кишечника для $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -цепей одним из основных партнеров является $\beta 1$ -цепь. Основными лигандами интегрина рецептора $\alpha 2\beta 1$ являются ламинин, коллаген и эпителиальный кадгерин, а рецептор $\alpha 5\beta 1$ связывается с фибронектином [35]. Эти белки, в свою очередь, служат лигандами бактериальных адгезинов. Например, адгезин YadA, расположенный на внешней мембране грамотрицательных бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* (возбудителей тяжелых зоонозных заболеваний: псевдотуберкулеза и иерсениоза), связывается с коллагеном, ламинином и фибронектином [36]. Кроме того, белок инвазин, расположенный на внешней мембране патогенных бактерий рода *Yersenia*, селективно связывается с интегринами рецепторами семейства $\beta 1$, что приводит к транслокации бактерий через клетки эпителиального слоя [37]. Отметим, что имитация гипоксии миметиком DMOG в одном из исследований сопровождалась снижением чувствительности клеток Caco-2 к *Yersinia enterocolitica* при культивировании на пластиковой подложке [38], что авторы связывали со снижением экспрессии $\beta 1$ -цепи интегринов. В нашем исследовании при культивировании клеток на проницаемой мембранной вставке экспрессия $\beta 1$ -цепи интегринов не менялась, что, по-видимому, указывает на важность условий культивирования клеток при проведении подобных экспериментов. Нельзя, однако, исключать и различие специфического влияния конкретного миметика гипоксии.

Таблица 3. Дифференциальная экспрессия генов сигнального пути HIF-1

Ген	Изменение экспрессии*	p -value	FDR
<i>PFKFB3</i>	2,1	0,00016	0,0038
<i>ENO2</i>	3,0	0,00028	0,0043
<i>HMOX1</i>	2,5	0,0053	0,012
<i>HK2</i>	3,8	0,0077	0,013
<i>EGLN1</i>	2,7	0,014	0,018
<i>PDK1</i>	3,9	0,015	0,019
<i>ENO1</i>	2,3	0,018	0,022
<i>SLC2A1</i>	3,1	0,019	0,022

Примечание: * — приведено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) в условиях моделирования гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью микрочипового транскриптомного анализа.

Таким образом, гипоксия энтероцитов кишечника, недостаточное снабжение их питательными веществами и избыток продуктов обмена приводят к изменению профиля экспрессии интегринов, что может способствовать повышению восприимчивости к ряду бактериальных патогенов. Регуляторами этого процесса могут служить микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p.

ВЫВОДЫ

Использование хлорида кобальта (II) позволило смоделировать гипоксию в клеточных линиях Caco-2. Результаты транскриптомного анализа продемонстрировали активацию ключевых участников сигнального пути HIF-1 и изменение профиля экспрессии интегринов в энтероцитах кишечника. Возможными регуляторами этого процесса могут служить микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p, экспрессия которых при имитации гипоксии уменьшилась в 2,2 и 2,1 раза соответственно. Использование условий

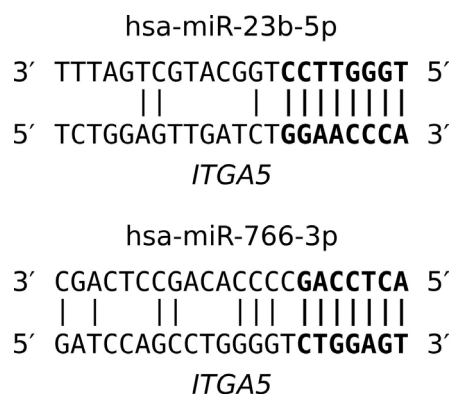


Рис. 4. Позиции связывания микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p с 3'-нетранслируемой областью мРНК ITGA5

микроциркуляции имеет обратное действие в отношении экспрессии *ITGA5* и не оказывает воздействия на экспрессию генов сигнального пути HIF-1.

Литература

- Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol. Academic Press*; 2016; 420 (2): 262–70.
- Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect. Elsevier Masson*; 2017; 19 (3): 210–21.
- Ward JBJ, Keely SJ, Keely SJ. Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport. *J Physiol. John Wiley & Sons, Ltd*; 2014; 592 (12): 2473–89.
- Pavlacky J, Polak J. Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front Endocrinol (Lausanne). Frontiers*; 2020; 11: 57.
- Poloznikov AA, Zakhariants AA, Nikulin S V, Smirnova NA, Hushpulian DM, Gaisina IN, et al. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide “tail”. *Biochimie*. 2017; 133: 74–9.
- Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019; 39 (4): 556–70.
- Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. Maki CG, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2014; 9 (6): e99143.
- Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem. Urban & Fischer*; 2016; 51 (3–4): 33–49.
- Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*. 2013; 4 (June): 119.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Turchinovich A, Knyazev E, Tonevitsky A. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PLoS One*. 2020; 15 (7 July).
- Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol. BioMed Central*; 2019; 13 (S1): 19.
- Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog. American Chemical Society (ACS)*; 2006; 22 (1): 186–98.
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics. BioMed Central*; 2007; 8 (1): 91.
- Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P. The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. *J Pharm Sci. Elsevier*; 2016; 105 (2): 817–27.
- Beaulieu J-F. Integrins and human intestinal cell functions [Internet]. *Front Biosci*. 1999.
- Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the α5 laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie. Elsevier*; 2020; 174: 107–16.
- Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics. Oxford Academic*; 2010; 26 (19): 2363–7.
- Yoav B, Yosef H. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc*. 1995; 57 (1): 289–300.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. A post-processing algorithm for miRNA microarray data. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020; 21 (4): 1228.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc. Nature Publishing Group*; 2009; 4 (1): 44–57.
- Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res. Oxford Academic*; 2018; 46 (D1): D239–45.
- Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *Campbell M, editor. PLoS One. Public Library of Science*; 2018; 13 (10): e0206239.
- Hinske LC, França GS, Torres HAM, Ohara DT, Lopes-Ramos CM, Heyn J, et al. miRIAD — integrating microRNA inter- and intragenic data. *Database. Oxford Academic*; 2014; 2014.
- Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*; 1992; 90 (1): 15–23.
- Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol. Frontiers*; 2020; 7: 474.
- Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (14): 4587–602.

27. Karginov F V, Hannon GJ. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013; 27 (14): 1624–32.
28. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Kabos P, et al. Genome-wide analysis of miRNA-mRNA interactions in marrow stromal cells. *Stem Cells.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 32 (3): 662–73.
29. Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018; 24 (8): 991–1004.
30. Calvo-Anguiano G, Lugo-Trampe J, Camacho A, Said-Fernández S, Mercado-Hernández R, Zomosa-Signoret V, et al. Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. *Exp Ther Med.* Spandidos Publications; 2018; 15 (6): 4777–84.
31. Zhigalova N, Artemov A, Mazur AM, Prokhortchouk EB. Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl₂ treatment. *F1000Research.* F1000 Research Limited; 2015; 4: 1518.
32. Chen C, Xue S, Zhang J, Chen W, Gong D, Zheng J, et al. DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2017; 141 (9): 1867–78.
33. You Y, Que K, Zhou Y, Zhang Z, Zhao X, Gong J, et al. MicroRNA-766-3p inhibits tumour progression by targeting Wnt3a in hepatocellular carcinoma. *Molecules and Cells.* Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 41 (9): 830–41.
34. Hu G, Wang C, Wang H, Wang Y, Hu S, Cao Z, et al. Long noncoding RNA CCAT2 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXC1 expression by sponging miR-23b-5p in lung adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* John Wiley & Sons, Ltd; 2019; 120 (5): 7998–8007.
35. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007; 8 (5): 215.
36. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2006; 103 (9): 3375–80.
37. Isberg RR, Leong JM. Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* Cell Press; 1990; 60 (5): 861–71.
38. Zeitouni NE, Dersch P, Naim HY, von Kückritz-Blickwede M. Hypoxia decreases invasins-mediated Yersinia enterocolitica internalization into Caco-2 cells. *Karhausen J, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2016; 11 (1): e0146103.

References

1. Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol.* Academic Press; 2016; 420 (2): 262–70.
2. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* Elsevier Masson; 2017; 19 (3): 210–21.
3. Ward JBJ, Keely SJ, Keely SJ. Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport. *J Physiol.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 592 (12): 2473–89.
4. Pavlacký J, Polak J. Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front Endocrinol (Lausanne).* Frontiers; 2020; 11: 57.
5. Poloznikov AA, Zakhariants AA, Nikulin S V, Smirnova NA, Hushpulian DM, Gaisina IN, et al. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide “tail”. *Biochimie.* 2017; 133: 74–9.
6. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 2019; 39 (4): 556–70.
7. Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *Maki CG, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2014; 9 (6): e99143.
8. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem.* Urban & Fischer; 2016; 51 (3–4): 33–49.
9. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet.* 2013; 4 (June): 119.
10. Nersisyan S, Shkurnikov M, Turchinovich A, Knyazev E, Tonevitsky A. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PLoS One.* 2020; 15 (7 July).
11. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol.* BioMed Central; 2019; 13 (S1): 19.
12. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* American Chemical Society (ACS); 2006; 22 (1): 186–98.
13. Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics.* BioMed Central; 2007; 8 (1): 91.
14. Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P. The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. *J Pharm Sci.* Elsevier; 2016; 105 (2): 817–27.
15. Beaulieu J-F. Integrins and human intestinal cell functions [Internet]. *Front Biosci.* 1999.
16. Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the α 5 laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie.* Elsevier; 2020; 174: 107–16.
17. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics.* Oxford Academic; 2010; 26 (19): 2363–7.
18. Yoav B, Yosef H. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc.* 1995; 57 (1): 289–300.
19. Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. A post-processing algorithm for miRNA microarray data. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020; 21 (4): 1228.
20. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2009; 4 (1): 44–57.
21. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic; 2018; 46 (D1): D239–45.
22. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *Campbell M, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2018; 13 (10): e0206239.
23. Hinske LC, França GS, Torres HAM, Ohara DT, Lopes-Ramos CM, Heyn J, et al. miRIAD — integrating microRNA inter- and intragenic data. *Database.* Oxford Academic; 2014; 2014.
24. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1992; 90 (1): 15–23.
25. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol.* Frontiers; 2020; 7: 474.
26. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (14): 4587–602.
27. Karginov F V, Hannon GJ. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates

- with altered translation rates. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013; 27 (14): 1624–32.
28. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Kabos P, et al. Genome-wide analysis of miRNA-mRNA interactions in marrow stromal cells. *Stem Cells.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 32 (3): 662–73.
 29. Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018; 24 (8): 991–1004.
 30. Calvo-Anguiano G, Lugo-Trampe J, Camacho A, Said-Fernández S, Mercado-Hernández R, Zomosa-Signoret V, et al. Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. *Exp Ther Med.* Spandidos Publications; 2018; 15 (6): 4777–84.
 31. Zhigalova N, Artemov A, Mazur AM, Prokhortchouk EB. Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl₂ treatment. *F1000Research.* F1000 Research Limited; 2015; 4: 1518.
 32. Chen C, Xue S, Zhang J, Chen W, Gong D, Zheng J, et al. DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2017; 141 (9): 1867–78.
 33. You Y, Que K, Zhou Y, Zhang Z, Zhao X, Gong J, et al. MicroRNA-766-3p inhibits tumour progression by targeting Wnt3a in hepatocellular carcinoma. *Molecules and Cells.* Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 41 (9): 830–41.
 34. Hu G, Wang C, Wang H, Wang Y, Hu S, Cao Z, et al. Long noncoding RNA CCAT2 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXC1 expression by sponging miR-23b-5p in lung adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* John Wiley & Sons, Ltd; 2019; 120 (5): 7998–8007.
 35. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007; 8 (5): 215.
 36. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2006; 103 (9): 3375–80.
 37. Isberg RR, Leong JM. Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* Cell Press; 1990; 60 (5): 861–71.
 38. Zeitouni NE, Dersch P, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Hypoxia decreases invasin-mediated Yersinia enterocolitica internalization into Caco-2 cells. *Karhausen J, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2016; 11 (1): e0146103.

АНАЛИЗ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *ADRB2* С ОТВЕТОМ НА β_2 -АГОНИСТЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕДКИМ ТЕРАТИПОМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Д. С. Мдинарадзе, И. Б. Козлов, К. С. Павлова , И. А. Кофиади, О. М. Курбачева

Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Стандартная терапия бронхиальной астмы (БА) включает назначение β_2 -агонистов. Изменение функциональной активности β_2 -адренорецептора ассоциировано с полиморфизмом гена *ADRB2* и связано с низким терапевтическим ответом на β_2 -агонисты. Выявление носителей клинически значимых вариантов гена поможет избежать неэффективного лечения и послужит основанием для назначения альтернативной терапии. Целью исследования было оценить клиническую значимость ассоциированных с терапевтическим ответом на β_2 -агонисты полиморфных вариантов гена *ADRB2* (Arg16Gly и Gln27Glu) для группы пациентов с БА. Проведено клиническое и генетическое обследование небольшой группы взрослых некурящих пациентов ($n = 21$) с БА средней степени тяжести (III–IV ступень по GINA), в том числе пациентов нового типа, для которых характерны плохой ответ на β_2 -адренергические средства, но значимый ответ на М-холинергические средства. В первую группу были определены пациенты с подтвержденной эффективностью применения салбутамола, которые в то же время имели хороший ответ на ипратропия бромид. Во вторую группу вошли пациенты с низкой эффективностью терапии салбутамолом и положительным тестом с ипратропия бромидом. Анализ распределения полиморфных вариантов Arg16Gly и Gln27Glu показал отсутствие достоверной связи аллелей и генотипов с эффективностью применения β_2 -агонистов (0,52 — для варианта rs1042713, $p = 1,0$; и 1,0 — для варианта rs1042714, $p = 0,74$ соответственно). При этом пациенты с отсутствием ответа на салбутамол имели генотип либо Arg16Gly, либо Gly16Gly. Необходимы дальнейшие исследования с большим числом пациентов и расширением перечня тестируемых полиморфных вариантов.


Ключевые слова: бронхиальная астма, контроль астмы, полиморфизм генов, β_2 -адренорецепторы, *ADRB2*, Arg16, Gly16, бронхолитические средства, короткодействующие β_2 -агонисты, КДБА, короткодействующие антихолинергические препараты, КДХП, длительно действующие антихолинергические препараты.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-90076.

Благодарности: благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия) за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Вклад авторов: Д. С. Мдинарадзе, К. С. Павлова, О. М. Курбачева — подбор пациентов, проведение клинических лабораторных и инструментальных обследований, забор биологического материала; И. Б. Козлов, И. А. Кофиади — разработка новой тест-системы для анализа полиморфных вариантов гена *ADRB2* методом ПЦР, проведение генетического обследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института иммунологии Федерального медико-биологического агентства (протокол № 13 от 16 октября 2017 г.); все пациенты подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Ксения Сергеевна Павлова
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115522; ksenimedic@gmail.com

Статья получена: 25.11.2020 **Статья принята к печати:** 09.12.2020 **Опубликована онлайн:** 26.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.083

ANALYSIS OF THE POLYMORPHIC VARIANTS OF *ADRB2* GENE ASSOCIATION WITH THE β_2 -AGONISTS RESPONSE IN PATIENTS WITH A RARE THERATYPE OF ASTHMA

Mdinardze DS, Kozlov IB, Pavlova KS , Kofiadi IA, Kurbacheva OM

National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Standard asthma therapy includes prescription of β_2 -agonists. Changes in the functional activity of β_2 -adrenergic receptor are associated with *ADRB2* gene polymorphism and related to the low therapeutic response to β_2 -agonists. Identification of carriers of the clinically significant gene variants will help to avoid ineffective treatment and prescribe an alternative therapy. This study aimed to assess clinical significance of the *ADRB2* gene polymorphisms (Arg16Gly and Gln27Glu) associated with the therapeutic response to β_2 -agonists in the group of asthma patients. We subjected a small group of adult nonsmoking patients ($n = 21$) with moderate asthma (III–IV stage of GINA) to clinical and genetic examination. The group included patients with the new theratype, those that poorly respond to β_2 -adrenergic drugs but significantly to M-cholinergic agonists. The first group included patients responding well to both salbutamol and ipratropium bromide. The second group was comprised of the patients for whom salbutamol was not effective but who tested positive for response to ipratropium bromide. The analysis of distribution of polymorphic variants of Arg16Gly and Gln27Glu revealed no significant relationship between alleles and genotypes and the efficacy of β_2 -agonists (0.52 for the rs1042713 variant, $p = 1.0$; 1.0 for the rs1042714 variant, $p = 0.74$, respectively). The genotype of patients that did not respond to salbutamol was either Arg16Gly or Gly16Gly. Further studies are needed that would involve a larger number of patients and an expanded list of the tested polymorphic variants.


Keywords: asthma, asthma control, gene polymorphism, β_2 -adrenergic receptors, *ADRB2*, Arg16, Gly16, bronchodilators, short-acting β_2 -agonists, SABA, short-acting anticholinergics, SAMA, long-acting anticholinergics, LABA

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research as part of the Project #19-33-90076.

Acknowledgments: we would like to thank the Biomedicine Center for High-Precision Editing and Genetic Technologies of Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia) for access to the molecular genetics systems.

Author contribution: Mdinardze DS, Pavlova KS, Kurbacheva OM — selection of patients, clinical laboratory and instrumental examinations, collection of biological material; Kozlov IB, Kofiadi IA — development of the new PCR test system for analysis of the *ADRB2* gene polymorphic variants, genetic testing execution.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency (Minutes #13 of October 16, 2017); all patients signed voluntary consent to participate in the study.

 **Correspondence should be addressed:** Ksenia S. Pavlova
Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115522; ksenimedic@gmail.com

Received: 25.11.2020 **Accepted:** 09.12.2020 **Published online:** 26.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.083

Персонализированная медицина позволяет с помощью современных молекулярно-генетических технологий (фармакогенетическое тестирование, выявление геномных и транскриптомных биомаркеров) индивидуализировать выбор лекарственного средства [1]. Значительный интерес в этом смысле представляет бронхиальная астма (БА), поскольку и сама патология, и реакция на терапию БА имеют в своей основе существенный генетический компонент [2–5]. Так, изменение функциональной активности β_2 -адренорецептора (*ADRB2*), связанное с полиморфизмом кодирующего его гена, может приводить к низкому фармакологическому ответу на β_2 -агонисты, составляющему основу терапии БА [6, 7].

По данным базы Ensembl [8], ген *ADRB2* весьма полиморфен и содержит в кодирующей части более 500 однонуклеотидных замен и инсерционно-делеционных полиморфизмов. Из них 276 представляют собой миссенс-мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания или возникновению стоп-кодона. С точки зрения ответа на противоастматическую терапию наиболее интересны три полиморфных варианта гена, для которых указана ассоциация с эффективностью ответа на β_2 -агонисты: Arg16Gly (rs1042713), Gln27Glu (rs1042714) и Thr164Ile (rs1800888). Однако ассоциации, установленные для этих молекулярно-генетических маркеров, демонстрируют плохую воспроизводимость в различных исследованиях [9–11]. В связи с этим вопрос о возможности клинического применения результатов генетического тестирования по полиморфным вариантам гена *ADRB2* до сих пор остается открытым [12–14].

Среди причин, по которым клинический эффект того или иного полиморфного варианта гена может не находить подтверждения в различных исследованиях, — популяционная гетерогенность, недостаточный объем выборки, неполная характеристика групп сравнения [15, 16]. Таким образом, необходимо дальнейшее изучение молекулярных механизмов патогенеза БА с привлечением к исследованию многочисленных когорт из различных популяций. Следует отметить, что в России такие работы практически не ведутся.

Несмотря на это клиницисты уже сегодня обладают опытом и необходимым инструментарием для использования фармакогенетического тестирования на практике. Представляется интересным подойти к вопросу установления клинической значимости генетических маркеров с другой стороны. Мы не ставили целью установление ассоциации маркера с признаком, а напротив, проверяли применимость маркеров с уже установленной ассоциацией для ограниченной, охарактеризованной нами с клинической точки зрения когорты пациентов [17]. Подтверждение значимости фармакогенетических маркеров для данной группы позволило бы уже сегодня использовать результаты генетического тестирования в качестве дополнительного обоснования при принятии решения о лечении пациентов, торпидных к стандартной терапии.

Таким образом, целью настоящего исследования было оценить клиническую значимость ассоциированных с терапевтическим ответом на β_2 -агонисты полиморфных вариантов гена *ADRB2* для группы пациентов с описанным нами ранее редким типом БА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Критерии включения пациентов в исследование: наличие подписанного информированного согласия на участие в

исследовании; возраст пациентов любого пола — 18 лет и старше; наличие тяжелой атопической бронхиальной астмы; длительность заболевания не менее двух лет; способность адекватно оценивать свои симптомы и соблюдать рекомендации; подтвержденная обратимость бронхиальной обструкции (после ингаляции 400 мкг салбутамола прирост ОФВ1 у пациента составляет 12% и 200 мл и более). Приемлемым считали наличие документально подтвержденной обратимости бронхиальной обструкции в пределах 12 месяцев до подписания информированного согласия.

Критерии исключения: острое инфекционное заболевание (до момента выздоровления), обострение сопутствующего хронического заболевания (до стабилизации состояния); наличие у пациента любого клинически значимого, неконтролируемого медицинского состояния, по поводу которого пациент получает или не получает лечение, и которое будет препятствовать соблюдению графика или процедур исследования, интерпретации данных по эффективности или представлять угрозу для безопасности данного пациента; наличие у пациента диагностированного злокачественного новообразования; развитие серьезного нежелательного явления в ходе проведения исследования.

В исследовании приняли участие взрослые некурящие пациенты ($n = 21$) русской этнической принадлежности обоего пола (8 мужчин и 13 женщин), средний возраст которых составил 53 года (минимальный — 47, максимальный — 63), страдающих БА средней степени тяжести (III–IV степень по GINA); средняя продолжительность заболевания составляла 13 лет (минимальная — 1 год, максимальная — 32 года). Всем пациентам в качестве основной терапии назначали ингаляционные кортикостероиды в средних или высоких дозах в сочетании с ДДБА, при этом контроль над симптомами БА у них отсутствовал или был неполным: присутствовала ежедневная потребность в симптоматической терапии; результаты теста по контролю астмы ACT (Asthma Control Test) составляли 15–20 баллов; объем форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) до использования бронхолитика достигал $70,6 \pm 5\%$ от нормальных величин. Пациенты были разделены на две группы. В первую ($n = 14$) были определены пациенты с клинически и инструментально подтвержденной эффективностью салбутамола (увеличение объема форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) — более 12% и более 200 мл после ингаляции 400 мкг салбутамола), которые в то же время имели хороший ответ на 50 мкг ипратропия бромид (КДБА+КДХП+). Во вторую группу ($n = 7$) вошли пациенты с низкой эффективностью лечения салбутамолом (прирост ОФВ1 менее 12% и менее 200 мл после ингаляции 400 мкг салбутамола) и положительным тестом (прирост ОФВ1 более 12% и более 200 мл через 30 мин) после ингаляции 50 мкг ипратропия бромид (КДБА-КДХП+).

Генетические маркеры

Ген *ADRB2* расположен на длинном плече хромосомы 5q32 рядом с кластером генов, кодирующих цитокины и глюкокортикоидный рецептор. *ADRB2* относится к генам рецепторных молекул, контролирующим лабильность бронхов [18].

Полиморфизм Arg16Gly (международный код полиморфизма: rs1042713) представляет собой однонуклеотидную замену в кодирующей области гена *ADRB2*, где происходит замена нуклеотида гуанина (G)

на аденин (А) (генетический маркер G46A). В результате данной замены в аминокислотной последовательности белка *ADRB2* в позиции 16 аргинин заменяется на глицин (Arg16Gly). Таким образом, возможны следующие варианты: Arg16Arg, Arg16Gly, Gly16Gly. В исследованиях *in vitro* было показано изменение функциональной активности *ADRB2* [19]. По некоторым результатам, больные, гомозиготные по этим вариантам гена, быстро теряют чувствительность к короткодействующим β_2 -агонистам (КДБА) и нуждаются в назначении гормональных препаратов [14].

Полиморфизм Glu27Gln (международный код полиморфизма: rs1042714) представляет собой однонуклеотидную замену цитозина на гуанин (генетический маркер C79G). В результате данной замены в аминокислотной последовательности белка *ADRB2* в позиции 27 глутамин заменяется на глутаминовую кислоту (Glu27Gln). В исследовании Martinez и соавторов было показано, что аллель Glu27 ассоциирован с пониженной чувствительностью дыхательных путей пациентов с БА к метахолину [20].

Очистка ДНК и проведение типирования

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Полученные образцы сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen; США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл. Анализ полиморфных вариантов rs1042713 и rs1042714 гена *ADRB2* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе «DTprime» («ДНК-Технология»; Россия) с использованием праймеров *ADRB2*-f: 5'-AGTGCCTCACCTGCCAGACTG-3' и *ADRB2*-r: 5'-CCAAACACGATGGCCAGGACGA-3'. Синтез праймеров осуществляли на твердой подложке с использованием инвертированных (5') фосфорамидитов и фоторазрушаемых линкеров. Последние использовали для снятия праймеров с твердой фазы за счет действия ультрафиолетового излучения.

Для определения генотипов использовали метод примыкающих зондов с модификациями [21]. Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в том числе использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами. Для амплификации использовали реакционную смесь объемом 35 мкл, которая содержала 2,5 мкл $10\times$ Taq-буфера (67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,01% Tween-20), 0,1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы («ДНК-Технология»; Россия) и 5–10 пМ локуспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов. Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^\circ\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакционной смеси повышали с 25 до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы MS Excel 2013 (Microsoft; США) с

использованием точного критерия Фишера для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов [24, 25]. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$. Частоту аллелей вычисляли по формуле:

$$f = n/2N * 100\%,$$

где n — встречаемость аллеля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены полиморфные варианты rs1042713 и rs1042714 (вариант rs1800888 не включен в исследование из-за низкой встречаемости [24, 25]). Для решения поставленной цели нами была разработана новая тест-система для анализа полиморфных вариантов гена *ADRB2* методом ПЦР в реальном времени и подтверждена ее работоспособность методом прямого определения последовательности (секвенирования) для гомозиготных и гетерозиготных образцов (рис. 1).

В ходе исследования нами были сформированы группы сравнения из пациентов Института иммунологии ФМБА России, относящихся к разным терапиям БА; проведены их генотипирование и анализ различий в представленности аллелей и генотипов в группах сравнения. Результаты генотипирования представлены в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено клиническое и генетическое обследование пациентов страдающих БА средней степени тяжести (III–IV ступень по GINA) с варибельным фармакологическим ответом на β_2 -агонисты, где КДБА+КДХП+ — пациенты с клинически и инструментально подтвержденной эффективностью сальбутамола, а КДБА–КДХП+ — пациенты, имевшие низкий ответ на сальбутамол и положительный ответ на ипратропия бромид. Подробная клиническая характеристика для групп пациентов, разных терапий была приведена нами ранее [17]. Определены аллели и генотипы пациентов по вариантам гена β_2 -адренорецептора *ADRB2* rs1042713 (Arg16Gly) и rs1042714 (Glu27Gln).

Полиморфизм Arg16Gly (rs1042713)

Среди пациентов КДБА+КДХП+ / КДБА–КДХП+ частота гетерозигот в группе с плохой эффективностью терапии сальбутамолом была в 1,5 раза больше по сравнению с пациентами с хорошим терапевтическим ответом. У пациентов обеих групп выявление аллелей Arg16 и Gly16 было отмечено с одинаковой частотой (см. табл.).

Показано, что полиморфизм Arg16Gly связан с десенситизацией рецептора *ADRB2*. Рецептор, имеющий в структуре Gly16Gly, в большей степени подвержен десенситизации эндогенными катехоламинами в сравнении с рецептором, имеющим в своей структуре Arg16Arg или Arg16Gly [26]. По данным литературы, выявлена варибельность ответа на применение β_2 -агонистов [27]. Наши данные частично согласуются с данными, согласно которым отсутствует терапевтический ответ на терапию ингаляционными β_2 -агонистами у больных БА с преобладанием аллеля Gly (генотипы Arg16Gly и Gly16Gly) [28]. В нашем исследовании пациенты с отсутствием ответа на сальбутамол в 100% случаев

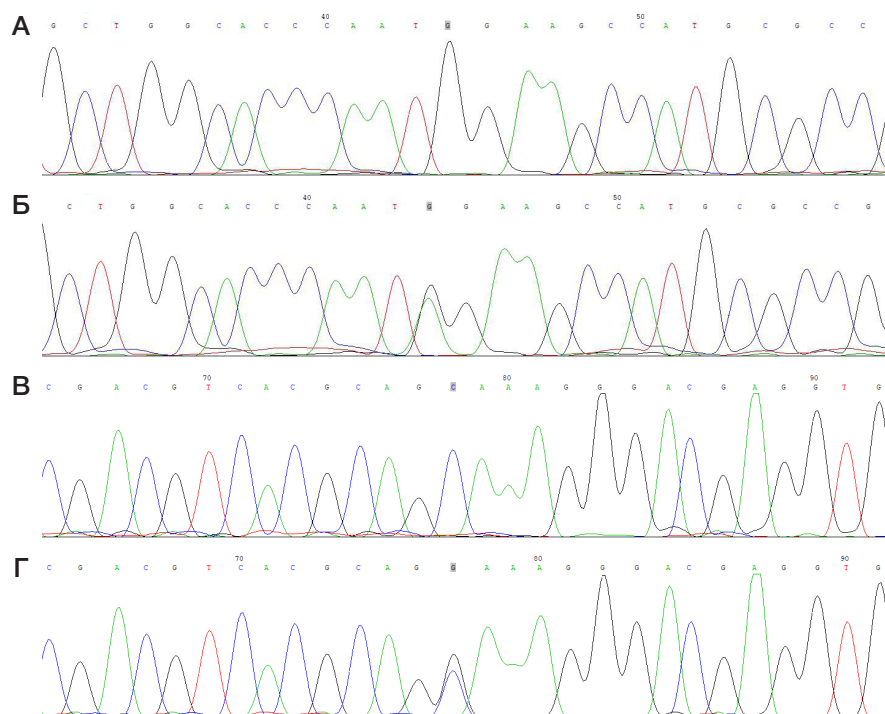


Рис. 1. Результаты секвенирования гомозиготных и гетерозиготных образцов. Варьирующие нуклеотиды выделены серым цветом. Гомозиготы характеризует единственный пик на хроматограмме в позиции полиморфизмов rs1042713 и 1042714 (**А** и **В** соответственно). Гетерозиготы характеризует двойной пик в позиции полиморфизмов rs1042713 и 1042714 (**Б** и **Г** соответственно)

имели либо генотип Arg16Gly, либо Gly16Gly, однако при оценке влияния аллеля Gly на плохой ответ на β_2 -агонисты мы такой связи не подтвердили (отношение шансов [OR] 1,00; 95% CI 0,26–3,81). Наиболее выраженный ответ на однократное введение β_2 -адреномиметика выявлен в группе пациентов, гомозиготных по Arg в положении 16 (Arg16Arg), по сравнению с гомозиготами по Gly в данном положении (генотип Gly16Gly) [20]. В другом исследовании тоже подтверждено, что генотип Arg16Arg ассоциируется с легкой формой БА и лучшим ответом на сальбутамол [29]. По нашим данным, в группе КДБА+КДХП+ с хорошим ответом на сальбутамол в 14% случаев тоже был выявлен генотип Arg16Arg (в группе с плохим ответом на сальбутамол такой генотип не встречался).

К сожалению, в связи с редкой встречаемостью терапии КДБА–КДХП+ среди пациентов с БА мы смогли включить в данную группу лишь небольшое число пациентов. Вероятно, дальнейшее выявление таких пациентов и проведение исследования на большей выборке позволят получить статистически значимые различия.

Полиморфизм Glu27Gln (rs1042714)

Распределение генотипов и аллелей для 27-й позиции среди пациентов КДБА+КДХП+ / КДБА–КДХП+ было практически идентичным и не имело статистически достоверных различий между этими двумя группами (см. табл.). При этом нами было выявлено относительно большее число гетерозигот Gln27Glu (64%) в группе КДБА+КДХП+ по сравнению с частотой 45,7%, установленной ранее для русской популяции [30], однако данное наблюдение требует подтверждения на большей выборке.

Ограниченность исследований, посвященных изучению полиморфизма Gln27Glu и вариабельности ответа на β_2 -агонисты, а также противоречивость этих результатов не позволяют соотнести полученные нами данные с литературными. В основном изучали распределение

частот генотипов при разной степени тяжести БА. Так, было показано преобладание генотипа Glu27Glu среди пациентов с тяжелой астмой (55 и 75% соответственно) [31, 32]. В другой работе у пациентов с БА распределение генотипов для 27-й позиции было следующим: Glu27Glu — 9,2%, Gln27Glu — 27,8%, Gln27Gln — 63%, при этом не было выявлено различий у пациентов с разной степенью тяжести и ответом на β_2 -агонисты [29]. Таким образом данные, полученные в настоящем исследовании, согласуются с данными [29] об отсутствии взаимосвязи ответа на β_2 -агонисты и полиморфизмом rs1042714 (Gln27Glu).

В проводимом исследовании мы не оценивали другие полиморфизмы гена ADRB2, способные влиять на вариабельность ответа на β_2 -агонисты. Возможно, что в основе плохого ответа на сальбутамол у пациентов с редким терапией КДБА–КДХП+ лежат иные, негенетические причины десенситизации гена ADRB2.

ВЫВОДЫ

Анализ распределения полиморфных вариантов rs1042713 (Arg16Gly) гена ADRB2 показал, что пациенты с отсутствием ответа на β_2 -агонисты (сальбутамол) в 100% случаев имели генотип Arg16Gly либо Gly16Gly, однако при оценке влияния наличия аллеля Gly на плохой ответ на β_2 -агонисты мы такой связи не подтвердили, что может быть обусловлено малочисленной выборкой. Мы не выявили различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов rs1042714 (Gln27Glu) при сравнении групп пациентов с различным клиническим ответом на β_2 -агонисты. Возможно, что дальнейшее исследование с включением большего числа пациентов с БА с редким терапией КДБА–КДХП+ позволит выявить статистически значимые различия в распределении полиморфных вариантов rs1042713 (Arg16Gly). В проведенном исследовании мы не оценивали возможное влияние

Таблица. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов rs1042713 (Arg16Gly) и rs1042714 (Gln27Glu) гена *ADRB2* у пациентов с БА и различными терапиями (КДБА+КДХП+ — пациенты с клинически и инструментально подтвержденной эффективностью салбутамола)

Группа пациентов, n (%)	Arg16Gly						
	Аллели			Генотипы			
	Arg	Gly	p-value	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly16Gly	p-value
КДБА+КДХП+ (n = 14)	10 (36%)	18 (64%)	1	2 (14%)	6 (43%)	6 (43%)	0,52
КДБА-КДХП+ (n = 7)	5 (36%)	9 (64%)		0	5 (71%)	2 (29%)	
Все пациенты (n = 21)				2 (10%)	11 (52%)	8 (38%)	
	Gln27Glu						
	Аллели			Генотипы			
	Glu	Gln	p-value	Glu27Glu	Gln27Glu	Gln27Gln	p-value
КДБА+КДХП+ (n = 14)	17 (61%)	9 (39%)	0,74	4 (29%)	9 (64%)	1 (7%)	1
КДБА-КДХП+ (n = 7)	8 (57%)	6 (43%)		2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)	
Все пациенты (n = 21)				6 (28%)	13 (62%)	2 (10%)	

других полиморфизмов гена *ADRB2* на вариабельность ответа на β_2 -агонисты. Целесообразно включение в дальнейшее исследование редких функциональных вариантов, установленных в результате ресеквенирования

полиэтнических когорт. Кроме того, с плохим ответом на салбутамола у пациентов с редким терапией КДБА-КДХП+ могут быть связаны иные, негенетические причины десенситизации гена *ADRB2*.

Литература

- Hicks JK, Aquilante CL, Dunnenberger HM, Gammal RS, Funk RS, Aitken SL, Bright, et al. Precision Pharmacotherapy: Integrating Pharmacogenomics into Clinical Pharmacy Practice. *Journal of the American College of Clinical Pharmacy: JACCP*. 2019; 2 (3): 303–13. Available from: <https://doi.org/10.1002/jac5.1118>.
- Hüls A, Vanker A, Gray D, Koen N, MacIsaac JL, Lin DT, et al. Genetic susceptibility to asthma increases the vulnerability to indoor air pollution. *Eur Respir J*. 2020 Mar 26; 55 (3): 1901831. DOI: 10.1183/13993003.01831-2019. PMID: 31949118.
- Kabesch M, Tost J. Recent findings in the genetics and epigenetics of asthma and allergy. *Semin Immunopathol*. 2020; 42: 43–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00777-w>.
- Makoui MH, Imani D, Motalebzadeh M, Azimi M, Razi B. Vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to asthma: Meta-analysis based on 17 case-control studies. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020 Jan; 124 (1): 57–69. DOI: 10.1016/j.anai.2019.10.014. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31654764.
- Perez-Garcia J, Espuela-Ortiz A, Lorenzo-Diaz F, Pino-Yanes M. Pharmacogenetics of Pediatric Asthma: Current Perspectives. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2020; 13: 89–103. Available from: doi.org/10.2147/PGPM.S201276.
- Hikino K, Shinobu Kobayashi S, Erika Ota E, Taisei Mushioka T, Urayama K, Kobayashi T. A meta-analysis of the influence of ADRB2 genetic polymorphisms on albuterol (salbutamol) therapy in patients with asthma. *British Journal of Clinical Pharmacology*. Wiley Online Library, 2020. Available from: doi.org/10.1111/bcp.14570.
- Karimi L, Vijverberg S, Engelkes M, Hernandez-Pacheco N, Farzan N, Soares P. ADRB2 haplotypes and risk of exacerbations in asthmatic children and young adults treated with long-acting β_2 -agonists: A meta-analysis in the PiCA consortium. *Eur Respiratory Soc*. 2019. DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA5388.
- Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amodio MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*. 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz966.
- Akparova A, Aripova A, Abishev M, Kazhiyakhmetova B, Pirmanova A, Bersimbaev R. An investigation of the association between ADRB2 gene polymorphisms and asthma in Kazakh population. *Clin Respir J*. 2020 Jun; 14 (6): 514–20. DOI: 10.1111/crj.13160. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32034992.
- Khan I, Ul-Haq Z, Shaheen A, Zaman M, Ahmad N, Abbasi R, et al. Association of arg16gly and gln27glu, b2-adrenergic receptor gene polymorphism with asthma. A systematic review and meta-analysis of case control studies. *J Pak Med Assoc*. 2018 Jan; 68 (1): 90–97. PMID: 29371726.
- Vijverberg S, Farzan N, Slob E, Anne H. Neerincx, Anke H. Maitland-van der Zee. Treatment response heterogeneity in asthma: the role of genetic variation, *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2018; 12: 55–65, DOI: 10.1080/17476348.2018.1403318.
- Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet*. 2007 Dec 22; 370 (9605): 2118–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61906-0. PMID: 18156033.
- Bleecker ER, Yancey SW, Baitinger LA, Edwards LD, Klotzman M, Anderson WH, Dorinsky PM. Salmeterol response is not affected by beta2-adrenergic receptor genotype in subjects with persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct; 118 (4): 809–16. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.06.036. Epub 2006 Aug 28. PMID: 17030231.
- Wechsler ME, Lehman E, Lazarus SC, Lemanske RF, Boushey HA, Deykin A, et al. β -Adrenergic receptor polymorphisms and response to salmeterol. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 173 (5): 519–26. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1519OC>.
- Slob EMA, Vijverberg SJH, Palmer CNA, Zazuli Z, Farzan N, Oliveri N, et al. Pharmacogenetics of inhaled long-acting beta2-agonists in asthma: a systematic review. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2018; 29 (7): 705–14. Available from: <https://doi.org/10.1111/pai.12956>.
- Zhang E, Levin AM, Williams LK. How does race and ethnicity effect the precision treatment of asthma? *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. Taylor & Francis. 2019; 4 (6): 337–56.
- Pavlova K, Mdinaradze D, Kurbacheva O. The response variability of the asthma patients to the standard pharmacotherapy. *Russian Journal of Allergy*. 2019; 16 (2): 20–24.
- Ortega VE, Hawkins GA, Moore WC, Hastie AT, Ampleford EJ, Busse WW, et al. Effect of rare variants in ADRB2 on risk of severe exacerbations and symptom control during longacting — agonist treatment in a multiethnic asthma population: a genetic study. *Lancet Respir Med*. 2014 Mar; 2 (3): 204–13. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70289-3. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24621682; PMCID: PMC4053167.
- Савельева О. Н., Карунас А. С., Федорова Ю. Ю., Хуснутдинова Э. К. Фармакогенетика бронхиальной астмы.

- Медицинская генетика. 2019; 18 (4): 3–23.
20. Асанов А. Ю., Намазова Л. С., Пинелис В. Г., Журкова Н. В., Вознесенская Н. И. Генетические основы бронхиальной астмы. Педиатрическая фармакология. 2008; 5 (4): 31–33.
 21. Nikiforova AI, Abramov DD, Kadochnikova VV, Zobkova GU, Ogurtsova KA, Brjuhanova NO, et al. Determining the frequency of pah mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of real-time PCR and next-generation sequencing. Bulletin of Russian State Medical University. 2017; 4: 38–44.
 22. Martinez ED, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the β_2 -adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. J Clin Invest. 1997; 10: 3184–8. DOI:10.1172/JCI119874.
 23. Батенева Е., Максименко В., Кадочникова В., Кофиади И., Трофимов Д., Рагимов А. Выявление мутаций в генах BRCA1 и BRCA2-перспективность проведения генетического скрининга на базе организаций службы крови. Медицинская генетика. 2014; 13 (4): 30–34.
 24. Ambrosius WT, Lange EM, Langeveld CD. Power for genetic association studies with random allele frequencies and genotype distributions. Am J Hum Genet. 2004 Apr; 74 (4): 683–93. DOI: 10.1086/383282. Epub 2004 Mar 12. PMID: 15024689; PMCID: PMC1181944.
 25. Ryman N, Palm S, André C, Carvalho G, Dahlgren T, Jorde P. Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. Molecular Ecology. Wiley Online Library. 2006; 15 (8): 2031–45. Available from: doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02839.x.
 26. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. Biochemistry. 1994 Aug 16; 33 (32): 9414–9. DOI: 10.1021/bi00198a006. Erratum in: Biochemistry 1994 Nov 29; 33 (47): 14368. PMID: 7915137.
 27. Turner SW, Khoo SK, Laing IA, Palmer LJ, Gibson NA, Rye P, et al. β_2 -adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. Clin Exp Allergy. 2004; 34 (7): 1043–8. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2004.02001.x.
 28. Finkelstein Y, Bournissen FG, Hutson JR, Shannon M. Polymorphism of the ADRB2 gene and response to inhaled beta-agonists in children with asthma: a meta-analysis. J Asthma. 2009; 46 (9): 900–5. DOI:10.3109/02770900903199961.
 29. Jovicic N, Babic T, Dragicevic S, Nestorovic B, Nikolic A. ADRB2 gene polymorphisms and salbutamol responsiveness in serbian children with asthma. BJMG. 2018; 21: 133–138. DOI: 10.2478/bjmg-2018-0007.
 30. Кофиади И. А., Кадочникова В. В., Абрамов Д. Д., Гончарова Е. В., Алексеев Л. П., Хаитов Р. М. Частота встречаемости 100 клинически значимых однонуклеотидных полиморфизмов у здоровых представителей русской популяции. Физиология и патология иммунной системы. 2011; 15 (2): 3–9.
 31. Федорова Ю. Ю., Карунас А. С., Мурзина Р. Р., Мухтарова Л. А., Рамазанова Н. Н., Гималова Г. Ф. Исследование ассоциации полиморфных вариантов гена β_2 -адренергического рецептора с бронхиальной астмой у русских. Пульмонология. Антимикробная терапия. 2013; 5 (74): 116–20.
 32. Park HW, Yang MS, Park CS, Kim TB, Moon HB, Min KU. Additive role of tiotropium in severe asthmatics and Arg16Gly in ADRB2 as a potential marker to predict response. Allergy 2009; (64): 778–83. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01876.x.

References

1. Hicks JK, Aquilante CL, Dunnenberger HM, Gammal RS, Funk RS, Aitken SL, Bright, et al. Precision Pharmacotherapy: Integrating Pharmacogenomics into Clinical Pharmacy Practice. Journal of the American College of Clinical Pharmacy: JACCP, 2019; 2 (3): 303–13. Available from: <https://doi.org/10.1002/jac5.1118>.
2. Hüls A, Vanker A, Gray D, Koen N, MacIsaac JL, Lin DT, et al. Genetic susceptibility to asthma increases the vulnerability to indoor air pollution. Eur Respir J. 2020 Mar 26; 55 (3): 1901831. DOI: 10.1183/13993003.01831-2019. PMID: 31949118.
3. Kabesch M, Tost J. Recent findings in the genetics and epigenetics of asthma and allergy. Semin Immunopathol. 2020; 42: 43–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00777-w>.
4. Makoui MH, Imani D, Motalebnezhad M, Azimi M, Razi B. Vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to asthma: Meta-analysis based on 17 case-control studies. Ann Allergy Asthma Immunol. 2020 Jan; 124 (1): 57–69. DOI: 10.1016/j.anai.2019.10.014. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31654764.
5. Perez-Garcia J, Espuela-Ortiz A, Lorenzo-Diaz F, Pino-Yanes M. Pharmacogenetics of Pediatric Asthma: Current Perspectives. Pharmgenomics Pers Med. 2020; 13: 89–103. Available from: doi.org/10.2147/PGPM.S201276.
6. Hikino K, Shinobu Kobayashi S, Erika Ota E, Taisei Mushiroda T, Urayama K, Kobayashi T. A meta-analysis of the influence of ADRB2 genetic polymorphisms on albuterol (salbutamol) therapy in patients with asthma. British Journal of Clinical Pharmacology. Wiley Online Library, 2020. Available from: doi.org/10.1111/bcp.14570.
7. Karimi L, Vijverberg S, Engelkes M, Hernandez-Pacheco N, Farzan N, Soares P. ADRB2 haplotypes and risk of exacerbations in asthmatic children and young adults treated with long-acting β_2 -agonists: A meta-analysis in the PiCA consortium. Eur Respiratory Soc. 2019. DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA5388.
8. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, et al. Ensembl 2020. Nucleic Acids Res. 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz966.
9. Akparova A, Aripova A, Abishev M, Kazhiyakhmetova B, Pirmanova A, Bersimbaev R. An investigation of the association between ADRB2 gene polymorphisms and asthma in Kazakh population. Clin Respir J. 2020 Jun; 14 (6): 514–20. DOI: 10.1111/crj.13160. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32034992.
10. Khan I, Ul-Haq Z, Shaheen A, Zaman M, Ahmad N, Abbasi R, et al. Association of arg16gly and gln27glu, β_2 -adrenergic receptor gene polymorphism with asthma. A systematic review and meta-analysis of case control studies. J Pak Med Assoc. 2018 Jan; 68 (1): 90–97. PMID: 29371726.
11. Vijverberg S, Farzan N, Slob E, Anne H. Neerincx, Anke H. Maitland-van der Zee. Treatment response heterogeneity in asthma: the role of genetic variation, Expert Review of Respiratory Medicine. 2018; 12: 55–65, DOI: 10.1080/17476348.2018.1403318.
12. Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. Lancet. 2007 Dec 22; 370 (9605): 2118–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61906-0. PMID: 18156033.
13. Bleecker ER, Yancey SW, Baitinger LA, Edwards LD, Klotzman M, Anderson WH, Dorinsky PM. Salmeterol response is not affected by beta2-adrenergic receptor genotype in subjects with persistent asthma. J Allergy Clin Immunol. 2006 Oct; 118 (4): 809–16. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.06.036. Epub 2006 Aug 28. PMID: 17030231.
14. Wechsler ME, Lehman E, Lazarus SC, Lemanske RF, Boushey HA, Deykin A, et al. β -Adrenergic receptor polymorphisms and response to salmeterol. American journal of respiratory and critical care medicine. 2006; 173 (5): 519–26. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1519OC>.
15. Slob EMA, Vijverberg SJH, Palmer CNA, Zazuli Z, Farzan N, Oliveri N, et al. Pharmacogenetics of inhaled long-acting beta2-agonists in asthma: a systematic review. Pediatric Allergy and Immunology. 2018; 29 (7): 705–14. Available from: <https://doi.org/10.1111/pai.12956>.
16. Zhang E, Levin AM, Williams LK. How does race and ethnicity effect the precision treatment of asthma? Expert Review of

- Precision Medicine and Drug Development. Taylor & Francis. 2019; 4 (6): 337–56.
17. Pavlova K, Mdinaradze D, Kurbacheva O. The response variability of the asthma patients to the standard pharmacotherapy. *Russian Journal of Allergy*. 2019; 16 (2): 20–24.
 18. Ortega VE, Hawkins GA, Moore WC, Hastie AT, Ampleford EJ, Busse WW, et al. Effect of rare variants in ADRB2 on risk of severe exacerbations and symptom control during longacting — agonist treatment in a multiethnic asthma population: a genetic study. *Lancet Respir Med*. 2014 Mar; 2 (3): 204–13. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70289-3. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24621682; PMCID: PMC4053167.
 19. Savelieva ON, Karunas AS, Fedorova YuYu, Khusnutdinova EK. Farmakogenetika bronhial'noj astmy. *Medicinskaja genetika*. 2019; 18 (4): 3–23. Dostupno po ssylke: doi.org/10.25557/2073-7998.2019.04. 3-23. Russian.
 20. Asanov AY, Namazova LS, Pinelis VG, Zhurkova NV, Voznesenskaya NI. Geneticheskie osnovy bronhial'noj astmy. *Pediatricheskaja farmakologija*. 2008; 5 (4): 31–33. Russian.
 21. Nikiforova AI, Abramov DD, Kadochnikova VV, Zobkova GU, Ogurtsova KA, Brjuhanova NO, et al. Determining the frequency of pah mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of real-time PCR and next-generation sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2017; 4: 38–44.
 22. Martinez ED, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the β 2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest*. 1997; 10: 3184–8. DOI:10.1172/JCI119874.
 23. Bateneva E, Maksimenko V, Kadochnikova V, Kofiadi I, Trofimov D, Ragimov A. Vyjavlenie mutacij v genah BRCA1 i BRCA2-perspektivnost' provedenija geneticheskogo skringinga na baze organizacij sluzhby krovi. *Medicinskaja genetika*. 2014; 13 (4): 30–34. Russian.
 24. Ambrosius WT, Lange EM, Langefeld CD. Power for genetic association studies with random allele frequencies and genotype distributions. *Am J Hum Genet*. 2004 Apr; 74 (4): 683–93. DOI: 10.1086/383282. Epub 2004 Mar 12. PMID: 15024689; PMCID: PMC1181944.
 25. Ryman N, Palm S, André C, Carvalho G, Dahlgren T, Jorde P. Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*. Wiley Online Library. 2006; 15 (8): 2031–45. Available from: doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02839.x.
 26. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*. 1994 Aug 16; 33 (32): 9414–9. DOI: 10.1021/bi00198a006. Erratum in: *Biochemistry* 1994 Nov 29; 33 (47): 14368. PMID: 7915137.
 27. Turner SW, Khoo SK, Laing IA, Palmer LJ, Gibson NA, Rye P, et al. β 2-adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34 (7): 1043–8. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2004.02001.x.
 28. Finkelstein Y, Bournissen FG, Hutson JR, Shannon M. Polymorphism of the ADRB2 gene and response to inhaled beta-agonists in children with asthma: a meta-analysis. *J Asthma*. 2009; 46 (9): 900–5. DOI:10.3109/02770900903199961.
 29. Jovicic N, Babic T, Dragicevic S, Nestorovic B, Nikolic A. ADRB2 gene polymorphisms and salbutamol responsiveness in serbian children with asthma. *BJMG*. 2018; 21: 133–138. DOI: 10.2478/bjmg-2018-0007.
 30. Kofiadi IA, Kadochnikova VV, Abramov DD, Goncharova EV, Alekseev LP, Haitov RM. Chastota vstrechaemosti 100 klinicheskij znachimyh odnonukleotidnyh polimorfizmov u zdorovyh predstavitelej russkoj populjacii. *Fiziologija i patologija immunnogo sistema*. 2011; 15 (2): 3–9. Russian.
 31. Fedorova YuYu, Karunas AS, Murzina RR, Muhtarova LA, Ramazanov NN, Gimalova GF. Issledovanie asociacii polimorfnyh variantov gena β 2-adrenergicheskogo receptora s bronhial'noj astmoj u russkij. *Pul'monologija. Antimikrobnaja terapija*. 2013; 5 (74): 116–20. Russian.
 32. Park HW, Yang MS, Park CS, Kim TB, Moon HB, Min KU. Additive role of tiotropium in severe asthmatics and Arg16Gly in ADRB2 as a potential marker to predict response. *Allergy* 2009; (64): 778–83. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01876.x.

КАРТОГРАФИЧЕСКИЙ АТЛАС РАСПРОСТРАНЕНИЯ 45 ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В НАРОДОНАСЕЛЕНИИ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН

Е. В. Балановская^{1,2}✉, В. С. Петрушенко^{1,3}, С. М. Кошель^{1,4}, Э. А. Почешхова^{1,5}, Д. К. Черневский¹, К. Б. Мирзаев⁶, Ш. П. Абдуллаев⁶, О. П. Балановский^{1,2,3}

¹ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

² Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

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

⁴ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

⁶ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Нехватка информации о распространенности в РФ фармакогенетических маркеров приводит к невозможности внедрения алгоритмов персонализации, разработанных для Западной Европы. Целью работы было систематическое изучение распространенности ряда значимых фармакогенетических маркеров по всей территории России. Из нескольких массивов популяционно-генетических данных отобраны 45 маркеров (ADME-генов; генов, кодирующих фармакодинамические мишени лекарственных средств; генов, кодирующих компоненты системы гемостаза), генотипированных суммарно для 2197 индивидов. Определены частоты этих маркеров в 50 популяциях, включающих информацию о 137 этнических и субэтнических группах. В результате создан фармакогенетический атлас — систематическое собрание геногеографических карт распространенности фармакогенетических ДНК маркеров по всей территории России и сопредельных стран. Атлас выявил три паттерна пространственной изменчивости. Паттерн клинальной изменчивости (градиентного изменения частот по оси «восток–запад») объединяет маркеры, следующие основной закономерности всего генофонда населения Северной Евразии (13% карт атласа). Паттерн равномерного распределения выделяет маркеры, средняя частота которых характерна для большинства регионов России (27% карт атласа). Паттерн «очаговой» изменчивости объединяет фармакогенетические маркеры, характерные только для определенной группы этносов и отсутствующие в других регионах (60% карт атласа). Атлас показывает, что средняя частота маркера и информация о его встречаемости в отдельных популяциях не могут служить указанием на тип его распределения в пространстве РФ — для выявления паттерна изменчивости необходима геногеографическая карта.

Ключевые слова: фармакогенетика, картографический атлас, популяции, этносы, генофонд, геногеография, Россия, Северная Евразия

Благодарности: авторы благодарят доноров образцов, принимавших участие в исследовании, Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН за доступ к базе данных генотипов, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия) за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра имени акад. Н. П. Бочкова и Института общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН.

Вклад авторов: Е. В. Балановская — анализ данных, написание текста статьи; О. П. Балановский — дизайн и руководство исследованием; В. С. Петрушенко — биоинформатический анализ; С. М. Кошель — картографический анализ, редактирование рукописи; Д. К. Черневский, Э. А. Почешхова — работа с табличными данными; К. Б. Мирзаев, Ш. П. Абдуллаев — описание фармакогенетических маркеров.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра (протокол № 3/1 от 5 сентября 2018 г.), все обследуемые подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Елена Владимировна Балановская
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; balanovska@mail.ru

Статья получена: 06.11.2020 Статья принята к печати: 22.11.2020 Опубликована онлайн: 18.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.080

CARTOGRAPHIC ATLAS OF FREQUENCY VARIATION FOR 45 PHARMACOGENETIC MARKERS IN POPULATIONS OF RUSSIA AND ITS NEIGHBOR STATES

Balanovska EV^{1,2}✉, Petrushenko VS^{1,3}, Koshel SM^{1,4}, Pocheshkhova EA^{1,5}, Chernevskiy DK¹, Mirzaev KB⁶, Abdullaev SP⁶, Balanovsky OP^{1,2,3}

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

⁶ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

The lack of information about the frequency of pharmacogenetic markers in Russia impedes the adoption of personalized treatment algorithms originally developed for West European populations. The aim of this paper was to study the distribution of some clinically significant pharmacogenetic markers across Russia. A total of 45 pharmacogenetic markers were selected from a few population genetic datasets, including ADME, drug target and hemostasis-controlling genes. The total number of donors genotyped for these markers was 2,197. The frequencies of these markers were determined for 50 different populations, comprised of 137 ethnic and subethnic groups. A comprehensive pharmacogenetic atlas was created, i.e. a systematic collection of gene geographic maps of frequency variation for 45 pharmacogenetic DNA markers in Russia and its neighbor states. The maps revealed 3 patterns of geographic variation. Clinal variation (a gradient change in frequency along the East-West axis) is observed in the pharmacogenetic markers that follow the main pattern of variation for North Eurasia (13% of the maps). Uniform distribution singles out a group of markers that occur at average frequency in most Russian regions (27% of the maps). Focal variation is observed in the markers that are specific to a certain group of populations and are absent in other regions (60% of the maps). The atlas reveals that the average frequency of the marker and its frequency in individual populations do not indicate the type of its distribution in Russia: a gene geographic map is needed to uncover the pattern of its variation.

Keywords: pharmacogenetics, cartographic atlas, populations, ethnic groups, gene pool, gene geography, Russia, North Eurasia

Acknowledgement: the authors thank the donors for their participation, the Institute of General Genetics for the access to the database of genotypes, the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia) for the opportunity to use molecular genetic technologies.

Funding: the study was carried out under the State Assignment of the Russian Ministry of Science and Higher Education for the Research Center for Medical Genetics and Vavilov Institute of General Genetics.

Author contribution: Balanovska EV — data analysis, manuscript draft; Balanovsky OP — study design and supervision; Petrushenko VS — bioinformatic analysis; Koshel SM — map analysis, manuscript editing; Chernevskiy DK, Pocheshkhova EA — tabular data analysis; Mirzaev KB, Abdullaev SP — description of pharmacogenetic markers.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center for Medical Genetics (Protocol № 3/1 dated September 5, 2018) and carried out on the samples obtained during the population genetic study of the gene pools of ethnic groups from Russia and its neighbor states. The donors gave voluntary informed consent to participate.

✉ Correspondence should be addressed: Elena B. Balanovska
Moskvorechie, 1, Moscow, 115478; balanovska@mail.ru

Received: 06.11.2020 Accepted: 22.11.2020 Published online: 18.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.080

Во многих фармакогенетических исследованиях выявлены ключевые ADME-гены (от англ. absorption, distribution, metabolism, elimination) лекарственных препаратов, число которых сравнительно невелико, но каждый имеет ряд функционально значимых полиморфных вариантов [1, 2]. Кроме того, выделены гены фармакодинамических мишеней и гены, кодирующие компоненты системы гемостаза. Разрабатываются тесты и протоколы по подбору препарата и дозы в зависимости от генотипа пациента [3–5], но основными ограничениями, препятствующими их широкому внедрению, являются межэтнические различия: доступные на рынке панели для оценки клинически значимых полиморфизмов системы ADME не учитывают особенности носительства популяционно-специфичных полиморфизмов и плохо адаптированы под мультиэтнические регионы.

В полиэтнических регионах мира продемонстрированы как количественные (частота аллелей), так и качественные (популяционно-специфичные аллели) различия между популяциями по ADME-генам и другим фармакогенетическим маркерам. Межэтнические различия были известны с самого зарождения фармакогенетики [6, 7], но и сейчас большинство исследований проводят только на пациентах европеоидной популяции. Такие результаты не могут быть экстраполированы на представителей других этносов. Для стран Африки и Латинской Америки показано, что стандартизированный алгоритм подбора дозы жизненно важного препарата нередко оказывался недостаточно эффективным, что создавало угрозу жизни пациента, а в ряде случаев приводило к летальному исходу или инвалидизации [8, 9].

Фармакогенетический анализ может быть проведен не только для индивида, но и для популяции в целом: в этом случае учитывают усредненный генотип, основанный на частотах аллелей в популяции. Разумеется, индивидуальные генотипы могут отличаться от средних показателей популяции. Тем не менее усредненный прогноз для популяции, учитывающий особенности ее генофонда, лучше подходит для ее членов, чем стандартные рекомендации по выбору препаратов и их дозировок.

В связи с этим многие исследователи изучают особенности населения с целью адаптировать для него фармакогенетические рекомендации. Примером могут служить выраженные различия в рекомендуемых средних дозировках варфарина для разных популяций Европы и стран Карибского бассейна [10, 11]. Ситуацию осложняет то, что многие популяции генетически отличаются от «стандартных» представителей их расы: популяции Африки генетически весьма отличны от афроамериканцев США, народы Сибири — от китайцев, популяции восточных славян и Кавказа — от белых американцев. Выявлены существенные различия в распространенности полиморфных вариантов генов ADME-системы между китайцами хань (98% населения Китая) и другими малыми народами, также относящимися к монголоидам: уйгурами, киргизами, казахами [12]. Аналогичные данные получены для негроидного населения Африки: генетическое разнообразие их популяций по генам изоферментов P450 оказалось намного большим, чем для европеоидов [9]. При этом ранее не описанные и более редкие аллельные варианты в генах системы ADME могут вносить существенный вклад в эффективность и безопасность терапии. Например, выявлен «новый» аллельный вариант, определяющий до 31% вариабельности требуемой дозы варфарина в афроамериканской популяции [8]. При

подборе дозы варфарина для латиноамериканцев Пуэрто-Рико были обнаружены редкие аллели, характерные для афроамериканцев [13]. Другой маркер — HLAB*15:02, ассоциированный с развитием тяжелых аллергических реакций на фоне терапии карбамазепином, встречается до 8% среди азиатской популяции и лишь в 1% среди европеоидной, а частота развития подобных реакций может различаться в 5–6 раз [14]. Эти результаты указывают на недопустимость прямой экстраполяции на российское население данных зарубежных исследований.

Россия является многонациональным государством, что приводит к существенным различиям в распространенности ADME-генов, генов фармакодинамических мишеней и генов, кодирующих компоненты системы гемостаза, и разному ответу на фармакотерапию в зависимости от того, каково этно-региональное происхождение пациента. В 2019 г. систематический обзор исследований распространенности ADME-генов на территории России [15] выявил явную неоднородность как представленности этнических групп, так и изученных полиморфных вариантов. Многочисленные исследования фокусировались на наиболее значимых полиморфных вариантах генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450 и некоторых факторах ADME-системы [16–25]. Изученность разных регионов и народов страны также резко неравномерна.

В связи с этим целью работы было систематически изучить распространенность ряда значимых фармакогенетических вариантов по всей территории России и сопредельных стран и создать первый рабочий вариант фармакогенетического атласа. Особенностью такой постановки задачи является именно систематичность — широкий охват территории и ее равномерная изученность, что становится возможным при привлечении массивов данных, полученных в рамках популяционно-генетических исследований с использованием широкогеномных панелей SNP-маркеров.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Анализу подвергали 50 популяций, охватывающих все основные регионы Северной Евразии и сопредельных стран. Основой были популяционные образцы из Биобанка Северной Евразии, являющегося крупнейшим в мире репозиторием образцов коренного населения с территории России и сопредельных стран [26]. Образцы биобанка охватывают 40 популяций, число образцов $n = 2011$ (средний объем выборки, соответственно, $n = 50$). Ряд популяций для целей увеличения объема выборки объединяет родственные этносы, изученные по небольшой выборке. И напротив, русские, изученные по большой выборке, представлены тремя географическими популяциями. Эти образцы изучали по панели SNP-маркеров Omni-Exome (Illumina; США), включающей 4,5 млн SNP-маркеров.

Список изучаемых фармакогенетических маркеров был составлен из двух основных источников. Первым стал перечень фармакогенетических маркеров, играющих важную роль в прогнозировании фармакокинетики, фармакодинамики и, в конечном счете, ответа на лекарственный препарат — «Very Important Pharmacogene» (VIP) [27]. Вторым источником, частично перекрывающийся с первым, это список маркеров, включенных в популярную коммерчески доступную фармакогенетическую панель OpenArray™ PGx Express Panel (Thermo Fisher Scientific; США). Дополнительно были включены перспективные фармакогенетические маркеры, для которых характерны

расово-этнические особенности распределения (*CES1*, *PON1*, *IFNL3*, *ITGB3*). Комбинированный список включал 95 фармакогенетически значимых маркеров. Из них 55 маркеров входили в генотипированную нами панель Illumina [28].

Этот массив собственных данных дополнили данными о 10 популяциях сопредельных стран Европы и Китая, доступными из литературы [29–44]. Общее число образцов составило 186, средний объем выборки $n = 19$, генотипирование проводили по полногеномным панелям маркеров, включающим от 600 тыс. до 1 млн SNP-маркеров. Небольшое число образцов, представленное в этих статьях об этносах России, присоединено к соответствующим популяциям, изученным по образцам Биобанка. При анализе всего массива опубликованных данных мы выявили 53 SNP-маркера из нашего списка 95 фармакогенетически значимых маркеров.

Сопоставление этих двух массивов данных — Биобанка Северной Евразии и публикаций полногеномных панелей — выявило 45 общих фармакогенетически значимых SNP-маркеров, полиморфных в ареале Северной Евразии. Распространение именно этого набора из 45 маркеров изучали в данной работе. По этим маркерам имеются суммарно генотипы 2197 образцов, представляющих 50 популяций Северной Евразии. Характеристики обследованных популяций представлены в табл. 1, а изученных маркеров — в табл. 2.

Обработку широкогеномных данных, включая объединение массивов данных и расчет частот, проводили с помощью программного пакета PLINK 1.9 [45, 46]. В результате была получена матрица частот 45 фармакогенетических маркеров в 50 популяциях России и сопредельных стран, основанная на генотипах 2197 образцов со средней выборкой $n = 44$. На основе матрицы построены геногеографические карты частот встречаемости фармакогенетических маркеров в народонаселении Северной Евразии и сопредельных стран. Картографирование проводили в программе GeneGeo [47–49]. Карты (модели) распространения 45 фармакогенетических маркеров строили методом средневзвешенной интерполяции с радиусом влияния 2000 км и значением степени весовой функции, равным 3 [48]; области, находящиеся далее 2000 км от изученных популяций, на карте обозначали белым цветом. Согласно правилам популяционной генетики, на каждой территории изучают ее коренное население — и именно его этнический ареал представлен на геногеографических картах. Генофонд пришлого населения легко реконструируется по этим картам по информации об источниках миграций.

При визуализации картографических моделей использовали «универсальную» шкалу интервалов, разработанную для генетических маркеров с большим разбросом частот [50]. В основной части диапазона частот (от 5 до 60%) эта шкала строго равномерна (интервалы следуют через 5%), но интервал низких частот разбит на три, а в области высоких частот, наоборот, интервалы следуют через 10%. Такой подход позволяет ограничить число интервалов (более 17 цветов становятся трудно различимы), при этом контрастным серым цветом выделены частоты ниже 1% (т. е. ниже 1% уровня полиморфизма).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Геногеографические карты распространения 45 фармакогенетических маркеров в народонаселении Северной Евразии и сопредельных стран представлены на сайте

(см. приложение), а основные характеристики их изменчивости — в табл. 2. Хотя пространственная изменчивость каждого маркера уникальна (ни одна карта не повторяет другую), анализ карт позволил выделить три основных паттерна изменчивости: клинальной изменчивости, равномерного распределения и «очаговой» изменчивости (см. рис. 1–3). Не имея возможности в данной публикации описать все 45 карт, мы выбрали 12 из них, иллюстрирующих каждый из трех паттернов пространственной изменчивости (по 4 карты на каждый паттерн), характеристики этих 12 маркеров представлены в табл. 3.

Паттерн клинальной изменчивости

Паттерн градиентного изменения (клинальной изменчивости) частоты генетических маркеров по оси «восток-запад» является основным для генофонда Северной Евразии. Он был выявлен при анализе классических маркеров [49, 51] и подтвержден данными ДНК маркеров [49]. Более того, именно этот паттерн характерен и для культуры древнейшего населения Северной Евразии [49, 52]. Данный факт может служить указанием на то, что он сформировался на самых древних этапах истории населения и сохранился до современности. Поэтому закономерно, что паттерн клинальной изменчивости ярко проявился и на картах распределения целого ряда фармакогенетических маркеров (см. рис. 1).

На карте распределения частоты *VKORC1* rs9923231-T(A) (рис. 1А) паттерн проявляется очень четко: минимум на западе европейской части России и на Кавказе, плавное увеличение на восток Евразии. Показательно, что и значения, промежуточные между западным и восточным «полюсами», находятся не на Урале, а в Западной Сибири, как на первой компоненте генофонда Северной Евразии и на карте археологических признаков эпохи палеолита [49, 52]. Минимальный интервал частоты приходится на ареал восточных славян и народов Балтийского региона, где $0,3 \leq q < 0,4$ (здесь и далее q — частота). Этот ареал низких частот на восток простирается до Волги, включая в себя коренное население Мордовии. От области низких частот идет их плавное повышение на запад Европы и на юг. На востоке Северной Евразии область максимальных частот ($q > 0,80$) начинается с меридиана популяций тувинцев и монголов, достигая максимума (более 90%) на восточном побережье материка — у коренных народов Амура, эвенов, эвенков, а также в континентальных областях у бурят.

На карте распределения частоты *COMT* (rs4680-A) (рис. 1Б) мы видим тот же вариант клинальной изменчивости, но с меньшим диапазоном частоты (0,44 вместо 0,65; см. табл. 2): при прежнем максимуме (интервал $0,6 \leq q < 0,7$) на западе, частоты на востоке падают лишь до 20–30%, соответственно генетическое разнообразие намного меньше ($F_{ST} = 0,02$; см. табл. 2), чем на предыдущей карте ($F_{ST} = 0,07$; см. табл. 2). Область высоких частот этого маркера ($0,5 \leq q < 0,7$) расположена в европейской части материка, но расширяется на восток, захватывая популяции Волго-Уральского региона (марийцев, чувашей, удмуртов, татар). Область средних значений простирается дальше на восток, охватывая бассейн Енисея, но оставшая область низких частот ($0,2 \leq q < 0,35$) в целом соответствует ареалу высоких частот предыдущей карты.

На карте распределения частоты *CES1* (rs2244613-C) (рис. 1В) паттерн клинальной изменчивости является

Таблица 1. Общая характеристика изученных популяций

Условное название популяции	Народы, представляющие популяцию	Размер выборки <i>n</i>	Координаты популяции	
			Широта (гр.)	Долгота (гр.)
Алтайцы	Алтайцы	40	52	87
Амур	Нанайцы, негидальцы, нивхи, орочи, удэгейцы, ульчи	52	51	139
Армяне	Армяне	102	40	45
Башкиры	Башкиры	47	54	57
Буряты	Буряты	47	53	110
Верхняя Волга	Марийцы, чуваш	58	56	47
Греция	Греки, македонцы	29	40	22
Дагестан северный	Аварцы, даргинцы, кубачинцы, кумыки, лакцы	52	43	47
Дагестан южный	Агульцы, лезгины, рутульцы, табасаранцы	34	42	48
Евреи ашкенази	Евреи ашкенази	18	48	16
Евреи других групп	Евреи Азербайджана, Грузии, сефарды Узбекистана	16	38	38
Закавказье	Азербайджанцы, грузины	40	42	46
Западная Сибирь	Манси, селькупы, ханты	45	63	72
Западный Кавказ 1	Абазинцы, абхазы, адыгейцы, шапсуги	51	44	41
Западный Кавказ 2	Балкарцы, кабардинцы, карачаевцы, черкесы	52	44	43
Италия	Итальянцы	17	42	13
Камчатка	Ительмены, коряки, чукчи	70	61	167
Каракалпакстан	Каракалпаки, туркмены	36	40	60
Карелия	Вепсы, воль, ижора, карелы	61	62	33
Киргизия	Киргизы	38	41	75
Китайцы	Китайцы (хань)	7	34	120
Коми	Коми, коми-пермяки	54	60	54
Молдавия	Болгары, гагаузы, молдаване	36	45	27
Монголия	Монголы	103	47	101
Мордовия	Мокша, шокуша, эрзя	43	54	43
Ногайцы	Караногайцы, ногайцы астраханские, кубанские, ставропольские	34	44	43
Осетия	Иронцы, дигорцы	41	43	44
Прибалтика	Латыши, литовцы, эстонцы	19	58	24
Русские северные	Русские Архангельской, Вологодской областей	67	61	40
Русские центральные	Русские Костромской, Новгородской, Псковской, Тверской, Ярославской областей	97	57	38
Русские южные	Русские Белгородской, Воронежской, Калужской, Курской, Нижегородской, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тамбовской областей, кубанские казаки	94	53	35
Северная Сибирь	Нганасаны, ненцы, кеты	25	67	83
Северная Европа*	Немцы, поляки, шведы	19	54,54,59	13,18,18
Северный Китай	И, наси, орохоны, сибо, ту, туцзя, шэ	8	48	126
Славяне южные	Боснийцы, сербы, словенцы, хорваты	45	45	14
Средняя Азия	Казахи, узбеки, уйгуры	53	46	69
Таджикистан 1	Таджики	28	37	71
Таджикистан 2	Припамирские народы, пуштуны, ягнобцы	48	38	70
Татары Волго-Уральские	Казанские татары, кряшены, мишари	45	55	52
Татары сибирские	Сибирские татары	58	57	67
Тува	Тофалары, тувинцы	59	52	94
Удмуртия	Бесермяне, удмурты	31	57	53
Украина	Украинцы восточные, западные	77	49	29
Центральная Европа	Венгры, румыны, словаки	26	47	21
Центральный Кавказ	Ингуши, чеченцы	32	43	45
Эвенки	Эвенки	31	60	111
Эвены	Эвены	31	61	145
Юго-западная Европа	Баски, испанцы, французы	15	47	3
Южная Сибирь	Хакасы, шорцы	48	54	89
Якутия	Долганы, юкагиры, якуты	28	66	124
Суммарно 50	Суммарно 137			

Примечание: * — популяция Северной Европы приведена на карте не одной, а тремя точками — отдельно для Германии, Польши, Швеции

Таблица 2. Характеристики изменчивости 45 фармакогенетических маркеров в пространстве Северной Евразии и сопредельных стран

Ген	Маркер	Частота маркера				F _{ST}	Паттерн изменчивости
		MEAN	MIN	MAX	MAX-MIN		
ABCB1	rs1045642-G	0,48	0,36	0,68	0,32	0,0123	Равномерная
	rs4148738-G	0,46	0,26	0,69	0,42	0,0122	Равномерная
APOE	rs429358-G	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0080	Очаговая
CES1	rs2244613-C	0,37	0,10	0,73	0,63	0,0598	Клиальная
COMT	rs4680-A	0,46	0,21	0,66	0,44	0,0248	Клиальная
CYP1A2	rs12720461-A	0,01	0,00	0,03	0,03	0,0070	Очаговая
	rs2069526-C	0,06	0,00	0,21	0,21	0,0129	Равномерная
	rs762551-C	0,35	0,21	0,52	0,31	0,0100	Равномерная
CYP2B6	rs28399499-G	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0069	Очаговая
CYP2C19	rs28399504-G	0,00	0,00	0,05	0,05	0,0140	Очаговая
	rs41291556-G	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0068	Очаговая
	rs4244285-A	0,14	0,04	0,25	0,21	0,0098	Равномерная
	rs4986893-A	0,02	0,00	0,14	0,14	0,0249	Очаговая
	rs56337013-A	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0060	Очаговая
	rs6413438-A	0,00	0,00	0,01	0,01	0,0056	Очаговая
CYP2C9	rs1057910-C	0,08	0,01	0,20	0,19	0,0138	Равномерная
	rs1799853-T	0,08	0,00	0,23	0,23	0,0270	Очаговая
	rs28371685-A	0,00	0,00	0,04	0,04	0,0087	Очаговая
	rs28371686-G	0,00	0,00	0,07	0,07	0,0341	Очаговая
	rs56165452-G	0,00	0,00	0,01	0,01	0,0054	Очаговая
CYP2D6	rs28371725-A	0,02	0,00	0,17	0,17	0,0326	Очаговая
	rs5030862-A	0,00	0,00	0,03	0,03	0,0098	Очаговая
	rs59421388-A	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0072	Очаговая
CYP3A4	rs12721629-A	0,00	0,00	0,01	0,01	0,0052	Очаговая
	rs2242480-A	0,11	0,05	0,23	0,18	0,0088	Равномерная
	rs4986910-G	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0054	Очаговая
	rs55785340-G	0,00	0,00	0,01	0,01	0,0036	Очаговая
	rs62471956-A	0,02	0,00	0,12	0,12	0,0192	Очаговая
CYP3A5	rs10264272-A	0,00	0,00	0,01	0,01	0,0047	Очаговая
	rs28365083-A	0,00	0,00	0,02	0,02	0,0050	Очаговая
	rs41303343-AA	0,00	0,00	0,03	0,03	0,0097	Очаговая
	rs776746-A	0,10	0,03	0,26	0,23	0,0131	Равномерная
CYP4F2	*3 rs2108622-A	0,30	0,18	0,49	0,31	0,0154	Равномерная
DPYD	*2A rs3918290-A	0,00	0,00	0,03	0,03	0,0094	Очаговая
Factor II	rs1799963-A	0,01	0,00	0,10	0,10	0,0176	Очаговая
Factor V Leiden	rs6025-A	0,02	0,00	0,13	0,13	0,0249	Очаговая
IFNL3	rs8099917-C	0,14	0,02	0,28	0,25	0,0165	Клиальная
ITGB3	rs5918-G	0,11	0,02	0,28	0,26	0,0178	Равномерная
MTFHR	rs1801131-C	0,31	0,16	0,49	0,32	0,0100	Клиальная
	rs1801133-A	0,27	0,03	0,51	0,48	0,0253	Равномерная
PON1	rs662-G	0,37	0,19	0,69	0,51	0,0264	Клиальная
SLCO1B1	rs4149056-G	0,15	0,06	0,27	0,21	0,0100	Равномерная
TPMT	rs1142345-G	0,01	0,00	0,05	0,05	0,0079	Очаговая
	rs1800460-A	0,01	0,00	0,04	0,04	0,0063	Очаговая
VKORC1	rs9923231-T	0,57	0,3	0,95	0,65	0,0699	Клиальная

почти полностью вторит паттерну *VKORC1* (rs9923231-T(A)) (см. рис. 1A): область максимумов ($0,55 \leq q < 0,8$) находится на востоке Северной Евразии, область средних частот ($0,40 \leq q < 0,50$) вновь находится в Западной Сибири. Область минимумов ($0,10 \leq q < 0,25$) охватывает Западную Европу, частоты в которой еще ниже, чем у популяций восточных славян.

На карте распределения частоты *IFNL3* (rs8099917-C) (рис. 1Г) паттерн клиальной изменчивости ослаблен узким диапазоном частот (0,25; см. табл. 2). Однако минимальные частоты, как и на картах рис. 1Б, сосредоточены на востоке Северной Евразии, а максимальные ($0,24 \leq q \leq 0,28$) в Европе (от Карелии до Италии) и на Кавказе, хотя и не охватывают основную часть Европы. При столь узком

Таблица 3. Характеристики и фармакогенетическая значимость 12 фармакогенетических маркеров, представленных на рис. 1–3

Ген	Маркер	Аллель	Хромосома	Позиция в сборке 37	Позиция в сборке 38	Функция и значимость
<i>ABCB1</i>	rs4148738	G	7	87138645	87509329	P-гликопротеин — АТФ-зависимый транспортер, осуществляющий проведение субстратов через мембрану. Его основная задача — ограничение проникновения различных веществ, в том числе ксенобиотиков, через биологические барьеры. Также функционирует как транспортер через гематоэнцефалический барьер. Носительство полиморфизма влияет на изменение равновесных плазменных концентраций прямых оральных антикоагулянтов, что может находить отражение в вариации профилей их эффективности и безопасности
<i>CES1</i>	rs2244613	C	16	55844609	55810697	Карбоксилэстеразы — ферменты, которые гидролизуют соединения, содержащие сложные эфиры карбоновых кислот, амидные и тиоэфирные функциональные группы. Играть важную роль в гидролизе лекарств до неактивных метаболитов (дабигатран, капецитабин и др.)
<i>COMT</i>	rs4680	A	22	19951271	19963748	Катехол-О-метилтрансфераза — фермент регуляции активности дофамина в области префронтальной коры ГМ. Участвует в формировании индивидуальной чувствительности к нейролептикам, развитии побочных эффектов. Носительство полиморфизма rs4680 гена <i>COMT</i> определяет эффективность фармакотерапии никотином, опиоидами, некоторыми антипсихотиками
<i>CYP2C19</i>	rs4986893	A	10	96540410	94780653	Ферменты комплекса ферментов цитохром P450. Участвуют в метаболизме лекарств и ксенобиотиков. Уменьшение активности этих ферментов может привести к изменению профилей эффективности и безопасности препаратов (ингибиторы протонной помпы, НПВС, клопидогрел и др.)
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	C	10	96741053	94981296	
<i>Factor II</i>	rs1799963	A	11	46761055	46739505	Протромбин (2 фактор системы свертывания крови) — витамин К-зависимый гликопротеин, синтезируемый в печени в виде неактивного зимогена. Играть важную роль в гемостазе и тромбозе. Носители аллельного варианта могут иметь повышенный риск венозных тромбозов на фоне приема оральных контрацептивов
<i>Factor V Leiden</i>	rs6025	A	1	169519049	169549811	Проакцелерин (5 фактор системы свертывания крови) — растворимый белок β_2 -глобулин. Наличие лейденской мутации фактора V повышает риск первичных и рецидивирующих венозных тромбозов в 3–6 раз. Носительство данного полиморфизма важно учитывать при приеме оральных контрацептивов из-за возможного повышения риска венозных тромбозов
<i>IFNL3</i>	rs8099917	C	19	39743165	39252525	Интерферон лямбда 3. Носительство определяет снижение эффективности терапии интерферонами и рибавирином у пациентов с вирусными поражениями печени
<i>ITGB3</i>	rs5918	G	17	45360730	47283364	Интегрин бета 3. Компонент гликопротеина IIb/IIIa, обеспечивающего агрегацию тромбоцитов. Нарушения гена <i>ITGB3</i> приводят к тромбастении Гланзмана, одному из наиболее частых наследственных нарушений тромбоцитов. Проявляется в кровоточивости слизистой средней тяжести либо в тяжелой форме. Может определять эффективность антиагрегантной терапии клопидогрелом и НПВС
<i>MTFHR</i>	rs1801131	C	1	11854476	11794419	MTFHR — фермент, необходимый для метаболизма фолатов и метионина. Гомозиготы по мутантным аллелям — 30% уровня фермента MTFHR. Носительство маркера определяет изменчивость эффективности и безопасности терапии метотрексатом, капецитабином, флуорOURЦИЛОМ и др
<i>TPMT</i>	rs1800460	A	6	18139228	18138997	Фермент тиопурил метилтрансфераза. TPMT наиболее известен своей ролью в метаболизме препаратов тиопурина, таких как азатиоприн, 6-меркаптопурин и 6-тиогуанин. TPMT катализирует S-метилирование тиопуриновых лекарств. Дефекты в гене TPMT приводят к снижению метилирования и снижению инактивации 6-меркаптопурина, что ведет к увеличению токсичности
<i>VKORC1</i>	rs9923231	T (A)	16	31107689	31096368	Ген <i>VKORC1</i> кодирует фермент, субъединицу 1 комплекса эпиксид-редуктазы витамина K 1. Этот комплекс ферментных белков отвечает за восстановление 2,3-эпиксида витамина K до его активной формы, что важно для эффективного свертывания крови. Носители аллеля требуют назначения более низких доз варфарина. В литературе встречается обозначение этого аллельного перехода как C>T, так и G>A (по комплементарной цепи)

диапазоне невысоких частот ($0,02 \leq q \leq 0,28$) клинальная изменчивость становится менее четкой, поскольку возрастает роль ошибки выборки.

Паттерн равномерного распределения

Условно равномерное распределение частоты признака не означает, что во всех точках пространства он встречен с одинаковой частотой. Основные черты такого паттерна — встречаемость практически во всех

изученных популяциях, но отсутствие четкой клинальной изменчивости в масштабе всего изучаемого региона. При этом в отдельных частях картографируемого региона можно наблюдать закономерности. При выявлении резких подъемов или спадов частоты в отдельных областях важно — особенно при низких частотах признака — обращать внимание на число изученных популяций в этой области и размер выборки, поскольку эти особенности могут быть связаны с ошибкой выборки. Если же такие особенности характерны не для одной, а для нескольких соседних популяций, то это определенно указывает не на

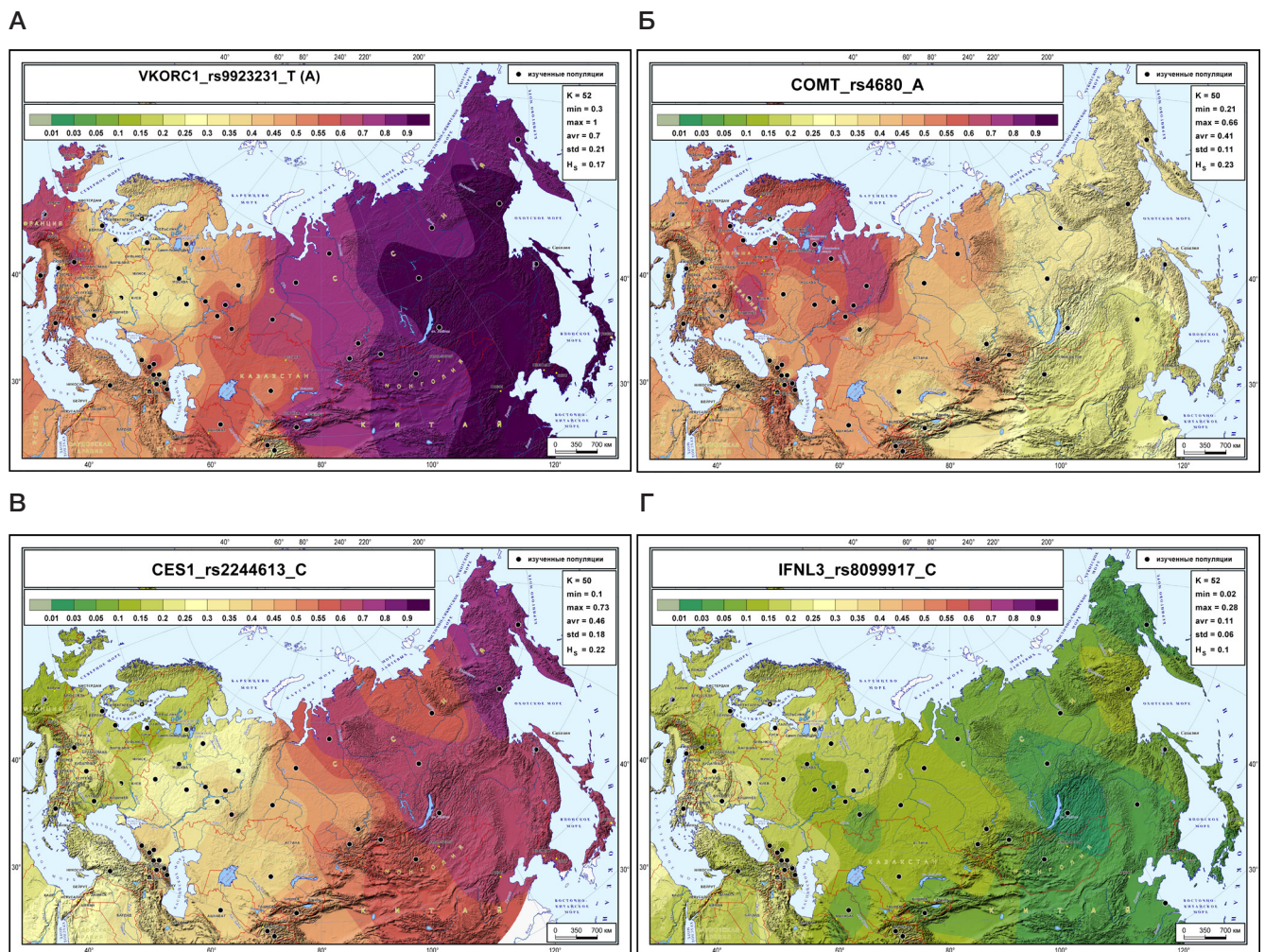


Рис. 1. Карты распределения частот фармакогенетических маркеров с паттерном клинальной пространственной изменчивости: *VKORC1* (rs9923231-T) (А); *COMT* (rs4680-A) (Б); *CES1* (rs2244613-C) (В); *IFNL3* (rs8099917-C) (Г)

случайную флуктуацию частоты, а на закономерность для данной группы популяций.

На карте распределения частоты *CYP2C9* (rs1057910-C) (рис. 2А) поражает равномерность пространственной изменчивости этого ДНК-маркера в Северной Евразии. Несмотря на низкую среднюю частоту ($q = 0,08$; см. табл. 2), едва превышающую 5%-й уровень полиморфизма, у большинства народов региона частота этого ДНК-маркера практически одинакова и варьирует в узких пределах $0,03 \leq q \leq 0,10$. Из закономерностей можно лишь отметить повышение частоты почти у всех народов Кавказа и Закавказья. Другие единичные всплески повышенной частоты (в Карелии, в Таджикистане и на Чукотке), как и единичные провалы частоты («серая зона» частоты ниже 1% в Якутии) не образуют закономерностей.

На карте распределения частоты *ITGB3* (rs5918-G) (рис. 2Б) мы вновь видим равномерность распределения при почти таком же узком диапазоне частоты ($0,02 \leq q \leq 0,28$) и столь же низкой средней частоте ($q = 0,11$). Однако нарушения равномерности уже закономерны: область более высоких частот тянется почти непрерывной полосой от Балтийского региона до устья Енисея. Второе увеличение частоты обнаружено на юге Северной Евразии — в Таджикистане и Южной Сибири.

На карте распределения частоты *MTFHR* (rs1801131-C) (рис. 2В), хотя средняя частота маркера ($q = 0,31$; см. табл. 2) в три раза выше, чем на предыдущих картах, мы

вновь видим равномерное распределение этого маркера на обширном пространстве. Область средних значений частоты ($0,25 \leq q < 0,35$) занимает практически всю территорию Северной Евразии, обнаруживая лишь два всплеска частоты в Якутии и Таджикистане.

На карте распределения частоты *ABCB1* (rs1045642-G) (рис. 2Г) средняя частота достигает $q = 0,48$ (см. табл. 2) при том же диапазоне частот, что и на предыдущей карте ($0,32$; см. табл. 2) и незначительно превышая диапазон частоты на рис. 2А ($0,19$) и рис. 2Б ($0,26$). Практически все пространство Северной Евразии и сопредельных территорий занято средними интервалами частоты маркера ($0,40 \leq q < 0,55$). Незначительное снижение частоты обнаружено на севере Средней Сибири в ядре, объединяющим популяции хантов, манси, кетов, ненцев и селькупов, а также в двух популяциях Европы — Карелии и Молдавии. Подъемы частоты так же разбросаны по региону — частоты $q > 0,6$ обнаружены на юго-западе Европы, у евреев-ашкенази, алтайцев, эвенов и народов Амура. Такие локальные небольшие подъемы и снижения частоты не нарушают общего равномерного распределения частоты маркера.

В целом, эта серия карт, как и предыдущая, демонстрирует, что паттерн изменчивости не зависит от частоты фармакогенетического маркера: и при низких, и при высоких частотах может проявиться паттерн изменчивости, отражающий равномерное распределение частоты маркера по обширной территории картографируемого региона.

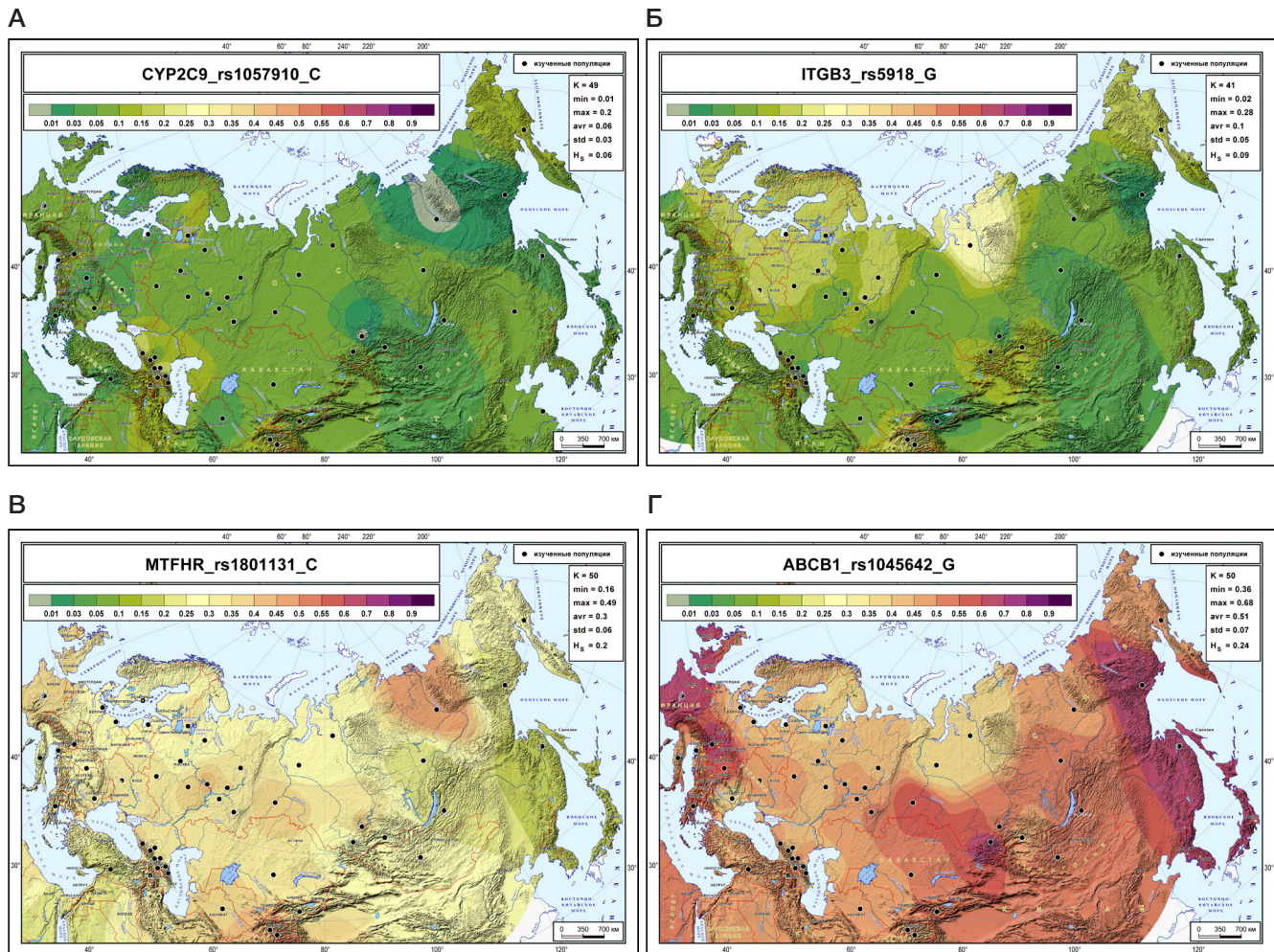


Рис. 2. Карты распределения частот фармакогенетических маркеров с паттерном равномерной пространственной изменчивости: *CYP2C9* (rs1057910-C) (А); *ITGB3* (rs5918-G) (Б); *MTFHR* (rs1801131-C) (В); *ABCB1* (rs1045642-G) (Г)

Паттерн «очаговой» изменчивости

Паттерны равномерного распределения и клинальной изменчивости характерны для фармакогенетических маркеров, встречающихся практически на всем пространстве Северной Евразии и сопредельных стран. Паттерн маркеров, которые встречаются лишь в одной, пусть даже большой, части этого региона, а в других областях не обнаружены, можно условно назвать «очаговой» изменчивостью, причем обычно частоты в «очаге» невелики. При чтении карты следует помнить, что серым фоном отмечены те популяции, в которых маркер либо отсутствует, либо ему не удалось преодолеть барьер 1% уровня полиморфизма.

На карте распределения частоты *Factor II* (rs1799963-A) (рис. 3А) с диапазоном частот ($0 \leq q \leq 0,10$; см. табл. 2) единая область встречаемости этого маркера тянется сплошной полосой по южным областям изучаемой территории от Средиземноморья до Туркмении, охватывая все народы Кавказа (за исключением лишь ингушей и чеченцев) и достигая максимума в Закавказье. За пределами южного очага находятся только две популяции с ненулевой частотой маркера — народов Мордовии ($q = 0,05$) и сибирских татар ($q = 0,02$).

На карте распределения частоты *Factor V Leiden* (rs6025-A) (рис. 3Б) диапазон частот почти такой же ($0 \leq q \leq 0,13$; табл. 2), но область очага намного шире: она охватывает сверх ареала предыдущей карты еще и значительную часть населения Восточной Европы и Волго-

Уральского региона. Максимальные частоты встречены на юге Европы, на Кавказе и в Приуралье (удмурты, марийцы, чуваш). За пределами «очага» маркер обнаружен лишь на Алтае на пределе 1%-го уровня полиморфизма.

На карте распределения частоты *TPMT* (rs1800460-A) (рис. 3В), несмотря на чрезвычайно узкий диапазон частот ($0 \leq q \leq 0,04$), не преодолевший даже 5%-й барьер полиморфизма, область очага очень велика. Она охватывает всю Европу (за исключением самого юго-запада, но скорее всего это связано с малым размером выборки басков, испанцев и французов; $n = 29$), Урал, Западную Сибирь, Казахстан и доходит до Хакасии. Своеобразной особенностью маркера является его отсутствие в большинстве популяций Кавказа, за исключением Центрального Кавказа (ингуши, осетины, чеченцы) и северного Дагестана.

На карте распределения частоты *CYP2C19* (rs4986893-A) (рис. 3Г) площадь «очага» столь велика, что занимает почти всю азиатскую часть региона (за исключением Таджикистана и Туркмении), заходя отдельными языками и на европейскую часть: в Предкавказье (ногайцы), на Кавказ (осетины) и Поволжье (марийцы, татары, удмурты, чуваш). Максимальных частот маркер достигает на Дальнем Востоке у народов Амура ($q = 0,14$) и эвенков ($q = 0,10$), а также в Хакасии ($q = 0,10$). При этом диапазон частот узок ($0 \leq q \leq 0,14$; см. табл. 2), и сами частоты такого же порядка, что и у других маркеров, представленных на рис. 3, но занимающих намного меньший ареал. Карты рис. 3 свидетельствуют, что при низких частотах и малой

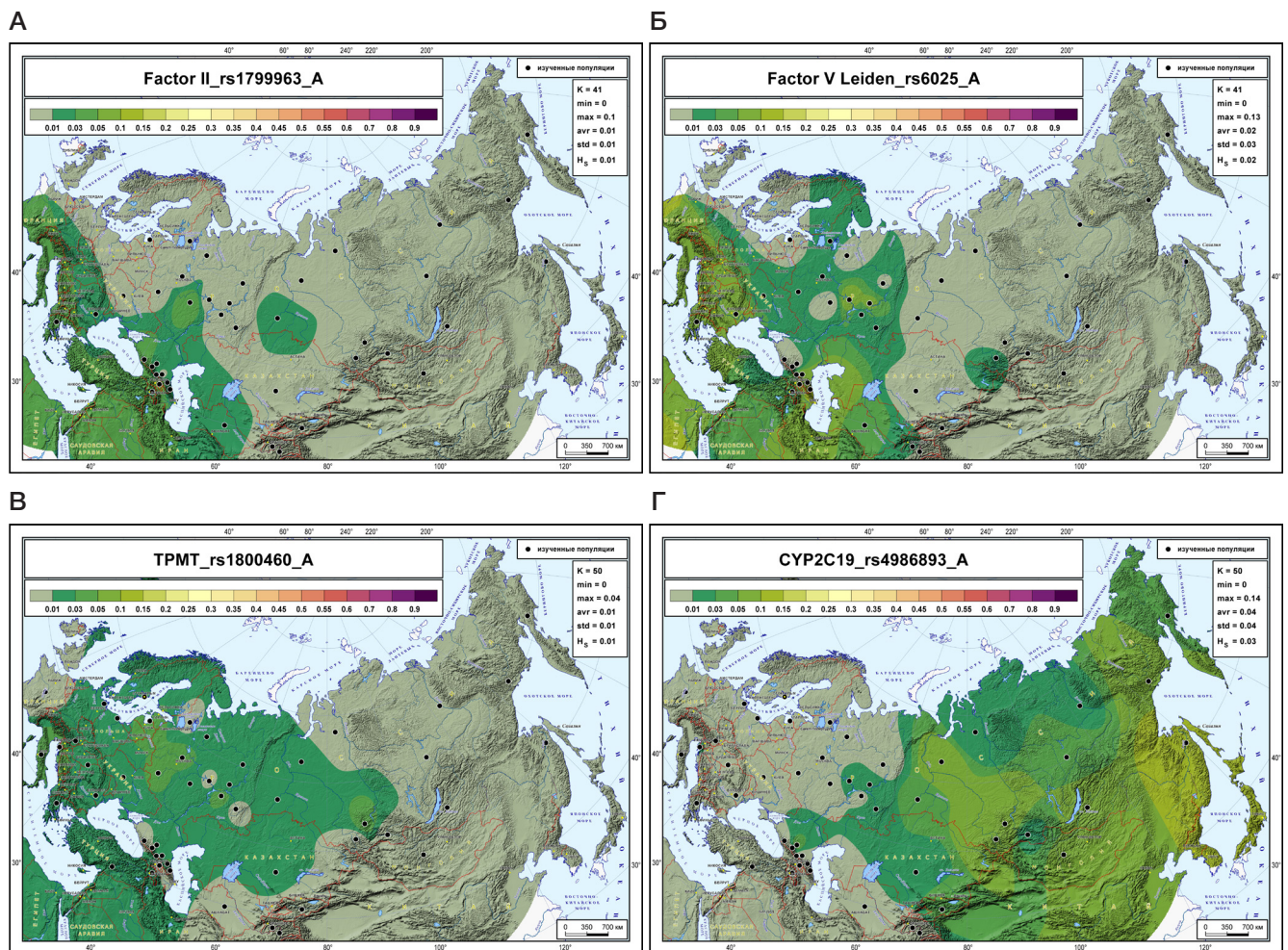


Рис. 3. Карты распределения частот фармакогенетических маркеров с паттерном «очаговой» пространственной изменчивости: *Factor II* (rs1799963-A) (А); *Factor V Leiden* (rs6025-A) (Б); *TPMT* (rs1800460-A) (В); *CYP2C19* (rs4986893-A) (Г)

изменчивости область распространения маркера может быть самой разной — от локального очага до очень обширной территории.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для фармакогенетики имеют значение два вида различий между популяциями: различия в спектре фармакогенетических маркеров и различия в их частотах. Различия в частотах означают различную (иногда контрастную) частоту встречаемости аллеля в разных популяциях, тогда как различия в спектре отражают существование аллелей, которые могут быть распространенными в одной популяции, но почти отсутствуют в другой, вплоть до маркеров, специфичных для отдельных региональных групп населения.

Из трех паттернов, выявленных в нашем исследовании, паттерны клинальной и равномерной изменчивости отражают «различия в частотах» у разных популяций региона, но при этом фармакогенетический маркер присутствует практически у всех популяций. Паттерн «очаговой» изменчивости выявляет «различия в спектре» фармакогенетических маркеров у разных популяций.

В случае клинальной изменчивости (см. рис. 1) существуют два диаметральных «полюса» частот, между которыми лежат территории с переходными значениями признака. Как было показано, чаще «полюса» характерны для маркеров с большим диапазоном частот, но это условие не обязательное: даже при небольшом диапазоне

частот можно наблюдать их четкий градиент. Клинальная изменчивость в масштабе Северной Евразии обнаружена у 6 из 45 маркеров (13% карт атласа; см. табл. 2).

В случае равномерной изменчивости (см. рис. 2) различия в частотах или невелики, или всплески и провалы разбросаны по ареалу без четкой закономерности в масштабе всего изучаемого региона. При этом рассмотрение отдельных областей позволяет указать на локальные закономерности, которые могут стать объектом отдельного исследования. Равномерная изменчивость в масштабе Северной Евразии обнаружена у 12 из 45 маркеров (27% карт атласа; см. табл. 2).

При паттерне «очаговой» изменчивости у одних популяций маркер удается обнаружить, в других он отсутствует полностью или же не достигает 1%-го уровня полиморфизма в данной популяции. Ареал присутствия маркера может быть различным (см. рис. 3) — от небольших компактных «очагов» до обширных областей. При попытке выявить закономерности изменчивости маркера в ареале «очага» очень важно учитывать ошибку выборки, так как малые объемы выборок при низких частотах признака могут исказить картину. «Очаговая» изменчивость в масштабе Северной Евразии самая частая — она обнаружена у 27 из 45 маркеров (60% карт атласа; см. табл. 2).

Картографический атлас — это систематическое собрание взаимосвязанных и взаимодополняющих друг друга карт, выполненное как целостное произведение [53]. Созданный фармакогенетический атлас включает

карты 45 ADME-маркеров в 21 гене, но общее число маркеров, для которых доказана фармакогенетическая значимость, составляет несколько сотен [2, 54]. Это одна из причин, почему составленные карты, удовлетворяющие формальным требованиям к понятию картографического атласа [53], мы называем лишь «первой рабочей версией» такого атласа. Ведь в эту версию включены лишь те из важнейших фармакогенетических маркеров, которые вошли в одну из широкогеномных панелей Illumina, а ряд важных маркеров оказался пропущен. Вторая причина связана с подробностью популяционного изучения. Карты основаны хотя и на большом числе популяций ($K = 50$), но средний объем выборки невелик ($n = 44$), поэтому построенные версии карт выявляют лишь общие закономерности в распространении каждого изученного маркера, а погрешность в определении частоты отдельно взятого маркера в отдельно взятой популяции может быть существенной. Все это указывает на необходимость дальнейшего накопления данных, которое уже начато в целом ряде исследований [15].

Тем не менее уже созданная первая версия фармакогенетического картографического атласа позволяет сделать не только наблюдения об изменчивости каждого конкретного маркера, но и ряд общих выводов. Например, атлас показывает, что средняя частота маркера и отдельные факты о его встречаемости в тех или иных популяциях не могут служить указанием на тип его распределения в пространстве. Для выявления такого паттерна изменчивости нужны иные инструменты, и наиболее адекватным является геногеографическая карта. Анализ совокупности таких карт позволяет выявить локальные области, требующие отдельного специального анализа, поскольку в них проявляются собственные закономерности. К таким областям относят Западную Европу, Кавказ, Дальний Восток, север Сибири и ряд других. Можно прогнозировать, что при широком охвате этих регионов популяциями, изученными по фармакогенетическим маркерам, в них будут выявлены важные закономерности, которые, конечно же, не сводятся только к трем основным паттернам, описанным в данной работе.

Что касается возможного применения созданного атласа в практике фармакогенетических исследований, то карты предоставляют большой объем полезных данных: указывают частоты каждого из 45 фармакогенетических маркеров для групп населения по всей территории России и сопредельных стран. Однако применение частот, указанных на картах, необходимо производить с учетом трех ограничений: ошибки выборки, привязки к коренному населению и популяционного (а не индивидуального) характера этих данных.

Первое ограничение обусловлено тем, что средний объем выборки в нашем исследовании составляет 44 индивидуума (88 хромосом), поэтому при частоте, допустим, 25%, доверительный интервал включает погрешность $\pm 6\%$. Этот доверительный интервал намного уже на территории России (где выборки большие) и шире на многих сопредельных территориях (выборки в опубликованных данных невелики). Для учета флуктуации доверительного интервала в атласе карты частоты признака могут сопровождаться картами надежности [55].

Второе ограничение связано с тем, что на каждой территории карты представляют генофонд ее коренного населения. Поэтому для оценки встречаемости фармакогенетического маркера, например, в русском населении Сибири следует использовать значения,

указанные на картах не для Сибири, а для источника миграции, например Центральной России. Таким образом, зная генеалогию пациента, с помощью картографического атласа можно сконструировать его «фармакогенетический портрет», если нет возможности тестировать индивидуальный генотип пациента.

Третье ограничение присуще всем популяционным фармакогенетическим работам: генотип каждого отдельного пациента не обязательно воспроизводит средние характеристики генофонда его популяции, но эти популяционные характеристики являются наилучшей возможной аппроксимацией индивидуального генотипа. Это позволяет использовать общепринятые фармакогенетические протоколы, но вместо индивидуального генотипа учитывать усредненный генотип, основанный на частотах аллелей в данной популяции. При очевидных ограничениях такого подхода в мировой литературе сформировалось мнение, что он оптимален в тех случаях, когда индивидуальный генотип пациента неизвестен или его сложно получить в конкретных социально-экономических условиях. В последующих работах нами планируется провести фармакоэкономический анализ значимости популяционных частот, основанный на экономической оценке стоимости корректировки последствий не оптимально подобранных доз.

ВЫВОДЫ

По данным о 50 популяциях России и сопредельных стран создан картографический атлас распространения 45 фармакогенетических маркеров. Геногеографический атлас содержит 45 карт, демонстрирующих частоту встречаемости фармакогенетических маркеров в широком круге популяций России в виде, доступном для специалистов разного профиля и различного уровня специальной подготовки.

Фармакогенетический атлас населения России и сопредельных стран выявил три основных паттерна пространственной изменчивости ADME-генов, генов, кодирующих фармакодинамические мишени лекарственных средств, и генов, кодирующих компоненты системы гемостаза. Паттерн клинальной изменчивости (градиентного изменения частот фармакогенетических маркеров по оси «восток-запад») объединяет маркеры, следующие основной закономерности изменчивости всего генофонда народонаселения Северной Евразии. Паттерн равномерного распределения выделяет группу маркеров, средняя частота которых характерна для большинства регионов России. Паттерн «очаговой» изменчивости объединяет маркеры, характерные только для определенной группы этносов и отсутствующие в других регионах.

Нехватка информации о распространенности фармакогенетических маркеров среди этнических групп России приводит к невозможности внедрения алгоритмов персонализации, разработанных для популяций Западной Европы: имеются многочисленные примеры, когда стандартизированный алгоритм подбора дозы жизненно важного препарата оказывался недостаточно эффективен в других регионах. Для адаптации фармакогенетических алгоритмов к населению РФ необходимы данные о распространенности клинически значимых маркеров в российских популяциях. Данная работа представляет большой объем новых данных в систематическом виде и тем самым вносит некоторый вклад в разработку этого важного направления, требующего специального планирования и дополнительных масштабных исследований.

Литература

1. Core ADME Gene List [internet]. www.pharmaadme.org. ©2020 — [cited 2020 Nov 4]. Available from: http://pharmaadme.org/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=27.
2. pharmgkb.org [internet]. ©2001–2020 PharmGKB [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://www.pharmgkb.org>.
3. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94 (3): 317–23. DOI: 10.1038/clpt.2013.105.
4. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Van Driest SL, El Roubi N, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2020. DOI: 10.1002/cpt.2015. Epub ahead of print.
5. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein CM, Scott SA, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2017; 102 (3): 397–404. DOI: 10.1002/cpt.668.
6. Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev.* 1996; 10 (1): 45–52. DOI: 10.1016/s0268-960x(96)90019-3.
7. Urban TJ. Race, ethnicity, ancestry, and pharmacogenetics. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77 (2): 133–9. DOI:10.1002/msj.20168.
8. Hernandez W, Gamazon ER, Aquino-Michaels K, Smithberger E, O'Brien TJ, Harralson AF, et al. Integrated analysis of genetic variation and gene expression reveals novel variant for increased warfarin dose requirement in African Americans. *J Thromb Haemost.* 2017; 15 (4): 735–43. DOI: 10.1111/jth.13639.
9. Rajman I, Knapp L, Morgan T, Masimirembwa C. African Genetic Diversity: Implications for Cytochrome P450-mediated Drug Metabolism and Drug Development. *EBioMedicine.* 2017; 17: 67–74. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.02.017.
10. Duconge J, Ramos AS, Claudio-Campos K, Rivera-Miranda G, Bermúdez-Bosch L, Renta JY, et al. A Novel Admixture-Based Pharmacogenetic Approach to Refine Warfarin Dosing in Caribbean Hispanics. *PLoS One.* 2016; 11 (1): e0145480. DOI: 10.1371/journal.pone.0145480.
11. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimir N, Balogh I, Başak N, et al. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. *PLoS One.* 2016; 11 (9): e0162866. DOI: 10.1371/journal.pone.0162866.
12. Li J, Lou H, Yang X, Lu D, Li S, Jin L, et al. Genetic architectures of ADME genes in five Eurasian admixed populations and implications for drug safety and efficacy. *J Med Genet.* 2014; 51 (9): 614–22. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102530.
13. Duconge J, Ruaño G. Admixture and ethno-specific alleles: missing links for global pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2016; 17 (14): 1479–82. DOI: 10.2217/pgs-2016-0115.
14. Lonjou C, Thomas L, Borot N, Ledger N, de Toma C, LeLouet H, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome ...: ethnicity matters. *Pharmacogenomics J.* 2006; 6 (4): 265–8. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500356.
15. Mirzaev KB, Fedorinov DS, Ivashchenko DV, Sychev DA. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia. *Pharmacogenomics.* 2019; 20 (11): 847–65. DOI: 10.2217/pgs-2019-0013.
16. Мустафина О. Е., Туктарова И. А., Каримов Д. Д., Сомова Р. Ш., Насибуллин Т. Р. Полиморфизм генов CYP2D6, CYP3A5, и CYP3A4 в популяциях русских, татар и башкир. *Генетика.* 2015; 51 (1): 109–19. DOI: 10.7868/S0016675815010087.
17. Korytina G, Kochetova O, Akhmadishina L, Viktorova E, Victorova T. Polymorphisms of cytochrome p450 genes in three ethnic groups from Russia. *Balkan Med J.* 2012; 29 (3): 252–60. DOI:10.5152/balkanmedj.2012.039.
18. Кочетова О. В., Корытина Г. Ф., Ахмадишина Л. З., Исакова Г. М., Викторова Т. В. Анализ полиморфизма гена цитохрома P450 1A1 (CYP1A1) в этнических группах республики Башкортостан. *Генетика.* 2008; 44 (12): 1677–83.
19. Корытина Г. Ф., Целуосова О. С., Ахмадишина Л. З., Кочетова О. В., Бабенкова Л. И., Викторова Т. В. Анализ ассоциации полиморфных маркеров генов медиаторов воспаления (IL1B, tnfA, LTA, IL8, IL6, IL1RN, IL10, TGFb, TLR4, DBP) с развитием хронических заболеваний респираторной системы у детей. *Медицинская генетика.* 2008; 7 (2): 17–25.
20. Корытина Г. Ф., Ахмадишина Л. З., Викторова Т. В. Частоты полиморфных вариантов генов CYP1B1 и CYP2F1 в трех этнических группах жителей Республики Башкортостан и у больных хронической обструктивной болезнью легких. *Молекулярная биология.* 2010; 44 (1): 33–41.
21. Ахмадишина Л. З., Корытина Г. Ф., Мингазова С. Р., Янбаева Д. Г., Бакиров А. Б., Викторова Т. В. Роль полиморфизма генов CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 и GSTP1 в развитии хронических бронхитов профессионального генеза. *Экологическая генетика.* 2005; (1): 11–7.
22. Федорова Ю. Ю., Карунас А. С., Нурғалиева А. Х., Гра О. А., Гималова Г. Ф., Рамазанова Н. Н. и др. Роль полиморфных вариантов генов системы биотрансформации в развитии аллергических заболеваний у татар. *Медицинская генетика.* 2010; 9 (6): 28–35.
23. Polonikov A, Kharchenko A, Bykanova M, Sirotina S, Ponomarenko I, Bocharova A, et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene.* 2017; 627: 451–9. DOI: 10.1016/j.gene.2017.07.004.
24. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 59 (4): 303–12. DOI: 10.1007/s00228-003-0606-2.
25. Gra O, Mityaeva O, Berdichevets I, Kozhebaeva Z, Fesenko D, Kurbatova O, et al. Microarray-based detection of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, NAT2, HLA-DQA1, and ABO allele frequencies in native Russians. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14 (3): 329–42. DOI: 10.1089/gtmb.2009.0158.
26. Балановская Е. В., Жабалин М. К., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика.* 2016; 52 (12): 1371–87. DOI: 10.7868/S001667581612002X.
27. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2012; 92 (4): 414–17. pharmgkb.org [internet]. ©2001–2020 «Very Important Pharmacogene» (VIP) [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/vips/>.
28. Балановский О. П., Горин И. О., Записецкая Ю. С., Голубева А. А., Кострюкова Е. С., Балановская Е. В. Взаимодействие генофонов русского и финноязычного населения Тверской области: анализ 4 млн SNP-маркеров. *Вестник РГМУ.* 2020; 6 (в печати).
29. Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, Parik J, et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature.* 2010; 466 (7303): 238–42. DOI: 10.1038/nature09103.
30. Behar DM, Metspalu M, Baran Y, Kopelman NM, Yunusbayev B, Gladstein A, et al. No evidence from genome-wide data of a Khazar origin for the Ashkenazi Jews. *Hum Biol.* 2013; 85 (6): 859–900. DOI: 10.3378/027.085.0604.
31. Chaubey G, Metspalu M, Choi Y, Mägi R, Romero IG, Soares P, et al. Population genetic structure in Indian Austroasiatic speakers: the role of landscape barriers and sex-specific admixture. *Mol Biol Evol.* 2011; 28 (2): 1013–24. DOI: 10.1093/molbev/msq288.
32. Di Cristofaro J, Pennarun E, Mazières S, Myres NM, Lin AA, Temori SA, et al. Afghan Hindu Kush: where Eurasian sub-continent gene flows converge. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e76748. DOI: 10.1371/journal.pone.0076748.
33. Fedorova SA, Reidla M, Metspalu E, Metspalu M, Rootsi S, Tambets K, et al. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia. *BMC Evol Biol.* 2013; 13: 127. DOI: 10.1186/1471-2148-13-127.

34. Flegontov P, Changmai P, Zidkova A, Logacheva MD, Altınışık NE, Flegontova O, et al. Genomic study of the Ket: a Paleo-Eskimo-related ethnic group with significant ancient North Eurasian ancestry. *Sci Rep*. 2016; 6: 20768. DOI: 10.1038/srep20768.
35. Haber M, Mezzavilla M, Xue Y, Comas D, Gasparini P, Zalloua P, et al. Genetic evidence for an origin of the Armenians from Bronze Age mixing of multiple populations. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24 (6): 931–6. DOI: 10.1038/ejhg.2015.206.
36. Kovacevic L, Tambets K, Ilumäe AM, Kushniarevich A, Yunusbayev B, Solnik A, et al. Standing at the gateway to Europe--the genetic structure of Western balkan populations based on autosomal and haploid markers. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e105090. DOI: 10.1371/journal.pone.0105090.
37. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktvertye I, et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS One*. 2015; 10 (9): e0135820. DOI: 10.1371/journal.pone.0135820.
38. Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science*. 2008; 319 (5866): 1100–4. DOI: 10.1126/science.1153717.
39. Raghavan M, Skoglund P, Graf KE, Metspalu M, Albrechtsen A, Moltke I, et al. Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans. *Nature*. 2014; 505 (7481): 87–91. DOI: 10.1038/nature12736.
40. Raghavan M, DeGiorgio M, Albrechtsen A, Moltke I, Skoglund P, Korneliussen TS, et al. The genetic prehistory of the New World Arctic. *Science*. 2014; 345 (6200): 1255832. DOI: 10.1126/science.1255832.
41. Raghavan M, Steinrücken M, Harris K, Schiffels S, Rasmussen S, DeGiorgio M, et al. POPULATION GENETICS. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*. 2015; 349 (6250): aab3884. DOI: 10.1126/science.aab3884.
42. Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, et al. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*. 2010; 463 (7282): 757–62. DOI: 10.1038/nature08835.
43. Yunusbayev B, Metspalu M, Järve M, Kutuev I, Rootsi S, Metspalu E, et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Mol Biol Evol*. 2012; 29 (1): 359–65. DOI: 10.1093/molbev/msr221.
44. Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Valeev A, Litvinov S, Valiev R, et al. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genet*. 2015; 11 (4): e1005068. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005068.
45. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015; 4 (1): 7. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
46. Purcell S, Chang C. PLINK: Whole genome association analysis toolset. Version 1.9 [software]. [cited 2020 Nov 4]. Available from: www.cog-genomics.org/plink/1.9/.
47. Balanovsky O, Dibirova K, Dybo A, Mudrak O, Frolova S, Pocheshkhova E, et al. Parallel Evolution of Genes and Languages in the Caucasus Region. *Mol Biol Evol*. 2011; 28 (10): 2905–20. DOI: 10.1093/molbev/msr126.
48. Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В сборнике: Лурье И. К., Кравцова В. И., редакторы. Современная географическая картография. М.: Дата+, 2012; с. 158–66.
49. Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007; 416 с.
50. Balanovsky O, Zhabagin M, Agdzhoyan A, Chukhryaeva M, Zaporozhchenko V, Utevska O, et al. Deep phylogenetic analysis of haplogroup G1 provides estimates of SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome and reveals migrations of Iranian speakers. *PLoS One*. 2015; 10 (4): e0122968. DOI: 10.1371/journal.pone.0122968.
51. Рычков Ю. Г., Балановская Е. В. Генофонд и геногеография населения СССР. *Генетика*. 1992; (28): 52–75.
52. Балановская Е. В., Грехова Л. В., Рычков Ю. Г. Компьютерная геногеография и археология: методы картографического моделирования распространения материальной культуры. В сборнике: Горизонты антропологии. М.: Русский мир, 1997; с. 54–62.
53. Берлянт А. М. Картография: Учебник для вузов. М.: Аспект Пресс, 2002; 336 с.
54. Genes-Drugs [internet]. CPIC. 2020 [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://cpicpgx.org/genes-drugs>.
55. Нурбаев С. Д., Балановская Е. В. Геногеография и генофонд. Оценивание надежности карты. В сборнике: Новые методы — новые подходы в современной антропологии. М.: Старый сад, 1997; с.116–32.

References

1. Core ADME Gene List [internet]. www.pharmaadme.org. ©2020 — [cited 2020 Nov 4]. Available from: http://www.pharmaadme.org/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=27.
2. pharmgkb.org [internet]. ©2001–2020 PharmGKB [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://www.pharmgkb.org>.
3. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 94 (3): 317–23. DOI: 10.1038/clpt.2013.105.
4. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Van Driest SL, El Rouby N, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2020. DOI: 10.1002/cpt.2015. Epub ahead of print.
5. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein CM, Scott SA, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 102 (3): 397–404. DOI: 10.1002/cpt.668.
6. Beutler E. G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev*. 1996; 10 (1): 45–52. DOI: 10.1016/s0268-960x(96)90019-3.
7. Urban TJ. Race, ethnicity, ancestry, and pharmacogenetics. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77 (2): 133–9. DOI:10.1002/msj.20168.
8. Hernandez W, Gamazon ER, Aquino-Michaels K, Smithberger E, O'Brien TJ, Harralson AF, et al. Integrated analysis of genetic variation and gene expression reveals novel variant for increased warfarin dose requirement in African Americans. *J Thromb Haemost*. 2017; 15 (4): 735–43. DOI: 10.1111/jth.13639.
9. Rajman I, Knapp L, Morgan T, Masimirembwa C. African Genetic Diversity: Implications for Cytochrome P450-mediated Drug Metabolism and Drug Development. *EBioMedicine*. 2017; 17: 67–74. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.02.017.
10. Duconge J, Ramos AS, Claudio-Campos K, Rivera-Miranda G, Bermúdez-Bosch L, Renta JY, et al. A Novel Admixture-Based Pharmacogenetic Approach to Refine Warfarin Dosing in Caribbean Hispanics. *PLoS One*. 2016; 11 (1): e0145480. DOI: 10.1371/journal.pone.0145480.
11. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimir N, Balogh I, Başak N, et al. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. *PLoS One*. 2016; 11 (9): e0162866. DOI: 10.1371/journal.pone.0162866.
12. Li J, Lou H, Yang X, Lu D, Jin L, et al. Genetic architectures of ADME genes in five Eurasian admixed populations and implications for drug safety and efficacy. *J Med Genet*. 2014; 51 (9): 614–22. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102530.
13. Duconge J, Ruaño G. Admixture and ethno-specific alleles: missing links for global pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2016; 17 (14): 1479–82. DOI: 10.2217/pgs-2016-0115.
14. Lonjou C, Thomas L, Borot N, Ledger N, de Toma C, LeLouet H, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome ...: ethnicity

- matters. *Pharmacogenomics J.* 2006; 6 (4): 265–8. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500356.
15. Mirzaev KB, Fedorin DS, Ivashchenko DV, Sychev DA. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia. *Pharmacogenomics.* 2019; 20 (11): 847–65. DOI: 10.2217/pgs-2019-0013.
 16. Mustafina OE, Tuktarova IA, Karimov DD, Somova RS, Nasibullin TR. CYP2D6, CYP3A5, and CYP3A4 gene polymorphisms in Russian, Tatar, and Bashkir populations. *Russ J Genet.* 2015; 51 (1): 98–107. DOI: 10.1134/S1022795415010081.
 17. Korytina G, Kochetova O, Akhmadishina L, Viktorova E, Victorova T. Polymorphisms of cytochrome p450 genes in three ethnic groups from Russia. *Balkan Med J.* 2012; 29 (3): 252–60. DOI: 10.5152/balkanmedj.2012.039.
 18. Kochetova OV, Korytina GF, Akhmadishina LZ, Victorova TV, Iskhakova GM. Analysis of the cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphism in the ethnic groups of the republic of Bashkortostan. *Russ J Genet.* 2008; 44 (12): 1454–60. DOI: 10.1134/S1022795408120107.
 19. Korytina GF, Celousova OS, Akhmadishina LZ, Kochetova OV, Babenkova LI, Victorova TV. Association of polymorphism of inflammatory mediators (IL1B, TNFA, LTA, IL8, IL6, ILRN, ILR4, TGFβ, TLR4, DBF) genes with chronic lung disease in children. *Meditsinskaya genetika.* 2008; 7 (2): 17–25. Russian.
 20. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Victorova TV. Frequencies of CYP1B1 and CYP2F1 polymorphic variants in three ethnic groups of Bashkortostan and in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Biol.* 2010; 44 (1): 28–36. DOI: 10.1134/S002689331001005X.
 21. Akhmadishina LZ, Korytina GF, Mingazova SR, Yanbaeva DG, Bakirov AB, Victorova TV. Rol' polimorfizma genov CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 i GSTP1 v razviti khronicheskikh bronkhito v professional'nogo geneza. *Ekologicheskaya genetika.* 2005; (1): 11–7. Russian.
 22. Fedorova YY, Karunas AS, Nurgalieva AKh, Gra OA, Gimalova GF, Ramazanov NN, et al. Role of xenobiotic-metabolizing gene polymorphisms in allergic diseases susceptibility in Tatars. *Meditsinskaya genetika.* 2010; 9 (6): 28–35. Russian.
 23. Polonikov A, Kharchenko A, Bykanova M, Sirotina S, Ponomarenko I, Bocharova A, et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene.* 2017; 627: 451–9. DOI: 10.1016/j.gene.2017.07.004.
 24. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmüller J, Frötschl R, Köpke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 59 (4): 303–12. DOI: 10.1007/s00228-003-0606-2.
 25. Gra O, Mityaeva O, Berdichevets I, Kozhekbaeva Z, Fesenko D, Kurbatova O, et al. Microarray-based detection of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, NAT2, HLA-DQA1, and AB0 allele frequencies in native Russians. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14 (3): 329–42. DOI: 10.1089/gtmb.2009.0158.
 26. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdzhoian AT, Chukhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, et al. Population biobanks: Organizational models and prospects of application in gene geography and personalized medicine. *Russ J Genet.* 2016; 52 (12): 1227–43. DOI: 10.1134/S1022795416120024.
 27. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2012; 92 (4): 414–17. pharmgkb.org [internet]. ©2001–2020 «Very Important Pharmacogene» (VIP) [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/vips/>.
 28. Balanovsky OP, Gorin IO, Zapisetskaya YuS, Golubeva AA, Kostyukova ES, Balanovska EV. Interactions between gene pools of Russian and Finnish-speaking populations from Tver region: analysis of 4 million SNP markers *Bulletin of RSMU.* 2020; 6 (in print).
 29. Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, Parik J, et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature.* 2010; 466 (7303): 238–42. DOI: 10.1038/nature09103.
 30. Behar DM, Metspalu M, Baran Y, Kopelman NM, Yunusbayev B, Gladstein A, et al. No evidence from genome-wide data of a Khazar origin for the Ashkenazi Jews. *Hum Biol.* 2013; 85 (6): 859–900. DOI: 10.3378/027.085.0604.
 31. Chaubey G, Metspalu M, Choi Y, Mägi R, Romero IG, Soares P, et al. Population genetic structure in Indian Austroasiatic speakers: the role of landscape barriers and sex-specific admixture. *Mol Biol Evol.* 2011; 28 (2): 1013–24. DOI: 10.1093/molbev/msq288.
 32. Di Cristofaro J, Pennarun E, Mazières S, Myres NM, Lin AA, Temori SA, et al. Afghan Hindu Kush: where Eurasian sub-continent gene flows converge. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e76748. DOI: 10.1371/journal.pone.0076748.
 33. Fedorova SA, Reidla M, Metspalu E, Metspalu M, Rootsi S, Tambets K, et al. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia. *BMC Evol Biol.* 2013; 13: 127. DOI: 10.1186/1471-2148-13-127.
 34. Flegontov P, Changmai P, Zidkova A, Logacheva MD, Altınışık NE, Flegontova O, et al. Genomic study of the Ket: a Paleo-Eskimo-related ethnic group with significant ancient North Eurasian ancestry. *Sci Rep.* 2016; 6: 20768. DOI: 10.1038/srep20768.
 35. Haber M, Mezzavilla M, Xue Y, Comas D, Gasparini P, Zalloua P, et al. Genetic evidence for an origin of the Armenians from Bronze Age mixing of multiple populations. *Eur J Hum Genet.* 2016; 24 (6): 931–6. DOI: 10.1038/ejhg.2015.206.
 36. Kovacevic L, Tambets K, Ilumäe AM, Kushniarevich A, Yunusbayev B, Solnik A, et al. Standing at the gateway to Europe—the genetic structure of Western balkan populations based on autosomal and haploid markers. *PLoS One.* 2014; 9 (8): e105090. DOI: 10.1371/journal.pone.0105090.
 37. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoian A, Dibirova K, Uktveryte I, et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS One.* 2015; 10 (9): e0135820. DOI: 10.1371/journal.pone.0135820.
 38. Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, et al. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science.* 2008; 319 (5866): 1100–4. DOI: 10.1126/science.1153717.
 39. Raghavan M, Skoglund P, Graf KE, Metspalu M, Albrechtsen A, Moltke I, et al. Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans. *Nature.* 2014; 505 (7481): 87–91. DOI: 10.1038/nature12736.
 40. Raghavan M, DeGiorgio M, Albrechtsen A, Moltke I, Skoglund P, Kornelissen TS, et al. The genetic prehistory of the New World Arctic. *Science.* 2014; 345 (6200): 1255832. DOI: 10.1126/science.1255832.
 41. Raghavan M, Steinrücken M, Harris K, Schiffels S, Rasmussen S, DeGiorgio M, et al. POPULATION GENETICS. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science.* 2015; 349 (6250): aab3884. DOI: 10.1126/science.aab3884.
 42. Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, et al. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature.* 2010; 463 (7282): 757–62. DOI: 10.1038/nature08835.
 43. Yunusbayev B, Metspalu M, Järve M, Kutuev I, Rootsi S, Metspalu E, et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Mol Biol Evol.* 2012; 29 (1): 359–65. DOI: 10.1093/molbev/msr221.
 44. Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Valeev A, Litvinov S, Valiev R, et al. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genet.* 2015; 11 (4): e1005068. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005068.
 45. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience.* 2015; 4 (1): 7. DOI: 10.1186/s13742-015-0047-8.
 46. Purcell S, Chang C. PLINK: Whole genome association analysis toolset. Version 1.9 [software]. [cited 2020 Nov 4]. Available from: www.cog-genomics.org/plink/1.9/.
 47. Balanovsky O, Dibirova K, Dybo A, Mudrak O, Frolova S, Pocheshkhova E, et al. Parallel Evolution of Genes and Languages in the Caucasus Region. *Mol Biol Evol.* 2011; 28 (10): 2905–20. DOI: 10.1093/molbev/msr126.

48. Koshel SM. Geoinformatsionnye tekhnologii v genogeografii. V sbornike: Lur'e I. K., Kravtsova V. I., redaktory. Sovremennaya geograficheskaya kartografiya. M: Data+, 2012; p. 158–66. Russian.
49. Balanovska EV, Balanovsky OP. Russkiy genofond na Russkoy ravnine. M.: Luch, 2007; 416 p. Russian.
50. Balanovsky O, Zhabagin M, Agdzhoyan A, Chukhryaeva M, Zaporozhchenko V, Utevska O, et al. Deep phylogenetic analysis of haplogroup G1 provides estimates of SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome and reveals migrations of Iranic speakers. PLoS One. 2015; 10 (4): e0122968. DOI: 10.1371/journal.pone.0122968.
51. Rychkov YuG, Balanovska EV. Genofond i genogeografiya naseleniya SSSR. Genetika. 1992; (28): 52–75. Russian.
52. Balanovska EV, Grekhova LV, Rychkov YuG. Komp'yuternaya genogeografiya i arkheologiya: metody kartograficheskogo modelirovaniya rasprostraneniya material'noy kul'tury. V sbornike: Gorizonty antropologii. M.: Russkiy mir, 1997; p. 54–62. Russian.
53. Berlyant AM. Kartografiya: Uchebnik dlya vuzov. M.: Aspekt Press, 2002; 336 p. Russian.
54. Genes-Drugs [internet]. CPIC. 2020 [cited 2020 Nov 4]. Available from: <https://cpicpgx.org/genes-drugs>.
55. Nurbaev SD, Balanovska EV. Genogeografiya i genofond. Otsenivanie nadezhnosti karty. V sbornike: Novye metody — novye podkhody v sovremennoy antropologii. M.: Staryy sad, 1997; p. 116–32. Russian.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ микроРНК И мРНК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HT-29 В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

С. А. Нерсисян¹, А. В. Галатенко^{2,3}, Д. В. Мальцева^{1,4} ✉, Ю. А. Ушкарев¹, А. Г. Тоневицкий^{1,4}

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

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

³ Московский центр фундаментальной и прикладной математики, Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Гипоксия возникает в различных патофизиологических процессах, включая прогрессирование опухолевых заболеваний и метастазирование. Один из механизмов молекулярного ответа клеток на гипоксию состоит в рекрутировании специфических микроРНК, регулирующих экспрессию своих генов-мишеней. Целью работы было оценить изменения экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека HT-29 в ответ на гипоксию с помощью интегрированного секвенирования микроРНК и мРНК. Для моделирования условий гипоксии клетки обрабатывали хлоридом кобальта (II). Было обнаружено достоверное изменение экспрессии 16 человеческих микроРНК, шесть из которых (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-425-5p) имели статистически значимую долю генов-мишеней с противоположным направлением изменения экспрессии. На основании биоинформатического анализа взаимодействий дифференциально экспрессированных факторов транскрипции и микроРНК была построена возможная регуляторная сеть, основными узлами которой оказались HIF-1α, p65, c-Myc и Egr1 (кодируемые генами *HIF1A*, *RELA*, *MYC* и *EGR1*).

Ключевые слова: гипоксия, микроРНК, мРНК, транскриптом, секвенирование, эпителий кишечника, HIF-1α, HT-29

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 17-14-01338).

Вклад авторов: С. А. Нерсисян и А. В. Галатенко — обработка данных секвенирования, биоинформатический анализ, функциональный анализ генов, построение регуляторной сети взаимодействий, подготовка рукописи статьи; Д. В. Мальцева — работа с клетками, подготовка образцов для секвенирования, подготовка рукописи к публикации; Ю. А. Ушкарев — обсуждение результатов, рецензирование текста статьи; А. Г. Тоневицкий — организация исследования, анализ полученных результатов, подготовка рукописи статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

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

Статья получена: 26.10.2020 **Статья принята к печати:** 22.11.2020 **Опубликована онлайн:** 07.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.074

INTERRELATION BETWEEN miRNA AND mRNA EXPRESSION IN HT-29 LINE CELLS UNDER HYPOXIA

Nersisyan SA¹, Galatenko AV^{2,3}, Maltseva DV^{1,4} ✉, Ushkaryov YuA¹, AG Tonevitskiy AG^{1,4}

¹ Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russia

² Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Moscow Center for Fundamental and Applied Mathematics, Moscow, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Hypoxia accompanies various pathophysiological processes, including progression of tumors and metastasis. One of the mechanisms of molecular response of cells to hypoxia implies recruitment of specific miRNAs that regulate the expression of their target genes. This study aimed to evaluate the hypoxia-induced change in expression of miRNAs and their target genes in the HT-29 human colorectal adenocarcinoma cell line with the help of integrated miRNA and mRNA sequencing. To simulate hypoxia, the cells were treated with cobalt (II) chloride. We registered a significant change in expression of sixteen human miRNAs. Six of them (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-425-5p) had a significant proportion of target genes that had the expression changing in the opposite direction. Based on the bioinformatic analysis of interactions between differentially expressed transcription factors and miRNAs, we built a possible regulatory network with its main hubs being HIF-1α, p65, c-Myc, and Egr1 (encoded by the *HIF1A*, *RELA*, *MYC* and *EGR1* genes).

Keywords: hypoxia, miRNA, mRNA, transcriptome, sequencing, intestinal epithelium, HIF-1α, HT-29

Funding: the work was supported financially by the Russian Science Foundation (agreement #17-14-01338).

Author contribution: SA Nersisyan and AV Galatenko — sequencing data processing, bioinformatic analysis, functional gene analysis, building the regulatory network of interactions, manuscript preparation; DV Maltseva — cell culturing work, preparation of samples for sequencing, manuscript preparation for publication; YA Ushkaryov — discussion of the results, article text review; AG Tonevitskiy — research organization, analysis of the results, article manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Amur State Medical Academy (Protocol № 10 dated November 20, 2019); the study conformed with the guidelines for the medical research involving human subjects. Voluntary informed consent was obtained from all the participants.

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

Received: 26.10.2020 **Accepted:** 22.11.2020 **Published online:** 07.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.074

Гипоксия играет роль в развитии и течении ряда патологических состояний, таких как сердечно-сосудистые [1] и опухолевые заболевания [2]. Использование моделей гипоксии *in vitro* — информативный подход для изучения реакции на гипоксию на молекулярном и клеточном уровнях. Одна из традиционных моделей состоит в имитации гипоксии с использованием химических агентов, вызывающих активацию сигнальных путей гипоксии. Использование CoCl_2 — один из самых распространенных вариантов индукции химической гипоксии, поскольку вызывает прямую и долгосрочную стабилизацию индуцируемых гипоксией факторов 1 и 2 (HIF-1, HIF-2) [3].

МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК, основная функциональная активность которых заключается в посттранскрипционном подавлении генов [4]. Обычно одна микроРНК имеет десятки генов-мишеней, при этом 3'-UTR какого-либо гена может содержать места связывания для сотен микроРНК [5]. Было показано, что взаимодействия между микроРНК и их генами-мишенями играют важную роль в межклеточной коммуникации [6] и патогенезе множества заболеваний, включая различные типы опухолей [7, 8].

В ряде исследований изучали роль и функциональную активность клеточных микроРНК в условиях гипоксического стресса. Обнаружено, что некоторые микроРНК, такие как miR-210 или miR-27, изменяются гипоксией во многих клетках, дифференциальная экспрессия miRNA и их таргетами обычно зависят от механизма индукции гипоксии и типа клеток [9]. Установлена также связь между паттернами изменения экспрессии микроРНК, вызванными гипоксией и опухолевыми заболеваниями: большая часть микроРНК, ассоциированных с опухолями, может быть затронута гипоксией [10].

Целью данной работы было исследовать влияние гипоксии на транскриптом и профиль микроРНК в клетках линии колоректальной аденокарциномы человека HT-29 и выявить потенциальные ключевые молекулы, участвующие в ответе на гипоксию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и обработка клеток

Клетки линии колоректальной аденокарциномы человека HT-29 (ATCC; США) культивировали в среде McCoy's 5A (Thermo Fisher Scientific; США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific; США). К питательной среде добавляли пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Клетки рассаживали в шестилуночные планшеты в количестве 4×10^5 клеток в лунку и культивировали в увлажненной атмосфере при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в течение 48 ч. Для индукции гипоксии готовили свежий раствор хлорида кобальта (CoCl_2) в воде, добавляли в среду для получения конечной концентрации 300 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. Проводили по три биологических повтора как для контрольных, так и для обработанных клеток.

Выделение РНК

Клетки лизировали в Qiazol Lysis Reagent (Qiagen; Германия) для последующей экстракции тотальной РНК с использованием набора Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden; Германия). Количество выделенной РНК определяли с помощью Nanodrop (Thermo Fisher Scientific; США).

Анализ качества выделенных образцов РНК проводили с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies; США) и прибора для капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies; США). Значение параметра RIN (RNA integrity number) для всех образцов было выше 9.0.

Приготовление библиотек и секвенирование

Библиотеки для секвенирования мРНК получали из образцов тотальной РНК с использованием набора Illumina Stranded mRNA Library Prep Kit Illumina (Illumina; США). Каждый образец был секвенирован на Illumina NextSeq 550 для получения 75 нуклеотидных считываний на одном конце.

Библиотеки для секвенирования микроРНК были приготовлены из образцов тотальной РНК с использованием набора NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit для Illumina. Каждый образец был секвенирован на Illumina NextSeq 550 для получения 50 однонаправленных считываний нуклеотидов.

Секвенирование мРНК и микроРНК проводили для трех биологических повторов, для каждого из которых было поставлено четыре технических повтора.

Обработка результатов секвенирования

Качество файлов FASTQ оценивали с помощью FastQC v0.11.9 (Babraham Bioinformatics; UK). Один образец из обработанных CoCl_2 репликатов не прошел контроль качества при секвенировании микроРНК. Адаптеры были обрезаны с помощью Cutadapt v2.10 [11]. Полученные последовательности фрагментов мРНК картировали на геном человека (GENCODE GRCh38.p13) с помощью STAR v2.7.5b [12]. Матрицу экспрессии микроРНК получили с помощью пакета miRDeep2 v2.0.1.2 [13].

Глубины библиотек секвенирования были нормализованы с помощью алгоритма Trimmed Mean of M-values (TMM), доступного в пакете edgeR v3.30.3 [14] с фильтрацией фонового шума по умолчанию. Тот же пакет использовали для генерации нормированных матриц экспрессии мРНК и микроРНК в единицах Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (RPKM) и Reads Per Million mapped reads (RPM) соответственно. Полученные значения логарифмировали по основанию 2. Для дальнейшей обработки использовали только высокоэкспрессированные транскрипты, отсекая нижние 5% генов и 50% микроРНК в соответствии с их средними значениями RPKM / RPM.

Оценка дифференциальной экспрессии и перепредставленных сигнальных путей

Анализ дифференциальной экспрессии проводили с использованием DESeq2 v1.28.1 [15], частоту ложных обнаружений (FDR) рассчитывали по методу Бенджамини–Хохберга. Статистически значимыми считали различия с FDR ниже порогового значения 0,05. Анализ перепредставленных сигнальных путей проводили с помощью онлайн-сервиса DAVID v6.8 [16].

Предсказание мишеней микроРНК

На первом этапе для предсказания мишеней микроРНК был получен список взаимодействий микроРНК–ген из TargetScan v7.2 [17]. Затем из когорты The Cancer Genome

Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) выбирали пары микроРНК–ген с отрицательной корреляцией экспрессии [18]. Исходные матрицы экспрессии микроРНК/мРНК для опухолевых образцов были получены с портала GDC Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) и преобразованы в формат RPKM/RPM таблиц с помощью вышеописанной процедуры. Далее рассчитывали корреляцию Спирмена для каждой микроРНК и предсказанного гена-мишени. Пороговые значения 0,05 и –0,1 были установлены на значения FDR и корреляции соответственно.

Построение регуляторной сети взаимодействий факторов транскрипции и микроРНК

Информация о регуляторных взаимодействиях факторов транскрипции и микроРНК была взята из курируемой базы данных TransmiR v2.0 [19]. Полученную сеть взаимодействия строили и визуализировали в редакторе yED Graph Editor (yWorks GmbH; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние хлорида кобальта (II) на экспрессию генов в клетках линии HT-29

Для химического индуцирования гипоксии клетки линии HT-29 обрабатывали хлоридом кобальта (II) в течение 24 ч. Анализ секвенирования РНК, выделенной из контрольных клеток HT-29 и обработанных хлоридом кобальта, показал статистически значимое изменение экспрессии 2511 генов, кодирующих белки, в 2 и более раза в ответ на гипоксию. Поиск перепредставленных метаболических путей выявил 25 генов, связанных с переключением аэробного метаболизма на анаэробный гликолиз (KEGG pathway hsa00010 «Glycolysis/Gluconeogenesis», $FDR = 2,04 \times 10^{-4}$; рис. 1А), а также продемонстрировал активацию сигнального пути HIF-1 (KEGG pathway hsa04066 «HIF-1 signaling pathway», $FDR = 4,45 \times 10^{-3}$), задействуя который хлорид кобальта имитирует гипоксию (рис. 1Б). Помимо пути HIF-1, активированными были и несколько других

сигнальных каскадов, участвующих в ответе на гипоксию, включая NF-κB [20] и AMPK [21] (приложение 1).

Наиболее перепредставленная категория соответствовала генам, кодирующим белки протеасомных комплексов (KEGG pathway hsa03050 «Proteasome», $FDR = 2,02 \times 10^{-16}$). В частности, 33 гена были значительно активированы в ответ на гипоксию, включая 6 из 6 АТФаз, 11 из 12 субъединиц протеасомы 26S, не обладающих АТФ-азной активностью, 7 из 8 α- субъединиц и 7 из 11 β-субъединиц протеасомы 20S, а также белок созревания протеасомы *POMP* и активаторная субъединица протеасомы *PSME4* (приложение 2). Было отмечено увеличение экспрессии генов *UBB*, *UBC*, *UBA52* и *RPS27A* (в 3,1, 8,7, 2,0 и 1,6 раза соответственно), кодирующих убиквитин, активность которого необходима для протеасомзависимой деградации белков.

Детектировалось также изменение экспрессии генов, которые кодируют белки, участвующие в фокальной адгезии: интегрины и ламинины. Так, уровни экспрессии ламининовых субъединиц α3, β3, γ1 и γ2 были увеличены в 5,5, 4,6, 3,1 и 4,5 раза. Три из них (α3, β3, γ2) могут формировать гетеротример и, таким образом, образовывать ламинин 332, известный также как ламинин-5 [22]. Направление изменения экспрессии субъединиц интегринов различалось: для субъединиц αE, αV и β1 обнаружено увеличение в 1,8, 2,2, 1,8 раза, в то время как для субъединиц α1, α2, α3 и β8 снижение уровня экспрессии произошло в 2,3, 2,1, 1,7 и 2,7 раза.

Влияние гипоксии на экспрессию микроРНК и их генов-мишеней

Статистически значимое изменение экспрессии в ответ на обработку клеток хлоридом кобальта было выявлено для 16 микроРНК (табл. 1). Среди них была обнаружена hsa-miR-210-3p, единственная микроРНК, увеличение экспрессии которой показано в ответ на гипоксию почти во всех существующих исследованиях [23]. При этом уровень нескольких подтвержденных мРНК-мишеней hsa-miR-210-3p, вовлеченных в митохондриальный метаболизм и индукцию апоптоза, снижался в ответ на гипоксию: *GPD1L* в 2,3 раза, *CASP8AP2* в 1,7 раза, а *AIFM3* — в 8 раз.

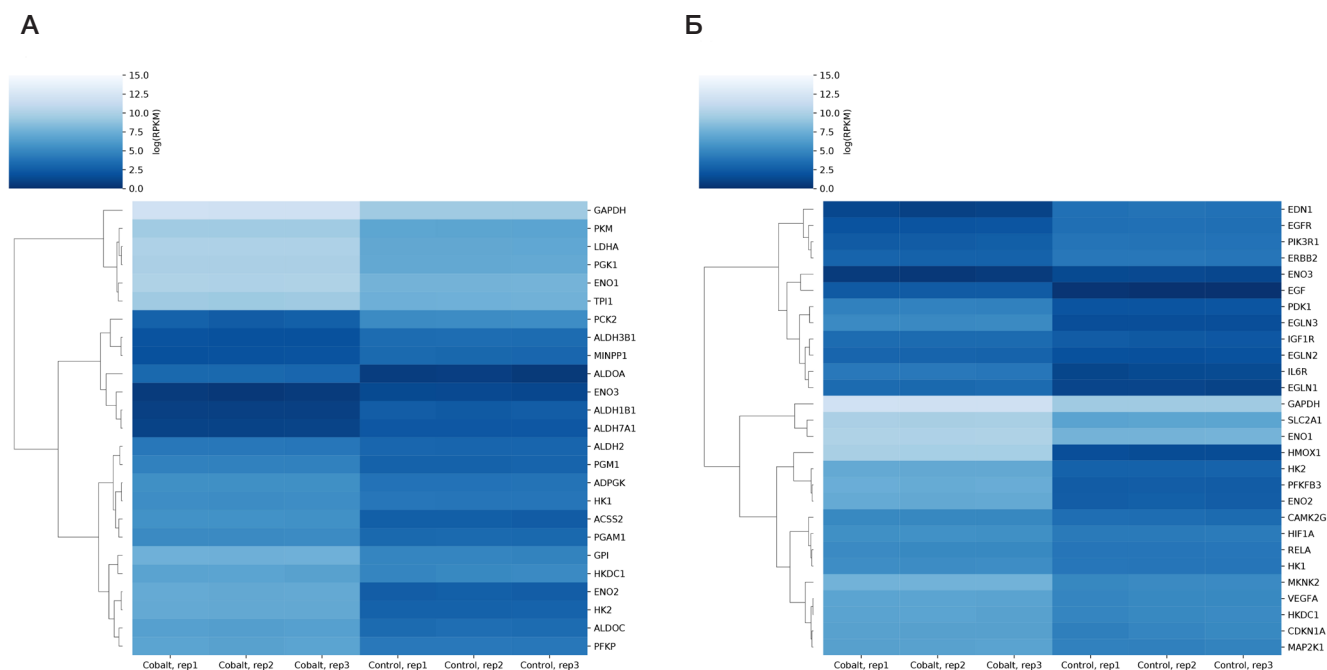


Рис. 1. Дифференциальная экспрессия генов, ассоциированных с гипоксией. А. Гликолиз/глюконеогенез. Б. Сигнальный путь HIF-1

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные микроРНК

МикроРНК	Средний уровень экспрессии в контроле (RPM)	Изменение экспрессии, разы*	FDR
hsa-miR-210-3p	372,38	2,40	$4,01 \times 10^{-20}$
hsa-miR-4521	452,54	-2,48	$2,31 \times 10^{-18}$
hsa-miR-615-3p	739,12	-1,90	$5,30 \times 10^{-10}$
hsa-miR-22-3p	1032,99	1,65	$5,21 \times 10^{-6}$
hsa-miR-425-5p	751,22	-1,44	$8,52 \times 10^{-4}$
hsa-let-7a-3p	631,34	-1,44	$2,87 \times 10^{-3}$
hsa-miR-32-5p	594,48	-1,43	$3,18 \times 10^{-3}$
hsa-miR-215-5p	2604,64	1,49	$6,61 \times 10^{-3}$
hsa-miR-224-5p	4385,37	1,41	0,0123
hsa-miR-182-5p	3935,22	1,49	0,0144
hsa-miR-1260b	550,76	-1,35	0,0187
hsa-miR-1260a	531,53	-1,34	0,0241
hsa-miR-27a-5p	158,10	1,51	0,0317
hsa-miR-30b-5p	1509,37	1,31	0,0317
hsa-miR-10a-3p	2102,20	-1,29	0,0417
hsa-miR-18a-5p	225,40	-1,39	0,0444

Примечание: * — положительные и отрицательные значения указывают на увеличение и снижение уровня микроРНК в клетках в ответ на гипоксию соответственно.

Чтобы оценить общие функциональные эффекты изменения представленности микроРНК в клетке в ответ на гипоксию, был проведен следующий анализ. С помощью ресурса TargetScan был создан список потенциальных мишеней микроРНК. Поскольку некоторые взаимодействия микроРНК и мРНК-мишеней ингибируют трансляцию, не влияя на уровень экспрессии мРНК, далее осуществляли поиск пар микроРНК-мРНК-мишень, демонстрирующих значимую отрицательную корреляцию при анализе образцов 441 пациента с аденокарциномой толстой кишки, полученных из базы данных TCGA-COAD (приложение 3). Затем полученный список пересекли со списком генов, экспрессия которых достоверно изменялась не менее чем в два раза в направлении, противоположном изменению соответствующей микроРНК. В результате были получены шесть микроРНК со статистически значимым числом deregulированных генов-мишеней (гипергеометрический тест; $p < 0,05$): hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-425-5p (приложение 4).

Построение сети регуляторных взаимодействий факторов транскрипции и микроРНК

Чтобы лучше понять механизмы, лежащие в основе aberrantной экспрессии микроРНК, была проанализирована возможность регуляции микроРНК факторами транскрипции (ТФ). В частности, рассмотрели ТФ, уровни представленности мРНК которых достоверно изменились в два или более раза в ответ на гипоксию, и провели поиск микроРНК, которые они регулируют, используя базу данных регуляторных взаимодействий ТФ-микроРНК TransmiR. В результате были идентифицированы 30 взаимодействий ТФ-микроРНК между 15 ТФ и 11 микроРНК. Мы также рассмотрели реципрокное miRNA-индуцированное молчание ТФ, чтобы построить полную регуляторную сеть на этих узлах (рис. 2). Как видно, четыре ТФ, кодируемые генами *EGR1*, *HIF1A*, *MYC* и *RELA*, одновременно регулируют несколько микроРНК, а большинство микроРНК регулируются ансамблями ТФ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью техники интегративного секвенирования мРНК и микроРНК проведена оценка изменения транскриптного ландшафта клеток HT-29 в ответ на гипоксию, индуцированную хлоридом кобальта (II). Помимо активации канонического сигнального пути HIF-1, было показано изменение экспрессии интегринов и ламининов, которые играют важнейшую роль в клеточной адгезии и взаимодействиях с внеклеточным матриксом. Последнее имеет особое значение, поскольку недавно полученные данные указывают на тесную связь между микроокружением, формируемым гипоксией, и метастатическим прогрессированием опухолей, включая аденокарциному толстой кишки [24]. Один из возможных механизмов метастатического распространения опухолей связан с ламинином 332. Взаимодействуя с различными рецепторами на поверхности клетки (включая интегрины $\alpha 6 \beta 4$ и $\alpha 3 \beta 1$, рецептор эпидермального фактора роста и синдекан 1), а также некоторыми другими компонентами базальной мембраны, ламинин 332 регулирует процесс онкогенеза, способствует инвазии и выживанию опухолевых клеток [25]. Повышенная экспрессия $\gamma 1$ -цепи ламининов (кодируемая геном *LAMC1*) также может играть роль в прогрессировании опухолевых заболеваний, как это было показано на карциноме матки [26].

Анализ профиля малых некодирующих РНК выявил несколько дифференциально экспрессированных микроРНК в ответ на гипоксию. Для некоторых из этих микроРНК ранее уже сообщалось об изменении их экспрессии при гипоксии, включая hsa-miR-210-3p [23], hsa-miR-27a-5p [27], hsa-miR-182-5p [28]. Для четырех микроРНК (hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-425-5p, hsa-miR-1260a и hsa-miR-1260b) информации об их связи с ответом клетки на гипоксию обнаружено не было. Это можно объяснить как клеточной специфичностью ответа, так и поточными эффектами действия хлорида кобальта.

Особое внимание следует обратить на микроРНК, которые демонстрируют дифференциальные паттерны экспрессии, специфичные для конкретной цепи микроРНК

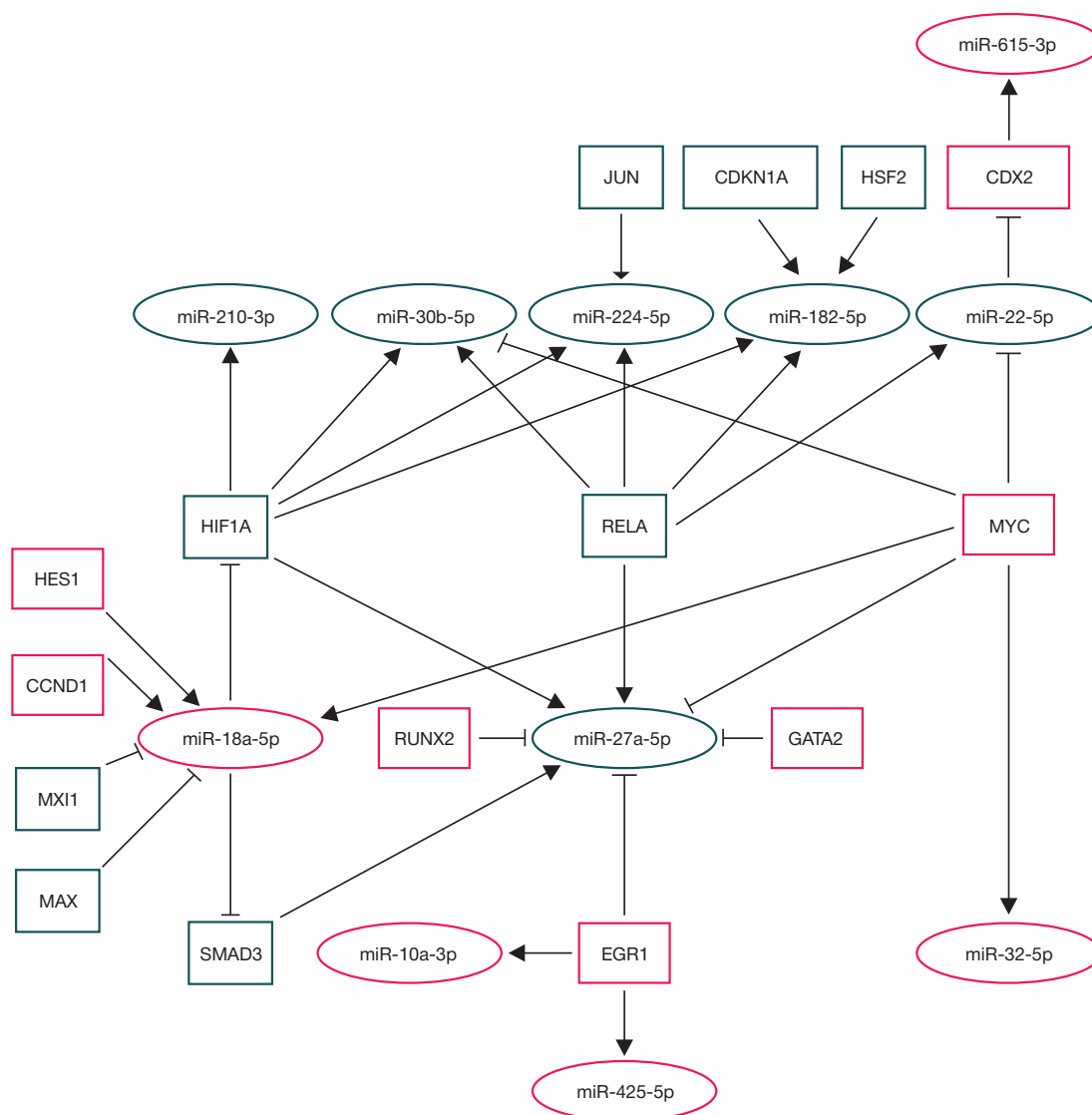


Рис. 2. Регуляторная сеть взаимодействий факторов транскрипции (ТФ) и микроРНК, индуцированная гипоксией. Прямоугольниками обозначен ТФ, эллипсами — микроРНК. Увеличение или снижение экспрессии показано зеленым и красным цветом соответственно. Стрелки обозначают активацию экспрессии, T-образные линии — подавление

(«arm-specific» дифференциальные паттерны экспрессии), и для которых была отмечена регуляция только пассажирских цепей hsa-let-7a, hsa-miR-10a и hsa-miR-27a, в то время как экспрессия их направляющих цепей не изменялась (табл. 2). Недавно мы сообщили о подобном наблюдении для miR-21-3p (пассажирская цепь) в легких мыши, которая демонстрировала восьмикратное увеличение экспрессии при заражении SARS-CoV, в то время как направляющая цепь этой же микроРНК увеличивалась только в три раза [29].

Одной из наиболее перспективных теорий для объяснения данного феномена является регуляция цепей микроРНК РНК-связывающими белками [30].

Анализ регуляторных взаимодействий ТФ и микроРНК показал, что HIF-1, p53, c-Myc и EGR1 (кодируемые генами HIF1A, RELA, MYC и EGR1) являются ключевыми факторами, регулирующими транскрипцию дифференциально экспрессированных микроРНК (см. рис. 2). Три из рассмотренных микроРНК продемонстрировали

Таблица 2. МикроРНК, демонстрирующие дифференциальные паттерны экспрессии, специфичные для конкретной цепи микроРНК

МикроРНК	Средний уровень экспрессии в контроле (RPM)	Изменение экспрессии, разы*	FDR
hsa-let-7a-5p	21537,87	1,07	0,899
hsa-let-7a-3p	631,34	-1,44	$2,87 \times 10^{-3}$
hsa-miR-10a-5p	100119,91	1,09	0,872
hsa-miR-10a-3p	2102,20	-1,29	0,0417
hsa-miR-27a-5p	158,10	1,51	0,0317
hsa-miR-27a-3p	6321,04	1,04	0,929

Примечание: * — положительные и отрицательные значения указывают на увеличение и снижение уровня микроРНК в клетках в ответ на гипоксию соответственно.

взаимообратную активность, подавляя некоторые из ТФ. В частности, HIF1A является подтвержденной мишенью hsa-miR-18a-5p, которая подавляется множеством ТФ.

ВЫВОДЫ

На основании проведенного интегративного секвенирования микроРНК/мРНК обнаружены значительные изменения

транскриптома и профиля микроРНК в клетках линии HT-29 в условиях гипоксии, индуцированной CoCl_2 . Показано, что дифференциальная экспрессия нескольких из микроРНК может быть причиной значительного изменения экспрессии их мРНК-мишеней. Анализ регуляторных взаимодействий между факторами транскрипции и микроРНК выявил возможные механизмы, лежащие в основе наблюдаемого ответа на гипоксию.

Литература

1. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014; 76: 39–56.
2. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015; 83.
3. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 2019; 39 (4): 556–70.
4. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* Elsevier; 2009; 7 (4): 147–54.
5. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, et al. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 2009; 7 (11).
6. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci.* 2015; 2: 11.
7. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol.* 2009; 174 (4): 1131–8.
8. Shkurnikov M, Nikulin S, Nersisyan S, Poloznikov A, Zaidi S, Baranova A, et al. LAMA4-Regulating miR-4274 and Its Host Gene SORCS2 Play a Role in IGFBP6-Dependent Effects on Phenotype of Basal-Like Breast Cancer. *Front Mol Biosci.* 2019; 6.
9. Lacedonia D, Scioscia G, Palladino GP, Gallo C, Carpagnano GE, Sabato R, et al. MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget.* 2018; 9 (80): 35114–22.
10. Shen G, Li X, Jia YF, Piazza GA, Xi Y. Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34 (3): 336–41.
11. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011; 17 (1): 10.
12. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013; 29 (1): 15–21.
13. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic. 2012; 40 (1): 37–52.
14. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009; 26 (1): 139–40.
15. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* BioMed Central. 2014; 15 (12): 550.
16. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group. 2009; 4 (1): 44–57.
17. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015; 4 (AUGUST2015).
18. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487 (7407): 330–7.
19. Tong Z, Cui Q, Wang J, Zhou Y. TransmiR v2.0: An updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D253–D258.
20. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. Mechanism of hypoxia-induced NF-κB. *Mol Cell Biol.* 2010; 30 (20): 4901–21.
21. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, et al. Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (17): 3531–45.
22. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012; 28 (1): 523–53.
23. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazzi M, Focaccia E, Blalock W, et al. Mirna-210: A current overview. *Anticancer Res.* 2017; 37 (12): 6511–21.
24. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Sci (80-).* 2016; 352 (6282): 175–80.
25. Мальцева Д. В., Родин С. А. Ламинины и метастазирование опухолей. *Мол. Биол.* 2018; 52 (3): 350–71.
26. Kashima H, Wu RC, Wang Y, Sinno AK, Miyamoto T, Shiozawa T, et al. Laminin C1 expression by uterine carcinoma cells is associated with tumor progression. *Gynecol Oncol.* Elsevier Inc.; 2015; 139 (2): 338–44.
27. Zhang J, Qiu W, Ma J, Wang Y, Hu Z, Long K, et al. miR-27a-5p Attenuates Hypoxia-induced Rat Cardiomyocyte Injury by Inhibiting Atg7. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (10).
28. Zhang Y, Fang J, Ma H. Inhibition of miR-182-5p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting CIAPIN1. *Biochem Cell Biol.* 2018; 96 (5): 646–54.
29. Nersisyan S, Engibaryan N, Gorbons A, Kirdey K, Makhonin A, Tonevitsky A. Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *PeerJ.* 2020; 8: e9994.
30. Van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11 (9): 644–56.

References

1. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014; 76: 39–56.
2. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015; 83.
3. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 2019; 39 (4): 556–70.
4. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* Elsevier; 2009; 7 (4): 147–54.
5. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, et al. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 2009; 7 (11).
6. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Cho WC, Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. *Front Mol Biosci.* 2015; 2: 11.

7. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol.* 2009; 174 (4): 1131–8.
8. Shkurnikov M, Nikulin S, Nersisyan S, Poloznikov A, Zaidi S, Baranova A, et al. LAMA4-Regulating miR-4274 and Its Host Gene SORCS2 Play a Role in IGFBP6-Dependent Effects on Phenotype of Basal-Like Breast Cancer. *Front Mol Biosci.* 2019; 6.
9. Lacedonia D, Scioscia G, Palladino GP, Gallo C, Carpagnano GE, Sabato R, et al. MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget.* 2018; 9 (80): 35114–22.
10. Shen G, Li X, Jia YF, Piazza GA, Xi Y. Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34 (3): 336–41.
11. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011; 17 (1): 10.
12. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013; 29 (1): 15–21.
13. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res. Oxford Academic.* 2012; 40 (1): 37–52.
14. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009; 26 (1): 139–40.
15. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol. BioMed Central.* 2014; 15 (12): 550.
16. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc. Nature Publishing Group.* 2009; 4 (1): 44–57.
17. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015; 4 (AUGUST2015).
18. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487 (7407): 330–7.
19. Tong Z, Cui Q, Wang J, Zhou Y. TransmiR v2.0: An updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D253–D258.
20. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. Mechanism of hypoxia-induced NF- κ B. *Mol Cell Biol.* 2010; 30 (20): 4901–21.
21. Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, et al. Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (17): 3531–45.
22. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012; 28 (1): 523–53.
23. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazza M, Focaccia E, Blalock W, et al. Mirna-210: A current overview. *Anticancer Res.* 2017; 37 (12): 6511–21.
24. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Sci (80-).* 2016; 352 (6282): 175–80.
25. Maltseva D V., Rodin SA. Laminins in metastatic cancer. *Mol Biol. Springer;* 2018; 52 (3): 350–71.
26. Kashima H, Wu RC, Wang Y, Sinno AK, Miyamoto T, Shiozawa T, et al. Laminin C1 expression by uterine carcinoma cells is associated with tumor progression. *Gynecol Oncol. Elsevier Inc.;* 2015; 139 (2): 338–44.
27. Zhang J, Qiu W, Ma J, Wang Y, Hu Z, Long K, et al. miR-27a-5p Attenuates Hypoxia-induced Rat Cardiomyocyte Injury by Inhibiting Atg7. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (10).
28. Zhang Y, Fang J, Ma H. Inhibition of miR-182-5p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting CIAPIN1. *Biochem Cell Biol.* 2018; 96 (5): 646–54.
29. Nersisyan S, Engibaryan N, Gorbonos A, Kirdey K, Makhonin A, Tonevitsky A. Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *PeerJ.* 2020; 8: e9994.
30. Van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11 (9): 644–56.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ P53 НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА P53 В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЛИНИИ НАСАТ

А. Л. Русанов¹✉, П. М. Кожин^{1,2}, Д. Д. Ромашин¹, М. Н. Карагяур¹, Н. Г. Лузгина¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ИБМХ), Москва, Россия

² ООО НПО «Перспектива», Новосибирск, Россия

Клетки линии HaCaT являются распространенной моделью для исследования нормальных кератиноцитов человека. Однако для клеток этой линии характерны мутации в гене *TP53*, что существенно сказывается на функциях кодируемого белка. Особенности данного регуляторного контура необходимо учитывать при использовании клеток HaCaT в качестве объекта исследований физиологии и патологии кожи человека *in vitro*. Целью исследования было изучить особенности реализации программы дифференцировки в клетках линии HaCaT в условиях модуляции активности белка p53. Снижения уровня экспрессии p53 добивались нокдауном гена *TP53* с помощью shRNA (в 2,2 раза, $p < 0,05$), и, напротив, увеличения концентрации активных форм данного белка в клетках достигали за счет воздействия на клетки Nutlin-3a — ингибитора MDM2, основного негативного регулятора p53. Установлено, что регуляция как минимум трех маркеров дифференцировки, *CASP14*, *IVL* (увеличение экспрессии в 3,9 и 3,7 раза соответственно при нокдауне p53, $p < 0,05$) и *TGM1* (уменьшение экспрессии вдвое при нокдауне *TP53* и увеличение в 1,7 раза при воздействии на клетки Nutlin-3a, $p < 0,05$), в клетках HaCaT зависит от активности p53. При этом в отношении экспрессии *TGM1* и p53 отмечена прямая зависимость, которая, возможно, реализуется опосредованно, через изменение экспрессии $\Delta Np63$. В то же время модуляция активности p53 не приводит к значительным изменениям экспрессии цитокератинов.

Ключевые слова: HaCaT, дифференцировка кератиноцитов, p53, p63, $\Delta Np63$, TAp63, Nutlin-3a, shRNA, нокдаун

Финансирование: работа, включающая нокдаун гена p53, ИФА и ПЦР-исследования, выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы; эксперименты с применением Nutlin-3a были проведены на базе ООО НПО «Перспектива» при поддержке РФФИ, научно-исследовательский проект 18-44-540031/19.

Вклад авторов: Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — концепция исследования; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — дизайн исследования и анализ литературы; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин, М. Н. Карагяур — планирование и проведение исследования; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — анализ и интерпретация данных; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин — подготовка текста статьи; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, М. Н. Карагяур, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — редактирование рукописи, подготовка финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ Для корреспонденции: Александр Леонидович Русанов
ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121; alexander.l.rusanov@gmail.com

Статья получена: 27.11.2020 Статья принята к печати: 14.12.2020 Опубликовано онлайн: 25.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.082

IMPACT OF P53 MODULATION ON INTERACTIONS BETWEEN P53 FAMILY MEMBERS DURING HACAT KERATINOCYTES DIFFERENTIATION

Rusanov AL¹ ✉, Kozhin PM^{1,2}, Romashin DD¹, Karagyaur MN¹, Luzgina NG¹

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia

² RMA "Perspektiva", Novosibirsk, Russia

HaCaT cell line is a widely used model for studying normal human keratinocytes. However, mutations of TP53 gene are typical for this cell line, which have a substantial impact on functions of the encoded protein. The features of this regulatory circuit should be considered when using HaCaT cells for assessment of human skin physiology and pathology *in vitro*. The study was aimed to assess the features of differentiation realization in HaCaT cells with modulated activity of p53 protein. The expression of p53 was reduced by knockdown of *TP53* gene by shRNA (by 2.2 times, $p < 0.05$), and the elevated concentration of the p53 active forms was achieved via exposure of cells to Nutlin-3a, the MDM2 inhibitor and the major negative regulator of p53. It has been found that regulation of at least three differentiation markers, *CASP14*, *IVL* (expression increase by 3.9 and 3.7 times respectively in the p53-knockdown cells, $p < 0.05$) and *TGM1* (twofold expression decrease in the p53-knockdown cells, and 1.7-fold expression increase under exposure to Nutlin-3a, $p < 0.05$) in HaCaT cells is p53-mediated. The positive correlation has been revealed for expression of *TGM1* and p53 that might be realized indirectly via $\Delta Np63$ expression alteration. At the same time, modulation of p53 does not result in significant alterations in expression of cytokeratins.

Keywords: HaCaT, keratinocytes differentiation, p53, p63, $\Delta Np63$, TAp63, Nutlin-3a, shRNA, knockdown

Funding: the study involving p53 gene knockdown, ELISA and PCR tests was performed as part of the Fundamental Scientific Research Programs of the State Academies of Sciences for 2013–2020; experiments with Nutlin-3a were carried out by RMA "Perspektiva" and supported by RFBR, project № 18-44-540031/19.

Author contribution: Luzgina NG, Rusanov AL — study concept; Romashin DD, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL — study design and literature analysis; Romashin DD, Kozhin PM, Karagyaur MN — study planning and execution; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — data analysis and interpretation; Kozhin PM, Romashin DD — manuscript writing; Kozhin PM, Romashin DD, Karagyaur MN, Luzgina NG, Rusanov AL — manuscript editing, preparation of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ Correspondence should be addressed: Alexander L. Rusanov
Pogodinskaya, 10, str. 8, Moscow, 119121; alexander.l.rusanov@gmail.com

Received: 27.11.2020 Accepted: 14.12.2020 Published online: 25.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.082

Процесс терминальной дифференцировки кератиноцитов является одним из возможных путей программируемой клеточной гибели. Он обеспечивает нормальную стратификацию клеток эпидермиса, необходимую для формирования полноценного эпидермального барьера. Нарушения процесса терминальной дифференцировки по той или иной причине лежат в основе формирования клинических проявлений многих хронических заболеваний кожи. Роль белков семейства p53 в регуляции процесса дифференцировки кератиноцитов активно исследуют в последние годы [1–4].

Известно, что белок p53 накапливается и опосредует апоптоз в эпидермисе в ответ на солнечный ожог [5] и ряд других цитотоксических воздействий. Наряду с этим, активные формы белка в большей степени обнаруживаются в пролиферирующих кератиноцитах, но не дифференцированных клетках [6]. Есть мнение, что p53 может играть двойную роль в выживании эпидермиса, поддерживая «здоровые» пролиферативные клетки и вызывая гибель сильно поврежденных [7].

Группа исследователей установила, что p53 стимулирует пролиферацию и замедляет дифференцировку в нормальных кератиноцитах человека путем инактивации сигналинга, опосредованного протоонкогеном MYC [7]. При этом в клетках с нокдауном p53 наблюдали существенное увеличение экспрессии инволюкрина, кератинов KRT1 и KRT10, филагтрина — маркеров клеточной дифференцировки. В целом, для клеток с инактивированным p53 была характерна более высокая скорость стратификации и открепления [7].

Однако специфическая роль белков семейства p53 и их взаимодействие на разных этапах дифференцировки кератиноцитов человека в норме и при патологиях охарактеризованы недостаточно подробно.

В еще меньшей степени исследована роль белков данного семейства в регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT — спонтанно immortalized неканцерогенных кератиноцитов человека [8]. Данная клеточная линия получила широкое распространение в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека [9, 10]. Однако в кератиноцитах линии HaCaT нарушены программа стратификации и экспрессия маркеров дифференцировки [11].

Известно, что в геноме кератиноцитов HaCaT присутствуют две аллели гена *TP53* (H179Y и R282Q), которые содержат две gain-of-function (GOV) мутации, приобретенные в результате спонтанной immortalization (mutp53) [12]. Mutp53 в клетках линии HaCaT обладает выраженной активностью в отношении увеличения скорости пролиферации и роста клеток и имеет более 7000 сайтов связывания с ДНК. При этом связанные с запуском апоптоза функции белка сохранены [4].

Кроме того, в отличие от нормальных кератиноцитов, клетки линии HaCaT преимущественно экспрессируют ΔNα изоформу p63, а изоформа TA практически не детектируется [13].

Понимание особенностей физиологии клеток HaCaT и лежащих в их основе молекулярных механизмов необходимо для оценки ограничений при использовании таких клеток в качестве модельных. Кроме того, изучение особенностей взаимодействия белков семейства p53 в условиях присутствия в геноме клеток mutp53 позволит получить новые данные, актуальные для исследования канцерогенеза [14, 15].

Целью настоящего исследования было изучить регуляторную роль белков семейства p53 в процессах

пролиферации и дифференцировки клеток линии HaCaT. В ходе исследования осуществляли модуляцию белка p53: активацию обеспечивали путем воздействия Nutlin-3a (блокатор MDM2, основного негативного регулятора p53), а для подавления экспрессии p53 применяли anti-TP53 shRNA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и условия культивирования

Клеточная линия HaCaT была приобретена в коллекции клеточных культур German Cancer Research Center (DKFZ, Heidelberg; Германия). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в среде DMEM/F12 (1:1, Gibco; США) с добавлением 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific; США), раствора пенициллина/стрептомицина в концентрации 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Диа-М»; Россия) — полная культуральная среда. Клетки выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см² или в чашках Петри диаметром 60 мм (Corning; США). Среду заменяли на свежую через каждые 48 ч культивирования.

Нокдаун гена *TP53* с помощью shRNA

Для нокдауна гена *TP53* использовали лентивирусный вектор, который кодирует anti-TP53 shRNA. Для сборки лентивирусного вектора клетки линии HEK2937T трансфицировали вектором pLKO-p53-shRNA (Addgene, #25637), используя стандартный протокол для трансфекции с помощью полиэтиленимина (PEI) [16]. Кондиционная среда, содержащая лентивирусные частицы, была собрана спустя 48–72 ч культивирования после трансфекции. Для увеличения эффективности трансдукции в среду с лентивирусными частицами добавляли сульфат протамина (50 мкг/мл). Для трансдукции кератиноциты линии HaCaT выращивали до конfluence 40–50%, после чего среду культивирования заменяли на среду с лентивирусными частицами. Далее клетки центрифугировали при 800g в течение 1,5 ч. По завершении центрифугирования кондиционную среду заменяли на полную культуральную среду. В качестве контрольной линии для селекции с пуромицином использовали клетки дикого типа (WT HaCaT), трансдуцированные вектором ligo-ig2 (Addgene #27341), не содержащим ген устойчивости к пуромицину. После трансдукции клетки обеих линий (контрольной и экспериментальной) культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 суток, после чего заменяли среду на содержащую пуромицин (1 мкг/мл) и культивировали до гибели 100% клеток контрольной линии. За это время также погибали нетрансдуцировавшиеся клетки в экспериментальной группе.

Определение уровня экспрессии генов

Клетки выращивали в 60 мм чашках Петри в полной культуральной среде при 37 °C и 5% CO₂. По достижении 60% конfluence среду культивирования заменяли на содержащую Nutlin-3a (Merck; Германия). Клетки инкубировали в течение 24 ч и использовали для дальнейших экспериментов.

РНК выделяли с помощью набора RNeasy Kit (QIAGEN; США) согласно протоколу производителя. Количество полученной РНК измеряли на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали коммерческий набор MMLV RT

Таблица 1. Используемые праймеры

Ген	Последовательность праймеров
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-TCGACAGTCAGCCGATCTTCTTT-3' Probe R6G-5'-AGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCAT-3'-Q Reverse 5'-ACCAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'
<i>TP53</i>	Forward 5'-CTCACCATCATCAGACTGGAA-3' Probe FAM-5'-TACTGGGACGGAACAGCTTTGAGG-3'-Q Reverse 5'-CCAGGACAGGCACAAACA-3'
<i>ΔNp63</i>	Forward 5'-AGAAGAAAGGACAGCAGCATTGAT-3' Probe FAM-5'-TCCTGAACAGCATGGACCAGCAGA-3'-Q Reverse 5'-GGACGAGGAGCCGTTCTGA-3'
<i>TAp63</i>	Forward 5'-CCAGAGCACACAGACAAATG-3' Probe FAM-5'-ACAGCCTATATGTTCACTTCAAGCCCA-3'-Q Reverse 5'-TGATGGTTCATCCACAAAGTTC-3'
<i>TP63</i>	Forward 5'-CGTACAGGCAACAGCAACAG-3' Probe FAM-5'-CAGCAGCACCAGCACTTACTTCAGA-3'-Q Reverse 5'-CACAGAAGGCAGCTTGTTC-3'
<i>TGM1</i>	Forward 5'-TGCTGGATGCCTGCTTAT-3' Probe FAM-5'-TGGTGAACCTCCCTGGATGACAATGG-3'-Q Reverse 5'-ACCAGACCAGTCCCAATC-3'
<i>IVL</i>	Forward 5'-CCAAAGCCTCTGCCTCAG-3' Probe FAM-5'-AGATGTCCAGCAACACACTGC-3'-Q Reverse 5'-GTATTGACTGGAGGAGGAACAG-3'
<i>KRT14</i>	Forward 5'-CTGAAGAAGAACCACGAGGA-3' Probe FAM-5'-AGGTGGGTGGAGATGTCAATGTGG-3'-Q Reverse 5'-TCTCTGCCATCTTCTCATACTG-3'
<i>KRT10</i>	Forward 5'-AGCATGGCAACTCACATCA-3' Probe FAM-5'-ATTGCTGTAGTCACGAGGCTCCC-3'-Q Reverse 5'-GTCGATCTGAAGCAGGATGT-3'
<i>CASP14</i>	Forward 5'-CCTGTGCGAGGAGAAACAAAGG-3' Probe FAM-5'-AAAGACAGCCACAAACCATCCCA-3'-Q Reverse 5'-TGCAAGGCATCTGTGTATGT-3'

(«Евроген»; Россия) по стандартному протоколу, добавляя в реакцию по 1 мкг РНК. ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили, используя реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Для каждой группы использовали три биологических образца, для каждого гена и каждого образца реакцию проводили в трех повторях. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Используемые праймеры представлены в табл. 1.

Определение метаболической активности

Определение метаболической активности клеток было проведено с помощью МТТ-анализа [17]. Клетки рассаживали в 96-луночный планшет (Corning; США) из расчета $3,0 \times 10^3$ клеток на лунку за 48 ч до воздействия, 6 лунок для каждой концентрации Nutlin-3a. Спустя двое суток культивирования среду заменяли на свежую среду, содержащую Nutlin-3a в концентрациях 0,2–50 мкМ, и инкубировали клетки в течение 24 ч. По завершении культивирования среду заменяли на свежую среду, содержащую МТТ («Диа-М»; Россия) в концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубировали 2 ч, образовавшиеся гранулы формазана растворяли в ДМСО (Helicon; Россия). Затем проводили измерение оптической плотности при длине волны 490 нм. Эксперимент проводили в трех независимых биологических повторях.

Иммуноферментный анализ

Для полуколичественного определения уровня p53 использовали коммерческий набор ab205713 (Abcam; Великобритания) в соответствии с руководством производителя. Клетки рассаживали в 96-луночный

планшет в трех повторях в плотности 1×10^4 клеток на лунку. Интенсивность сигнала измеряли с помощью спектрофотометра iMark (Bio-Rad; США) на длине волны 450 нм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки культивировали на покровных стеклах в 6-луночных планшетах. Клетки фиксировали в 4%-м формалине, пермеабилizовали 0,1% Тритоном X-100, окрашивали первичными антителами к $\Delta Np63$ (#619002, Biolegend; США), TAp63 (#618902, Biolegend; США), KRT5 (ab52635, Abcam; Великобритания), KRT10 (ab9025, Abcam; Великобритания) и вторичными Alexa Fluor 488-конъюгированными (ab150105, Abcam; Великобритания) или Texas Red-конъюгированными (ab6793, Abcam; Великобритания) антителами. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно, используя один и тот же набор реактивов (разведений антител и буферов). Эксперимент проводили в трех независимых биологических повторях.

Полученные препараты последовательно визуализировали с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss; Германия) с использованием одинаковых настроек. Для каждого препарата фотографировали не менее 5 полей зрения. Обработку фотографий проводили в программе CellProfiler 3.1.9 [18]. Анализировали не менее 100 клеток для каждого образца, вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции (интенсивность флуоресценции клетки, поделенная на площадь клетки). Значения средней интенсивности флуоресценции нормировали на значение средней интенсивности флуоресценции в контрольной группе.

Анализ данных

Для анализа использовали данные, полученные от трёх биологических повторов. Результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R [19]. Межгрупповые различия величин анализируемых параметров определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественное сравнение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линии HaCaT с нокдауном *TP53* подтверждали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Трансдукция anti-*TP53* shRNA приводила к значительному (в 2,2 раза, $p < 0,05$), но не полному снижению внутриклеточной концентрации *p53* (ИФА) (рис. 1А).

Метаболическую активность клеток дикого типа и клеток с нокдауном *TP53* в условиях воздействия ингибитора активности MDM2, Nutlin-3a оценивали с помощью МТТ-теста (рис. 1Б). Воздействие Nutlin-3a в течение 24 ч приводило к дозозависимому снижению количества образовавшегося формазана в клетках линии HaCaT дикого типа. Значения IC10 и IC50 составили $0,18 \pm 0,10$ мкМ и $129,11 \pm 167,78$ мкМ соответственно.

Такое же экспериментальное воздействие на клетки с нокдауном *TP53* не влияло на продукцию формазана. Значимые различия в продукции формазана данными клетками в сравнении с клетками дикого типа наблюдали при воздействии Nutlin-3a в концентрации 10 мкМ и выше. В связи с этим для дальнейших экспериментов использовали Nutlin-3a в концентрации 10 мкМ.

Выявленные особенности влияния Nutlin-3a на метаболическую активность клеток с нокдауном *TP53* могут быть связаны со значительным снижением в таких клетках содержания активных форм *p53*. При этом блокирование MDM2-зависимой деградации *p53*, обусловленное Nutlin-3a, по-видимому, не приводит к повышению его концентрации, достаточному для

реализации основных эффектов *p53* (остановка клеточного цикла, апоптоз).

Экспрессия генов ряда белков, отражающая активность процессов дифференцировки кератиноцитов, в интактных клетках дикого типа и клеток с нокдауном *TP53* различалась (рис. 2А). Так, по сравнению с клетками дикого типа в клетках с нокдауном была отмечена более высокая экспрессия генов, кодирующих инволюкрин и каспазу 14, в то же время экспрессия гена *TGM1* была ниже. Значимых различий в уровне экспрессии цитокератинов (ПЦР, флуоресцентная микроскопия) зарегистрировано не было (рис. 2А, Б, В). Кроме того, в клетках с нокдауном была снижена экспрессия генов, кодирующих изоформы *p63*, $\Delta Np63$ и TAr63. Также наблюдалось снижение количества указанных белков в цитоплазме и ядре (микроскопия) (рис. 3А, Б).

Воздействие Nutlin-3a на клетки дикого типа приводило к увеличению активности гена *P21* в два раза, что свидетельствует о накоплении в клетках активных форм *p53*. При этом было зарегистрировано увеличение экспрессии гена *TGM1*, гена, кодирующего синтез изоформы *p63* ($\Delta Np63$), незначительное увеличение экспрессии *IVL*, уровень которого, однако, оставался существенно более низким, чем в клетках с нокдауном. В то же время достоверных изменений уровня *CASP14* и экспрессии цитокератинов 14 и 10 (ПЦР) выявлено не было. Данные по экспрессии цитокератина 10 подтверждены данными микроскопии. При этом было зарегистрировано увеличение в 1,54 раза содержания цитокератина 5 (микроскопия). Интересно, что наряду с увеличением экспрессии $\Delta Np63$, наблюдалось уменьшение количества этого белка как в ядре, так и в цитоплазме клеток. При этом количество TAr63 в ядре и цитоплазме клеток увеличивалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование направлено на изучение особенностей влияния белков семейства *p53* на процесс дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT. При этом было изучено изменение экспрессии маркеров дифференцировки в зависимости от активности *p53*:

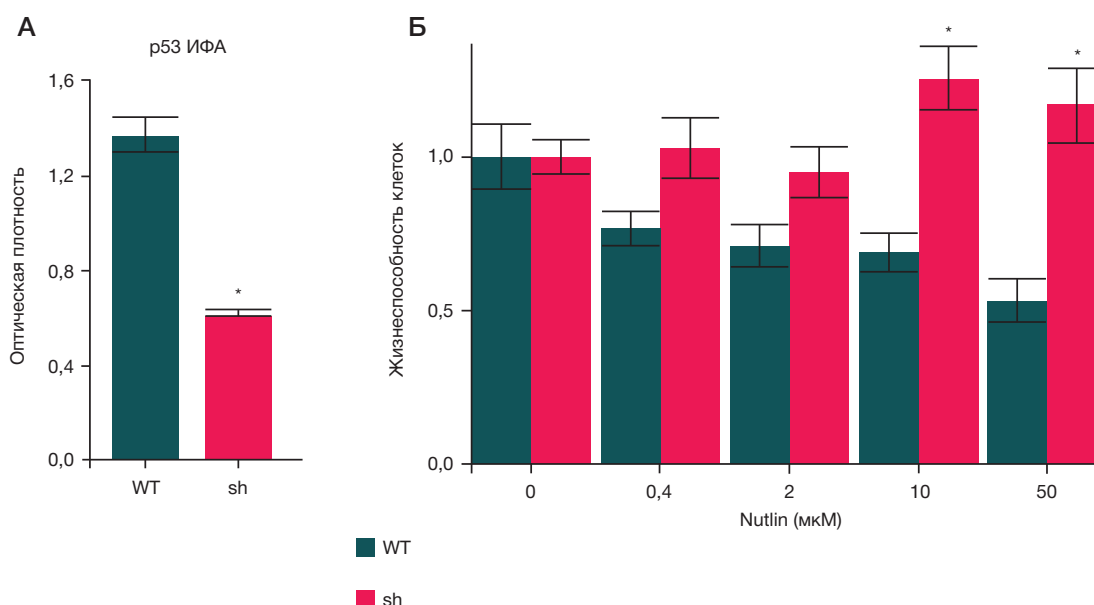


Рис. 1. Эффекты модуляции *TP53* посредством нокдауна и воздействия Nutlin-3a. **А.** Полуколичественное определение концентрации *p53* в клетках дикого типа (WT) и в клетках с нокдауном *TP53* (sh). **Б.** Метаболическая активность клеток (МТТ-тест) после воздействия Nutlin-3a. * — значимые различия между группами WT и sh ($p < 0,05$)

снижения экспрессии p53 достигали за счет нокдауна *TP53*, а увеличения активности белка — за счет добавления в культуральную среду Nutlin-3a.

В качестве маркеров дифференцировки кератиноцитов были выбраны белки, экспрессия которых увеличивается в нормальных кератиноцитах по мере продвижения клеток эпидермиса от базального слоя к роговому (IVL, TGM1 и CASP14). Так, инволюктин (IVL) является представителем структурных белков кератиноцитов, обеспечивающих механическую прочность эпидермального барьера. Кроме того, комплексы инволюктина с липидами (омега-гидроксицерамидами) участвуют в формировании водонепроницаемой нерастворимой оболочки клеток рогового слоя эпидермиса [20]. Инволюктин является одним из основных субстратов трансглутаминазы 1-го типа (TGM1), которая катализирует образование поперечных связей между остатками лизина в структурных белках эпидермиса [21]. TGM1 имеет критическое значение при формировании эпидермального барьера [21]. Каспаза 14 (CASP14), в отличие от других белков данного семейства, специфически экспрессируется в эпидермисе, практически не участвует в реализации апоптоза, но при этом является регулятором дифференцировки кератиноцитов [22].

Для оценки степени дифференцированности клеток также исследовали экспрессию кератинов — KRT10, KRT5, KRT14 (компоненты белков промежуточных филаментов цитоскелета кератиноцитов). Известно, что высокое содержание KRT1 и KRT10 наиболее характерно

для дифференцирующихся кератиноцитов [23], в отличие от кератинов KRT5 и KRT14, активно экспрессирующихся в клетках базального слоя эпидермиса [24].

В тех же экспериментальных условиях оценивали экспрессию других членов семейства p53, $\Delta Np63$ и TAp63, что позволило оценить ее зависимость от активности p53.

Ранее было проведено исследование влияния снижения экспрессии p53 (в результате нокдауна *TP53*) на экспрессию маркеров дифференцировки нормальных кератиноцитов человека [7]. Таким образом, сопоставление экспериментальных данных с данными литературы, возможно, позволит получить информацию о сходстве и различии влияния белков семейства p53 на процесс дифференцировки в нормальных кератиноцитах и клетках линии HaCaT.

Следует отметить, что в ходе настоящего исследования не было достигнуто полное подавление экспрессии p53 в клетках HaCaT. Это может быть связано с устойчивостью клеток этой линии к действию реагентов для трансдукции/трансфекции (в сравнении с клетками эпителия внутренних органов) [25]. Однако снижение экспрессии p53 было значительным (в 2,2 раза).

Среди исследованных нами маркеров дифференцировки кератиноцитов, в большей степени ассоциированными с изменением экспрессии p53, оказались гены *IVL*, *CASP14* и *TGM1*. Наиболее зависимой от активности p53 оказалась экспрессия гена *TGM1*: величина этого показателя значительно снижалась в клетках с нокдауном *TP53* и возрастала при воздействии Nutlin-3a.

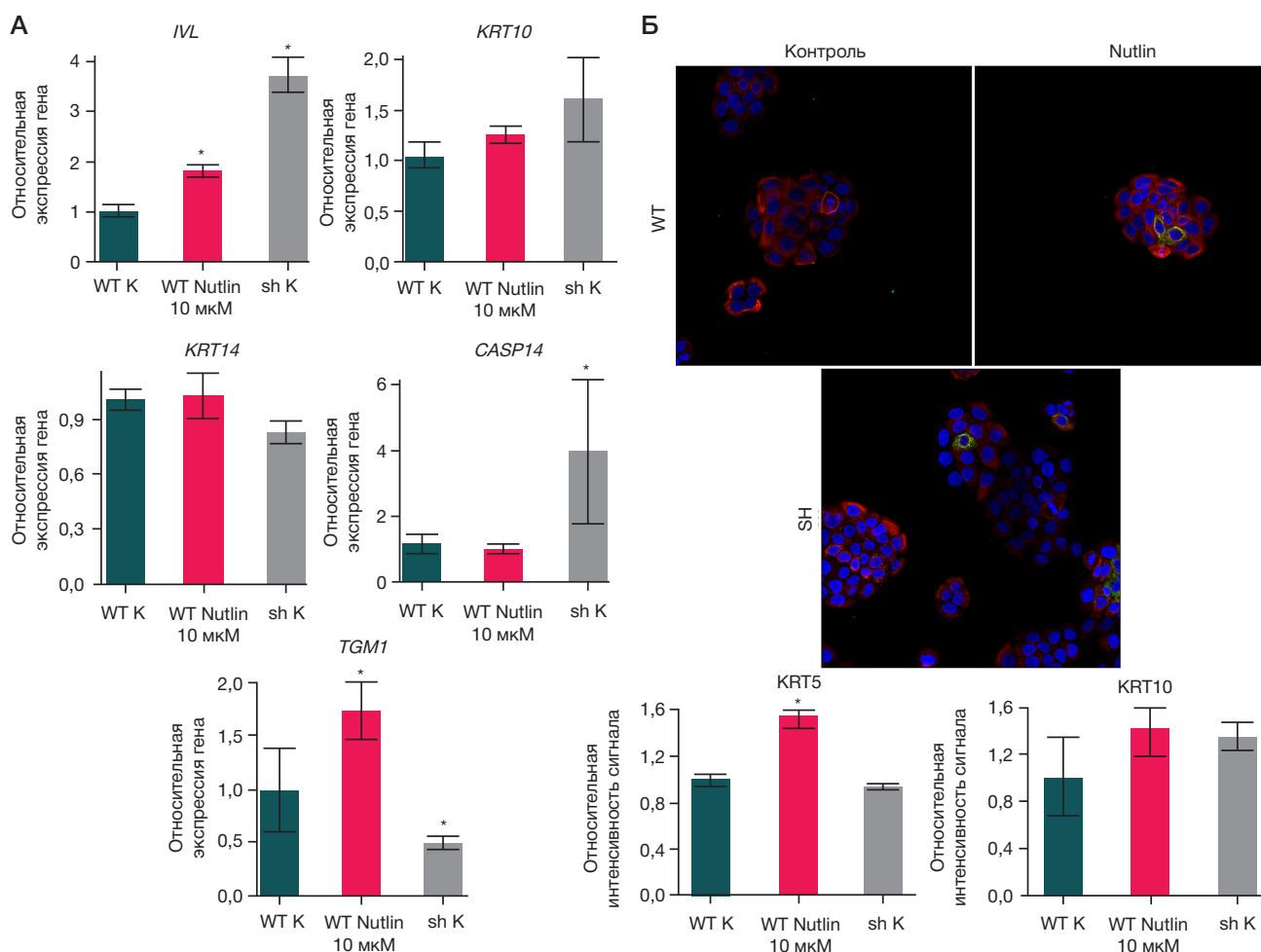


Рис. 2. Экспрессия маркеров дифференцировки в клетках HaCaT. **А.** Экспрессия *IVL*, *KRT10*, *KRT14*, *CASP14*, *TGM1*. **Б.** Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия: KRT5 (красный), KRT10 (зеленый), DAPI (синий, ядра), увеличение $\times 400$. **В.** Обобщенная диаграмма интенсивности относительной флуоресценции в клетках. * — значимые различия между экспериментальными группами (sh, Nutlin-3a) и интактными клетками (WT K), $p < 0,05$

Следует отметить, что уровень экспрессии *TGM1* и инволюкрин, белка, являющегося субстратом для *TGM1*, а также динамика изменения величин указанных параметров в исследованных экспериментальных ситуациях не совпадали. Экспрессия инволюкрин значительно возрастала в клетках с нокдауном *TP53*, но также возрастала, хоть и в меньшей степени, при воздействии Nutlin-3a. Вероятно, несмотря на очевидную функциональную взаимосвязь *TGM1* и инволюкрин, регуляция их экспрессии в клетках HaCaT различается.

В отличие от нормальных кератиноцитов, не реагирующих изменением экспрессии p63 в ответ на нокдаун p53 [7], в нашем исследовании модуляция активности p53 в клетках HaCaT приводила к изменению экспрессии изоформ p63. Ранее о снижении экспрессии TP63 в клетках HaCaT с нокдауном p53 также сообщили [4].

Известно, что изоформы p63, в особенности Δ Np63, являются ингибиторами активности p53 [1]. Нельзя исключить, что высокая базовая экспрессия Δ Np63 в клетках HaCaT направлена на инактивацию эффектов mutp53. В этой связи зарегистрированное нами изменение соотношения p53 и изоформ p63 (Δ Np63, TAp63) в клетках с нокдауном *TP53* по сравнению с интактными

клетками представляется закономерным — в отсутствие белка, функцию которого необходимо ингибировать (p53), наблюдается снижение экспрессии изоформ p63. Отмеченное нами противоречие в динамике экспрессии Δ Np63 при воздействии Nutlin-3a (рост экспрессии по данным исследования методом ПЦР наряду с уменьшением количества белка в цитоплазме и ядре клеток) может представлять собой результат участия белка Δ Np63 в инактивации p53, например, в результате образования гетеродимеров Δ Np63/p53 [26].

В то же время увеличение количества белка TAp63 в клетках без значимого изменения уровня экспрессии кодирующего данный белок гена в той же экспериментальной ситуации может быть связано с ингибированием активности MDM2. Согласно данным литературы [27], а также полученным нами данным, MDM2 может быть негативным регулятором активности не только p53, но и TAp63.

Известно, что по мере продвижения кератиноцитов от базального слоя к выше расположенным слоям активность p53 увеличивается, в том числе из-за постепенного снижения ингибирующего влияния Δ Np63. В результате p53 реализует свои функции, необходимые для завершения процесса кератинизации. В частности, он обеспечивает

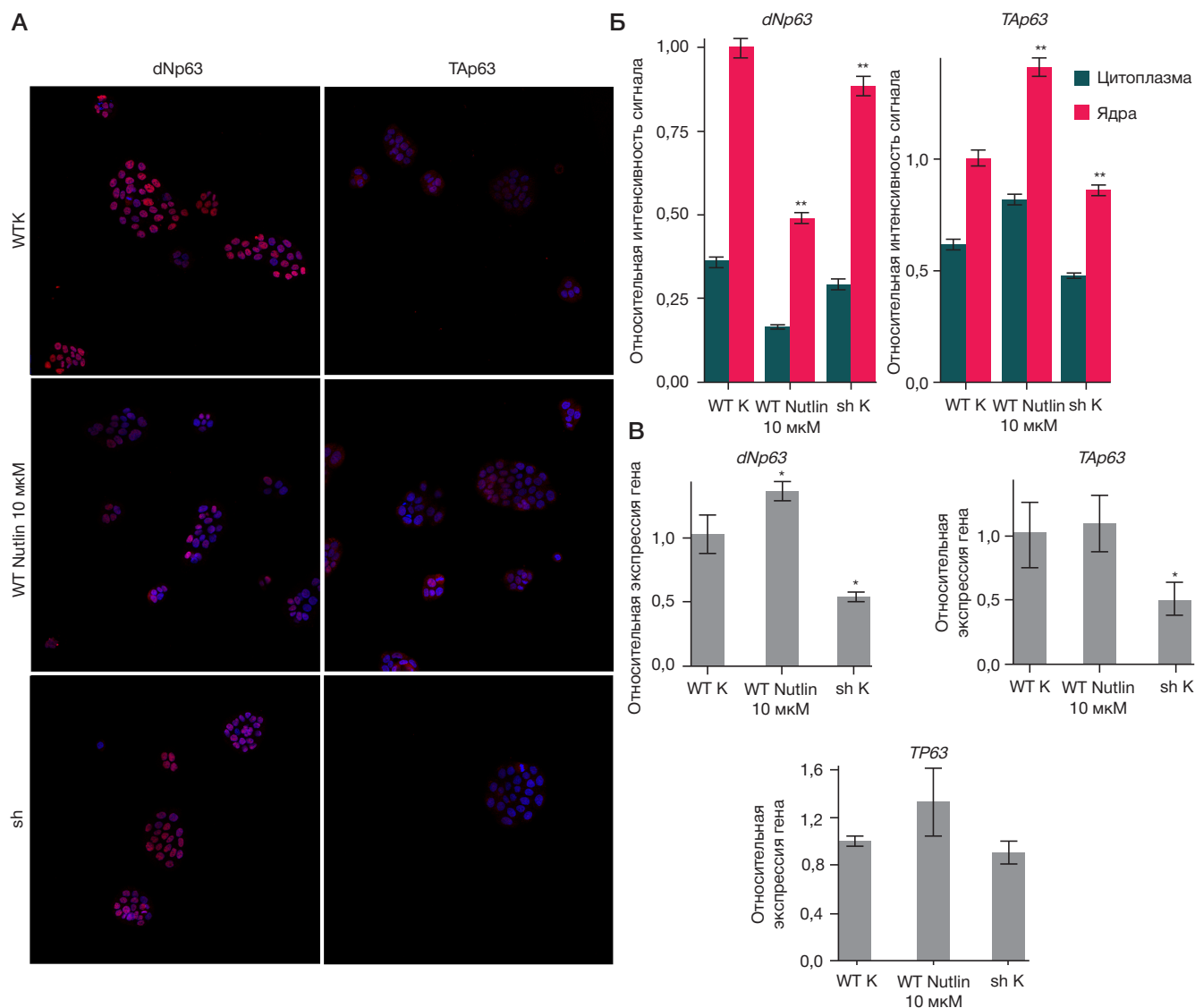


Рис. 3. Изменения экспрессии изоформ p63. **А.** Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия: dNp63, TAp63 (красный), DAPI (синий), увеличение $\times 400$. **Б.** Обобщенная диаграмма интенсивности флуоресценции в цитоплазме и ядре клеток. **В.** Экспрессия изоформ TP63 (dNp63, TAp63).

* — значимые различия между экспериментальными группами (sh, Nutlin-3a) и интактными клетками (WT K), $p < 0,05$

экспрессию TGM1, субстрат для которого (инволюкрин) нарабатывается в более низких слоях эпидермиса под влиянием иных регуляторных механизмов.

Нельзя исключить, что основным регулятором экспрессии TGM1 в клетках HaCaT является не p53 непосредственно, а белок Δ Np63. Как видно, динамика изменения экспрессии гена, кодирующего данный белок, является однонаправленной с изменениями экспрессии гена, кодирующего TGM1. Причем это изменение экспрессии Δ Np63 очевидно было связано с изменением активности p53 в клетках.

Очевидно влияние активности p53 в клетках HaCaT на экспрессию другого маркера дифференцировки кератиноцитов — каспазы 14. В клетках с нокадаун TP53 экспрессия кодирующего CASP14 гена значительно возрастала. По-видимому, в клетках HaCaT p53 прямо или косвенно эффективно ингибирует экспрессию этого белка. При этом активность такого воздействия достаточно высока — увеличение активности p53 в результате действия Nutlin-3a на клетки не приводило к значимому снижению экспрессии CASP14.

Следует отметить, что в условиях модуляции активности p53 в клетках HaCaT не возникали значимые изменения экспрессии цитокератинов. Исключение составил KRT5 — маркер клеток в составе низкорасположенных слоев эпидермиса. Его экспрессия незначительно возрастала при воздействии Nutlin-3a, по-видимому, в

результате активации эффектов mutp53, способствующих пролиферации клеток [4]. Экспрессия KRT10, характерная для дифференцирующихся кератиноцитов [23], в клетках с нокадаун p53 не менялась. При этом угнетение функции p53 в нормальных кератиноцитах сопровождается увеличением экспрессии указанных цитокератинов [7]. В клетках HaCaT mutp53 обладает выраженным ингибирующим действием на экспрессию этих белков, которое сохраняется в условиях неполного нокадауна TP53.

Выводы

В условиях модуляции активности p53 в клетках линии HaCaT меняется экспрессия отдельных маркеров дифференцировки клеток — в частности, каспазы 14, инволюкрин и трансклутаминазы-1, но не кератина KRT10. В отличие от нормальных кератиноцитов человека, клетки HaCaT реагируют на уменьшение активности p53 снижением экспрессии изоформ p63. Результаты настоящего исследования могут быть приняты во внимание при исследовании процессов, связанных с дифференцировкой кератиноцитов, и использовании линии HaCaT в качестве клеточной модели кожи. Полученные данные позволяют более детально оценить роль экспрессируемых линией HaCaT белков семейства p53 в различных физиологических процессах.

Литература

- Westfall MD, Mays DJ, Snizek JC, Pietenpol JA. The Δ Np63 α phosphoprotein binds the P21 and 14-3-3 σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol*. 2003; 23 (7): 2264–76.
- Botchkarev VA, Flores ER. P53/P63/P73 in the epidermis in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (8): a015248.
- Koster MI, Roop DR. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23 (1): 93–113.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, Dolfini D, Zambelli F, Imbriano C, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget*. 2012 Feb; 3 (2): 132–43.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and P53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994; 372 (6508): 773–6.
- Dazard JE, Piette J, Basset-Seguin N, Blanchard JM, Gandarillas A. Switch from P53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene*. 2000; 19 (33): 3693–705.
- Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R, et al. Inactivation of P53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep*. 2014; 9 (4): 1349–60.
- Seo E-Y, Piao Y-J, Kim J-S, Suhr K-B, Park J-K, Lee J-H. Identification of calcium-induced genes in HaCaT keratinocytes by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization. *Arch Dermatol Res*. 2002; 294 (9): 411–18.
- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, Larina OV, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol*. 2020; 4 (1): 4.
- Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the proteome of HaCaT keratinocytes induced by cytotoxic substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 163 (5): 620–2.
- Smits J, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems I, van de Zande G, Zeeuwen P, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): pii: 11838.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 833–9.
- Jung Y-S, Qian Y, Yan W, Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through P63. *J Invest Dermatol*. 2013; 133 (5): 1178–87.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011; 223: 116–26.
- Muller PA, Voudsen KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2011; 192: 209–18.
- Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*. 2013; 529: 227–40.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, et al. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, et al, Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
- McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamensky L, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biol*. 2018; 16 (7): e2005970. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; R foundation for statistical computing: Vienna, Austria. 2013.
- Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. Involucrin — structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol*. 1993; 100 (5): 613–7.
- Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*. 1991; 5 (15): 3071–7.
- Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*. 2008; 180 (3): 451–8.

23. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1993; 120 (1): 217–25.
24. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 345–82.
25. Могилевцева Ю. А., Мезенцев А. В., Брускин С. А. Оценка терапевтического потенциала РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы для лечения псориаза. *Вестник РГМУ.* 2017; (3): 37–45.
26. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 285–95.
27. Galli F, Rossi M, D'Alessandra Y, De Simone M, Lopardo T, Haupt Y, et al. MDM2 and Fbw7 cooperate to induce p63 protein degradation following DNA damage and cell differentiation. *J Cell Sci.* 2010; 123 (14): 2423–33.

References

1. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The $\Delta Np63\alpha$ phosphoprotein binds the P21 and 14-3-3 σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay–Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (7): 2264–76.
2. Botchkarev VA, Flores ER. P53/P63/P73 in the epidermis in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4 (8): a015248.
3. Koster MI, Roop DR. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23 (1): 93–113.
4. Martynova E, Pozzi S, Basile V, Dolfini D, Zambelli F, Imbriano C, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012 Feb; 3 (2): 132–43.
5. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and P53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372 (6508): 773–6.
6. Dazard JE, Piette J, Basset-Seguin N, Blanchard JM, Gandarillas A. Switch from P53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene.* 2000; 19 (33): 3693–705.
7. Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R, et al. Inactivation of P53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep.* 2014; 9 (4): 1349–60.
8. Seo E-Y, Piao Y-J, Kim J-S, Suhr K-B, Park J-K, Lee J-H. Identification of calcium-induced genes in HaCaT keratinocytes by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization. *Arch Dermatol Res.* 2002; 294 (9): 411–18.
9. Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, Larina OV, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4.
10. Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the proteome of HaCaT keratinocytes induced by cytotoxic substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (5): 620–2.
11. Smits J, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems I, van de Zande G, Zeeuwen P, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): pii: 11838.
12. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 833–9.
13. Jung Y-S, Qian Y, Yan W, Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through P63. *J Invest Dermatol.* 2013; 133 (5): 1178–87.
14. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223: 116–26.
15. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192: 209–18.
16. Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013; 529: 227–40.
17. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, et al. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, et al, Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
18. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamensky L, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biol.* 2018; 16 (7): e2005970. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>.
19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; R foundation for statistical computing: Vienna, Austria. 2013.
20. Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. Involucrin — structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol.* 1993; 100 (5): 613–7.
21. Greenberg CS, Birkbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 1991; 5 (15): 3071–7.
22. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 2008; 180 (3): 451–8.
23. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1993; 120 (1): 217–25.
24. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 345–82.
25. Mogilevtseva YuA, Mezentshev AV, Bruskin SA. RNA interference targeting interstitial collagenase is a potential therapeutic tool to treat psoriasis. *Bulletin of RSMU.* 2017; (3): 35–42.
26. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 285–95.
27. Galli F, Rossi M, D'Alessandra Y, De Simone M, Lopardo T, Haupt Y, et al. MDM2 and Fbw7 cooperate to induce p63 protein degradation following DNA damage and cell differentiation. *J Cell Sci.* 2010; 123 (14): 2423–33.

СТРУКТУРА И НЕЙРОМЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

А. С. Ковтун¹✉, О. В. Аверина¹, Е. У. Полуэктова¹, Г. П. Костюк², В. Н. Даниленко¹

¹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

² Психиатрическая клиническая больница № 1 имени Н. А. Алексеева, Москва, Россия

В последние годы большое внимание уделяется изучению влияния кишечной микробиоты на здоровье детей, в том числе психическое. Целью данной работы было определить изменения в таксономическом составе и содержании бактериальных генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений, в метагеноме микробиоты кишечника детей младшего и подросткового возраста. Данные для анализа были получены при помощи секвенирования полного метагенома. Для определения изменения представленности бактериальных генов и метагеномных сигнатур использовали разработанный биоинформатический алгоритм и каталог гомологов генов. В результате построена коровая нейрометаболическая сигнатура кишечной микробиоты здоровых детей младшего возраста, включающая в себя виды *Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Lachnospiraceae bacterium* и гены, участвующие в образовании уксусной, пропионовой и масляной кислот, глутамата и ферментов с антиоксидантной активностью. Сравнение метагеномов детей разных возрастных групп показало статистически значимое (P -value < 0,1) изменение представленности для 3 родов бактерий и 18 видов. Альфа-разнообразие микробиоты подростков выше как на родовом, так и на видовом уровнях. Кроме того, в микробиоте подростков повышена (P -value < 0,1) представленность генов, кодирующих ферменты, участвующие в образовании короткоцепочечных жирных кислот, глутамата, триптофана и ферментов с антиоксидантной активностью и деградации гистидина, конъюгации линолевой кислоты. Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные об увеличении биоразнообразия и развитии функциональных свойств кишечного микробного сообщества со взрослением человека.

Ключевые слова: микробиота кишечника, ось кишечник-мозг, метагеномные сигнатуры, развитие нервной системы, нейроактивные соединения

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта РНФ, № 20-14-00132.

Вклад авторов: А. С. Ковтун — разработка алгоритма, проведение биоинформатического анализа, участие в создании каталога, интерпретации и визуализации данных; О. В. Аверина — участие в разработке методологии, создании каталога, интерпретации данных и подготовки статьи; Е. У. Полуэктова — участие в разработке методологии и создании каталога; Г. П. Костюк и В. Н. Даниленко — разработка общей концепции и методологии исследования и участие в интерпретации данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 165 от 22 мая 2017 г.). Родители детей подписали согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Сергеевич Ковтун
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; kovtunas25@gmail.com

Статья получена: 13.11.2020 **Статья принята к печати:** 02.12.2020 **Опубликована онлайн:** 11.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.076

ALTERED NEUROMETABOLIC POTENTIAL OF GUT MICROBIOME IN HEALTHY CHILDREN OF DIFFERENT AGE

Kovtun AS¹✉, Averina OV¹, Poluektova EU¹, Kostyuk GP², Danilenko VN¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

² Psychiatric Hospital № 1 Named after N. A. Alexeev, Moscow, Russia

Recently much attention is paid to investigation of the gut microbiome impact on children's mental health. The study was aimed to detect alterations in the taxonomic composition and content of bacterial genes encoding key enzymes involved in the metabolism of neuroactive compounds in the metagenomes of healthy young children and adolescents. The whole metagenome sequencing was used to obtain the metagenomic data of the faecal specimens. The bioinformatics algorithm developed and the catalogue of homologs created were used to identify the changes in abundance of bacterial genes and metagenomic signatures in the studied metagenomes. The core neurometabolic signature of the healthy children gut microbiota included the *Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Lachnospiraceae bacterium* species, as well as genes involved in production of acetic, propionic and butyric acids, glutamate and enzymes possessing antioxidant activity. Comparison of metagenomes in children of different age groups revealed significant (p < 0.1) changes in the average abundance for 3 bacterial genera and 18 species. The higher alpha diversity of the adolescents' microbiota was observed both at the genus and species level. Furthermore, in the adolescents' microbiota metagenomes the increased average relative abundances for the genes encoding enzymes involved in production of SCFAs, glutamate, tryptophan and compounds with antioxidant properties, histidine degradation and linoleic acid conjugation were observed (p < 0.1). The study results support the evidence that healthy gut microbial communities become more diverse and functional as their human hosts become older.

Keywords: gut microbiota, gut-brain axis, metagenomic signatures, neurodevelopment, neuroactive compounds

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, project № 20-14-00132.

Author contribution: Kovtun AS — algorithm development, bioinformatics analysis, catalogue creation, data interpretation and visualization; Averina OV — method development, catalogue creation, data interpretation, manuscript writing; Poluektova EU — method development, catalogue creation; Kostyuk GP and Danilenko VN — study concept, method development, data interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 165 dated May 22, 2017). The informed consent was obtained from parents of all children.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey S. Kovtun
Gubkina, 3, Moscow, 119991; kovtunas25@gmail.com

Received: 13.11.2020 **Accepted:** 02.12.2020 **Published online:** 11.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.076

На сегодняшний день микробиоту кишечника человека (МКЧ) рассматривают как важный орган, играющий ключевую роль в поддержании здоровья человека. МКЧ — это совокупность микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт. В здоровом кишечнике микробные сообщества поддерживают метаболизм человека в гомеостазе и находятся внутри хозяина в состоянии иммунной толерантности. Через симбиотические отношения МКЧ выполняет различные функции, которые вносят большой вклад в физиологию хозяина [1]. Микробиота коэволюционирует со своим хозяином, состав микробного сообщества в пределах кишечного тракта меняется в ответ на различные внутренние и внешние стимулы. Виды бактерий, колонизирующие желудочно-кишечный тракт в раннем возрасте, оказывают влияние на здоровье хозяина в дальнейшей жизни [2]. Бактериальный состав микробиоты стабилизируется после первых трех лет жизни и уже близок к профилю микробиоты взрослого человека [3].

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о значительном воздействии МКЧ на широкий спектр поведения, включая социальное поведение, настроение, эмоции, тревогу и питание [4]. Кишечные бактерии влияют на различные неврологические состояния человека через так называемую «ось микробиота–кишечник–мозг» [4]. Первичный состав МКЧ может влиять на формирование нейронных сетей в период раннего развития нервной системы ребенка [5]. Бактерии воздействуют на центральную нервную систему (ЦНС) и кишечную нервную систему (ЭНС) различными путями через метаболиты и гормоны иммунной системы и афферентных нервов. Бактерии производят сотни различных соединений, которые могут влиять на физиологию хозяина. Изменения в микробном составе кишечника могут приводить к большим изменениям в продукции метаболитов. Поскольку хозяин постоянно подвергается воздействию этих молекул, не исключено, что они могут способствовать развитию различных нервно-психических расстройств, в том числе и депрессии [6].

Подростковый возраст и половое созревание — это критическая фаза развития нервной системы с многочисленными структурными, нейрохимическими и молекулярными изменениями, происходящими в ответ на генетические и экологические сигналы. В этом возрасте основная микробиота также претерпевает динамический сдвиг в составе и функционировании. Стероидные гормоны вызывают половые различия в микробном составе кишечника. Созревание МКЧ происходит параллельно с динамическим развитием мозга и оба имеют сходные критические периоды в развитии [7].

Использование технологии секвенирования нового поколения позволяет лучше понять состав кишечной микробиоты и исследовать ее структурные изменения на протяжении всей жизни человека [8]. В этом исследовании для изучения МКЧ мы использовали технологию секвенирования метагенома методом дробовика. Метод подразумевает секвенирование всего геномного материала, присутствующего в образце микробиоты, что позволяет не только получить полную информацию о бактериальном составе, но и дает достаточно точную оценку общих метаболических возможностей микробиоты и функциональных возможностей всех присутствующих в ней бактерий. Кроме того, этот метод позволяет анализировать микробиоту на уровне штаммов. Цель нашего исследования заключалась в выявлении различий

в таксономическом профиле и содержании бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений и биомаркерных метаболитов депрессии в сравниваемых метагеномах от здоровых детей разного возраста: 3–5 лет (метагеном маленьких детей (ММД) и 15 лет (метагеном подростка (МП).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Описание когорт и секвенирования метагеномов

Для проведения исследования использовали ранее секвенированные метагеномы микробиоты кишечника 23 здоровых нейротипичных маленьких детей в возрасте 3–5 лет (группа ММД) [9] и 7 подростков в возрасте 15 лет (группа МП) [10] из московского региона. Критерии включения в исследование: возраст; отсутствие недавних заболеваний желудочно-кишечного тракта; географическое происхождение — Москва и Московская область; отсутствие приема антибиотиков, про- или пребиотиков за 2 месяца до взятия образцов; отсутствие психиатрических расстройств (депрессивных расстройств, шизофрении, биполярного расстройства и т. д.); отсутствие диареи. Фекальные образцы, полученные от каждого волонтера, хранились в стерильных пластиковых контейнерах при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения анализа.

Выделение тотальной метагеномной ДНК, подготовка библиотек и секвенирование на приборе Illumina HiSeq (Illumina; США) проводили по алгоритму, описанному ранее [9]. Метагеномные чтения были депонированы в базе данных Sequence Read Archive (SRA) NCBI (номер в базе данных BioProject PRJNA516054 — для ММД и PRJNA380118 — для МП). Контроль качества «сырых» чтений проводили при помощи FastQC, а тримминг — с использованием Trimmomatic [11, 12]. Основания с качеством $Q < 20$ и последовательности короче 50 п.о. были удалены. Для фильтрации человеческой ДНК чтения картировали на геном человека (версия сборки hg19) программой bowtie2 [13]. Метагеномные чтения были собраны в контиги с помощью metaSPADes [14].

Параметры секвенированных образцов и полученных сборок представлены в табл. 1.

Разработка каталога

Каталог гомологов генов, участвующих в синтезе и метаболизме различных нейроактивных соединений, впервые представленный ранее [9, 15], был обновлен и расширен: добавлены гены, участвующие в синтезе и метаболизме различных соединений и метаболитов, описанных в опубликованных данных как биомаркеры депрессии [16]. Аминокислотные последовательности гомологов к данным генам были отобраны по алгоритму, описанному ранее [9] (табл. 2).

Таксономический и статистический анализ

Для определения таксономического состава использовали программы Kraken2 [17] и TAGMA [18]. Анализ проводили отдельно на уровнях типов, родов и видов. Альфа-разнообразие (индекс Шеннона) оценивали с помощью языка программирования R.

Статистически значимые изменения в таксономическом составе на уровнях родов и видов определяли с

Таблица 1. Характеристика исследуемых метагеномных образцов

№	Чтения			Сборки		
	Группа	Название образца	Размер, млрд п.о.	Размер, млн п.о.	Число контигов	N50, п.о.
1	ММД	HC_1	2,99	160,03	197683	2827
2	ММД	HC_2	1,91	129,61	194544	3020
3	ММД	HC_3	2,63	166,00	210193	3795
4	ММД	HC_4	3,46	189,25	209685	7667
5	ММД	HC_5	1,85	154,83	238146	2148
6	ММД	HC_6	4,71	182,04	174019	4487
7	ММД	HC_7	5,16	178,69	194821	2532
8	ММД	HC_8	7,15	154,62	142565	3426
9	ММД	HC_9	5,86	256,49	259614	2096
10	ММД	HC_10	6,77	149,53	156608	2114
11	ММД	HC_11	5,06	192,06	153535	14058
12	ММД	HC_12	6,26	201,55	175868	9029
13	ММД	HC_13	6,09	168,69	141685	9188
14	ММД	HC_14	6,16	168,31	121753	6826
15	ММД	HC_15	7,2	226,17	236984	2053
16	ММД	HC_16	6,18	178,16	153050	4611
17	ММД	HC_17	5,83	280,50	311115	1871
18	ММД	HC_18	5,23	214,81	205380	3613
19	ММД	HC_19	5,26	140,45	116040	13178
20	ММД	HC_20	4,73	172,67	125060	15088
21	ММД	HC_21	8,31	248,61	205319	6630
22	ММД	HC_22	9,86	277,61	238778	7011
23	ММД	HC_23	8,51	172,41	163607	3065
24	МП	D3F	10,1	108,11	61735	9284
25	МП	D4F	9	241,5	152814	5677
26	МП	D5F	9,9	142,83	53487	21016
27	МП	D6F	8,6	206,81	202650	3438
28	МП	D11F	7,7	38,29	31806	13412
29	МП	D12F	7,5	76,07	130779	760
30	МП	D13F	10,6	180,43	335100	617

использованием критерия Уилкоксона и поправки на множественное сравнение методом перестановок (1000 перестановок), порог значимости выбран на уровне $P\text{-value} < 0,1$. Такое значение обусловлено сравнительно малым количеством образцов в группе МП.

Идентификация сигнатур в метагеномных данных

Метагеномной сигнатурой является комбинация генов, найденных в метагеноме, и бактерий, их содержащих [9]. Для определения сигнатур метагеномные сборки были проанализированы по описанному ранее алгоритму [15]. Поиск открытых рамок считывания (ОРС) проводили программой MetaGeneMark (CША) [19]. Для аннотации ОРС использовали созданный каталог и BLASTp со следующими параметрами: гомология $\geq 60\%$; относительная длина выравнивания $\geq 80\%$. Бактериальное происхождение ОРС определяли на таксономическом уровне видов при помощи Kraken2. Все неклассифицированные последовательности обозначали как «Unclassified». Таким образом, для каждого образца был получен набор пар (вид; ген). Оценку относительной представленности пар определяли методом картирования чтений на соответствующие ОРС с использованием BWA [20]. Рид-каунты нормировали

методом «trimmed mean of M values» (TMM) с помощью библиотеки edgeR [21]. Сравнение относительных представленностей пар в группах ММД и МП проводили с помощью критерия Уилкоксона и поправкой на множественное сравнение методом перестановок (1000 перестановок; $P\text{-value} < 0,1$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Расширение каталога генов

Ранее разработанный референсный каталог гомологов генов, участвующих в метаболизме различных соединений с нейромодулирующей активностью, был расширен добавлением генов, кодирующих ферменты для продукции новых соединений и деструкции различных нейроактивных метаболитов [9, 15]. Итоговый каталог насчитывает 742 аминокислотные последовательности гомологов генов, кодирующих 68 бактериальных ферментов. В каталог вошли новые ферменты, участвующие в распаде γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), оксида азота, γ -оксимасляной кислоты и p -крезола, синтезе и распаде изовалериановой кислоты, инозитола и глутамата, а также ферменты с антиоксидантными свойствами:

Таблица 2. Состав обновленного каталога гомологов

№	Название фермента	Функция	Число гомологов
1	Дофадекарбоксилаза	Синтез серотонина, дофамина и норадреналина	10
2	Глутаматдекарбоксилаза	Синтез ГАМК	28
3	Гамма-аминобутират-антипортёр	Транспорт ГАМК	20
4	4-аминобутиратаминотрансфераза (gabT, ruuE), глицинаминотрансфераза	Распад ГАМК	17
5	Гистидиндекарбоксилаза	Синтез гистамина	13
6	Серотонин-N-ацетилтрансфераза	Распад серотонина для синтеза мелатонина	24
7	Ацетилсеротонин-O-метилтрансфераза	Синтез мелатонина	8
8	Синтаза оксида азота	Образование оксида азота	6
9	Диоксигеназа оксида азота, редуктаза оксида азота (norB, norC)	Распад оксида азота	13
10	Гидроксилазы аминокислот	Синтез катехоламинов	7
11	Моноаминоксидаза	Распад серотонина, дофамина и норадреналина	5
12	Фосфотрансацетилаза	Образование уксусной кислоты	43
13	Бутираткиназа	Синтез бутирата	16
14	Бутирил-CoA-дегидрогеназа	Синтез масляной кислоты	32
15	Лактоил-CoA-дегидратаза, пропиональдегиддегидрогеназа, метилмалонил-CoA-декарбоксилаза	Образование пропионовой кислоты	55
16	Изомераза линолевой кислоты	Коъюгация линолевой кислоты	23
17	Спермидинсинтаза	Синтез спермидина	26
18	Тирозиндекарбоксилаза	Синтез тирамина и дофамина	11
19	2-оксо-изовалириатдегидрогеназа (альфа, бета), дигидролипоилдегидрогеназа	Синтез изовалериановой кислоты (путь KADH)	24
20	Альдегиддегидрогеназа, пируватдекарбоксилаза	Синтез изовалериановой кислоты (путь KADC)	11
21	Мио-инозитол-1(или -4)-монофосфатаза, мио-инозитол-1-фосфатсинтаза	Синтез иносита	11
22	Мио-инозитол-2-дегидрогеназа	Распад иносита	13
23	4-гидроксibuтиратдегидрогеназа	Распад γ -оксимасляной кислоты	13
24	Глутаматсинтаза (gltB, gltD)	Синтез глутамата II	22
25	Глутаматмутаза (glmS, glmE), метиласпартатаммонийлиаза	Распад глутамата II	24
26	4-гидроксифенилацетатдекарбоксилаза	Синтез p-крезола	8
27	«4-крезолдегидрогеназа, протокатехуат 3,4-диоксигеназа (pcaG, pcaH)»	Распад p-крезола	15
28	Креатининамидогидролаза	Синтез креатинина	5
29	D-лактатдегидрогеназа	Образование D-изомера молочной кислоты	13
30	Глутатионсинтаза (gshAB, gshB)	Синтез глутатиона	12
31	Глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза, гамма-глутамилтранспептидаза	Распад глутатиона	35
32	Гистидинаммонийлиаза	Распад гистидина	20
33	Венилфенолредуктаза	Синтез 4-этилфенола	7
34	Триптофаназа	Образование индола из триптофана	7
35	Хоризматмутаза	Синтез префената	8
36	Префенатдегидрогеназа	Синтез 4-гидроксифенилпирувата	10
37	Тирозинспецифичный транспортный белок	Транспорт тирозина	6
38	Тирозинаминотрансфераза	Синтез тирозина	6
39	Фенилаланинаминотрансфераза	Синтез фенилаланина	3
40	Фенилаланинспецифичная пермеаза	Транспорт фенилаланина	6
41	Триптофансинтаза (альфа и бета)	Синтез триптофана	26
42	Триптофанспецифичный транспортный белок, триптофанпермеаза	Транспорт триптофана	7
43	Супероксиддисмутаза ([Mn], [Fe], [Cu-Zn]), каталаза, глутатионпероксидаза	Антиоксидант	73



Рис. 1. Относительная представленность найденных генов в группах ММД и МП. На рисунке отражены медианные значения относительной представленности каждого гена, найденного в более чем 50% образцов. Значения для группы ММД показаны красным цветом, для группы МП — зеленым. Числа над столбцами — значения P-value, оцененные при помощи критерия Уилкоксона и поправки на множественное сравнение методом перестановок, 1000 перестановок

супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза. Полный список генов, входящих в обновленный каталог, представлен в табл. 2.

Коровая метагеномная сигнатура кишечной микробиоты здоровых детей

На первом этапе в метагеномах группы ММД проводили поиск бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в синтезе нейроактивных соединений и биомаркеров депрессии, которые потенциально могут повлиять на формирование и функционирование нервной системы ребенка в первые годы жизни (рис. 1). Учитывали только гены, найденные более чем в 50% образцов. Наиболее представленными оказались гены, кодирующие метилмалонил-CoA-декарбоксилазу (продукция пропионовой кислоты), фосфотрансацетилазу (продукция уксусной кислоты), глутаматдекарбоксилазу (синтез ГАМК), гамма-аминобутират-антипортер (транспорт ГАМК) и гистидинаммонийлиазу (деструкция гистидина). Были также выявлены гомологи генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболических путях ГАМК, серотонина, мелатонина, масляной кислоты, конъюгированной линолевой кислоты, спермидина, изовалериановой кислоты, инозитола, γ -оксимасляной кислоты, глутамата, креатинина, индола, триптофана, супероксиддисмутаза, каталазы и глутатионпероксидазы.

Далее было определено бактериальное происхождение генов на уровне видов и построены сигнатурные пары (рис. 2А). Пары, выявленные в подавляющем числе образцов (более 70%), составили коровую нейрометаболическую метагеномную сигнатуру ММД (рис. 2Б). В нее вошли

четыре вида (*Bacteroides uniformis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae bacterium* и *Parabacteroides distasonis*) и гены, кодирующие 15 ферментов (глутаматдекарбоксилазу, гамма-аминобутират-антипортер, серотонин-N-ацетилтрансферазу, фосфотрансацетилазу, бутираткиназу, бутирил-CoA-дегидрогеназу, метилмалонил-CoA-декарбоксилазу, изомеразу линолевой кислоты, спермидинсинтазу, две субъединицы глутаматсинтазы, гистидинаммонийлиазу, триптофаназу, бета-субъединицу триптофансинтазы и супероксиддисмутаза).

Изменения в метагеномной сигнатуре МКЧ с возрастом

Метагеномные образцы МП были проанализированы по тому же алгоритму, что и ММД. Вначале проводили поиск гомологов генов из каталога (см. рис. 1). В среднем, для всех генов, найденных в более чем 50% образцов группы МП, выявлена повышенная относительная представленность по сравнению с группой ММД. В МП не было обнаружено гомологов генов, кодирующих 4-аминобутират-аминотрансферазу, креатининамидагидролазу и супероксиддисмутаза (ген *sodC*), однако это можно объяснить малым числом образцов в выборке. В связи с этим статистические тесты имели малую мощность. Статистически значимое (скорректированное P-value < 0,1) увеличение представленности выявлено в МП для генов, кодирующих фосфотрансацетилазу, бутирил-CoA-дегидрогеназу, метилмалонил-CoA-декарбоксилазу, 4-гидроксифенилацетат декарбоксилазу, альфа- и бета-субъединицы триптофансинтазы, супероксиддисмутаза (ген *sodB*) и каталазу.

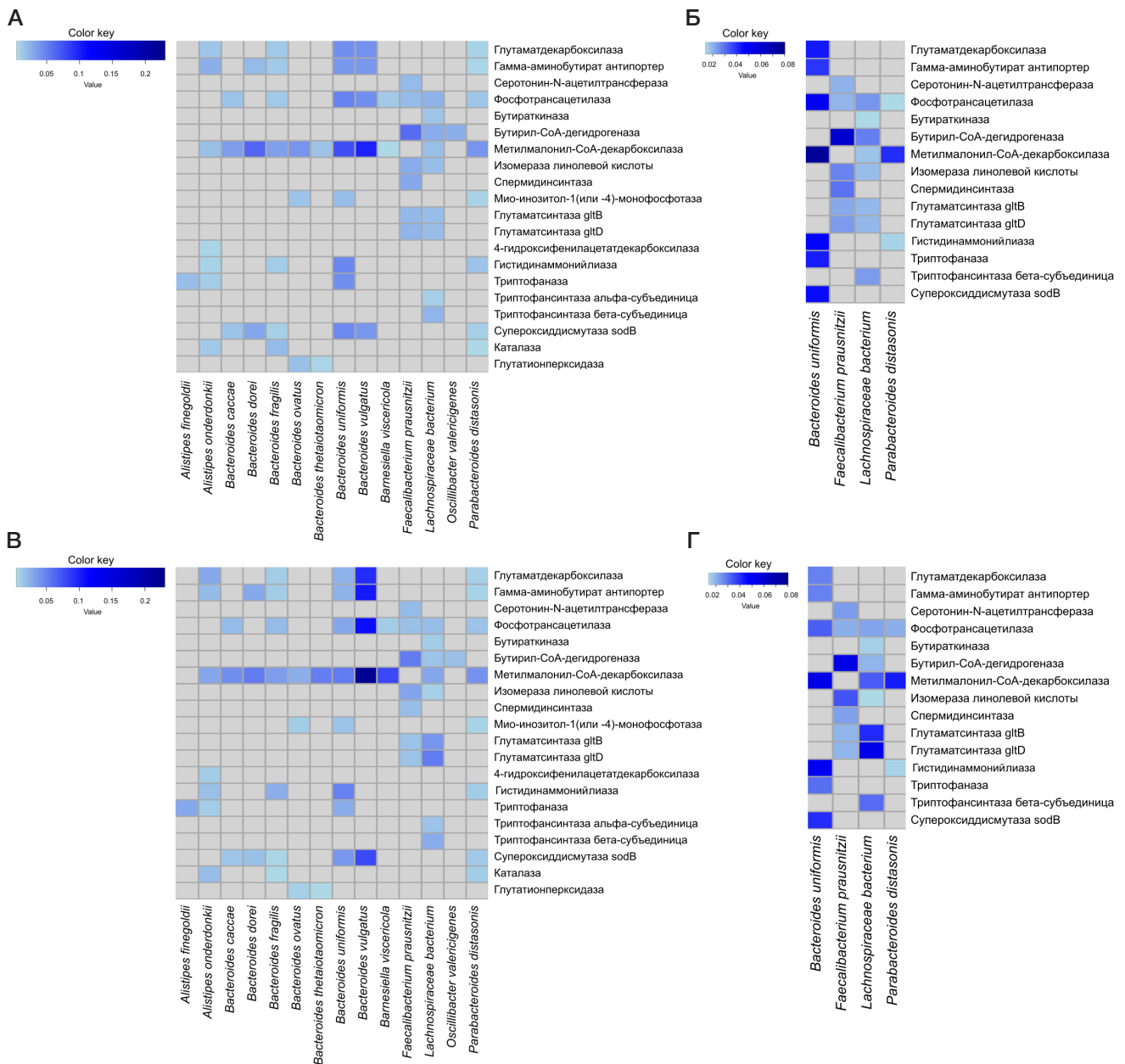


Рис. 2. Метагеномная сигнатура и коровая метагеномная сигнатура МК4, построенные для группы ММД (А и Б соответственно), и изменения представленности составляющих их сигнатурных пар в группе МП (В и Г соответственно). Цветной градиент отражает значение средней относительной представленности пар (вид; ген). На рис. (А) и (В) показаны только пары, найденные в более чем 50% образцов, а на рис. (Б) и (Г) — в более чем 70% образцов

Далее для МП были построены метагеномные сигнатуры и проведено сравнение с ММД по представленности пар (вид; ген) (рис. 2В). Статистически значимое увеличение представленности отмечено для пар (*Alistipes onderdonkii*; каталаза), (*A. onderdonkii*; глутаматдекарбоксилаза), (*A. onderdonkii*; гистидинаммонийлиаза), (*A. onderdonkii*; 4-гидроксифенилацетатдекарбоксилаза), (*Bacteroides vulgatus*; гамма-аминобутират-антипортер), (*Bacteroides thetaiotaomicron*; метилмалонил-CoA-декарбоксилаза) и (*Bacteriella viscericola*; метилмалонил-CoA-декарбоксилаза). Однако выявленное изменение представленности пар, составляющих коровую сигнатуру, не было значимым.

Сравнительный таксономический анализ кишечной микробиоты детей разного возраста

Все метагеномы были проанализированы программой Kraken2. Сравнение альфа-разнообразия ММД и МП

представлено на рис. 3. Среднее значение индекса Шеннона для МП выше как на уровне родов (рис. 3А), так и на уровне видов (рис. 3Б).

Таксономический состав ММД и МП определяли на уровнях типов, родов и видов. На уровне типов МП характеризуются статистически значимым увеличением представленности Proteobacteria (8,99% против 3,37% в ММД и МП соответственно, P-value = 0,001) (рис. 3В). Различия наблюдались и для типов Actinobacteria (4,85% против 2,77%; P-value = 0,735), Bacteroidetes (60,55% против 66,94%; P-value = 0,421), Firmicutes (21,08% против 24,42%; P-value = 0,758) и Verrucomicrobia (0,40% против 1,36%; P-value = 0,298), однако они не были значимыми.

В сравнении представленности на уровнях родов (табл. 3) и видов (табл. 4) участвовали только таксоны, определенные более чем в 50% образцов. В результате статистически значимое увеличение представленности (P-value < 0,1) выявлено для родов *Butyrivibrio*, *Gordonibacter*

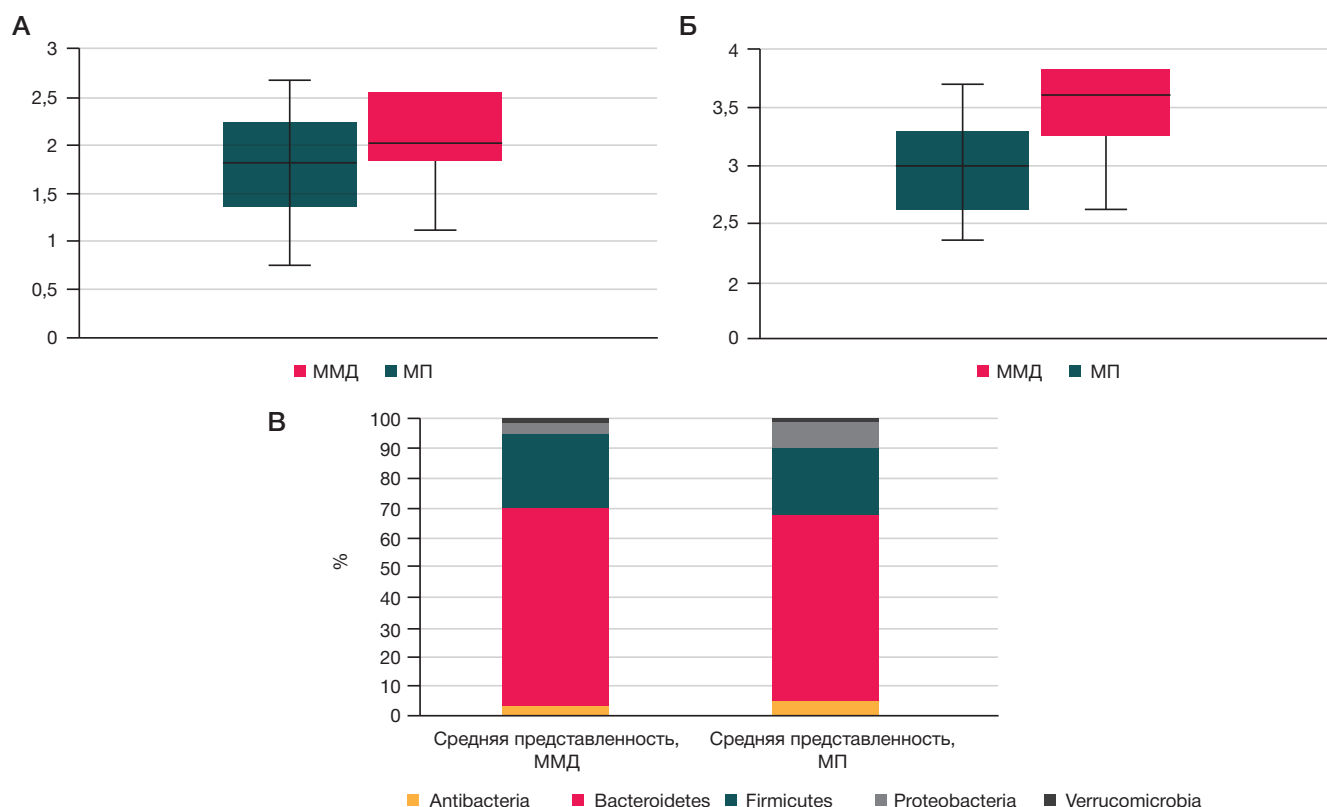


Рис. 3. Различия в таксономическом составе МКЧ в группах ММД и МП. Альфа-разнообразию определено при помощи индекса Шеннона для уровней родов (**А**) и видов (**Б**) для обеих групп. Изменения в таксономическом составе на уровне типов (**В**) показаны в процентах. Вертикальные планки погрешностей отражают стандартное отклонение

и *Prevotella*. На уровне видов статистически значимыми (P -value < 0,1) были увеличение представленности *Alistipes communis*, *Alistipes megaguti*, *Alistipes* sp. dk3624, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Eggerthella* sp. YY7918, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ruminis*, *Prevotella dentalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella enoeca*, *Prevotella jejuni*, *Prevotella oris* и *Prevotella ruminicola* и понижение представленности видов *Bacteroides* sp. A1C1, *Gordonibacter pamelaeeae*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus thermophilus*.

Дополнительно был проведен анализ исследуемых образцов по штаммовому разнообразию с использованием программы TAGMA (Россия) [18] (табл. 5). В МП медианное значение количества штаммов было увеличено по сравнению с ММД для видов *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae*. Больше число штаммов на образец было также показано для вида *Enterococcus faecium*, однако максимальное число штаммов было выше в группе ММД. Меньшее разнообразие штаммов в группе МП показано для вида *Bacteroides fragilis*. Помимо этого, у вида *Klebsiella pneumonia* медианное значение количества штаммов на образец было идентичным для обеих групп, но в МП выявлено значительно большее максимальное число штаммов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для исследования потенциальных механизмов, посредством которых МКЧ может влиять на правильное нейроструктурное и нейрокогнитивное развитие у здоровых детей в раннем возрасте, мы сосредоточились на группе бактериальных генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений,

коррелирующих с дисрегуляциями, которые приводят к нейрометаболическим нарушениям и нервно-психическому расстройству — депрессии. Использование составленного каталога гомологов к отобранной группе генов позволило нам определить нейрометаболическую сигнатуру ММД. С помощью сигнатурного подхода были выявлены виды бактерий, которые содержат наибольшее число генов (более семи генов) для продукции различных нейроактивных соединений и, следовательно, потенциально оказывающие большее влияние на развитие и функционирование мозга ребенка. К этим видам относятся: *B. uniformis*, *F. prausnitzii*, *L. bacterium* и *P. distasonis*, которые являются комменсалами микробиоты кишечника здоровых детей раннего возраста [22]. Эти бактерии содержат гены, кодирующие белки, участвующие в продукции уксусной, пропионовой и масляной кислот, ГАМК, и ферменты с антиоксидантными свойствами, которые оказывают положительное воздействие на психическое здоровье человека. *B. uniformis*, *F. prausnitzii* и *L. bacterium* вошли в коровую метагеномную сигнатуру кишечной микробиоты здоровых детей, которая может служить биомаркерным показателем микробиоты в норме у детей данного возраста.

Представленные исследования являются пилотными, это начальный этап изучения изменений в метаболическом потенциале кишечной микробиоты здоровых детей от раннего возраста до подросткового. Пока для сравнения была использована небольшая выборка группы подростков. Необходимо было определить, происходят ли изменения в микробиоте за время развития ребенка до взрослого возраста. Для этого проводили сравнение таксономических профилей и содержания бактериальных генов, кодирующих ключевые ферменты, участвующие в метаболизме нейроактивных соединений.

Таблица 3. Относительная представленность родов бактерий, найденных в группах ММД и МП

Род	Представленность в группе ММД, %	Представленность в группе МП, %	Соотношение ММД/МП	Скорректированное P-value	Число найденных образцов (из 30), %
<i>Akkermansia</i>	1,36 ± 3,33	0,38 ± 0,75	0,28	0,182	90
<i>Alistipes</i>	8,98 ± 7,60	7,22 ± 5,25	0,8	0,54	100
<i>Bacteroides</i>	49,16 ± 20,00	39,73 ± 18,84	0,81	0,261	100
<i>Bifidobacterium</i>	1,64 ± 2,93	3,08 ± 7,50	1,88	0,763	97
<i>Blautia</i>	1,05 ± 1,63	0,31 ± 0,16	0,3	0,237	100
<i>Butyricimonas</i>	0,33 ± 0,39	0,60 ± 0,84	1,84	0,232	100
<i>Cupriavidus</i>	0,02 ± 0,04	0,51 ± 1,30	22,3	0,178	80
<i>Faecalibacterium</i>	5,15 ± 4,85	3,42 ± 1,91	0,66	0,595	100
<i>Flavonifractor</i>	1,00 ± 1,57	0,24 ± 0,18	0,24	0,015	100
<i>Lachnospira</i>	1,22 ± 2,76	0,29 ± 0,29	0,24	0,18	100
<i>Odoribacter</i>	0,75 ± 0,79	1,28 ± 0,97	1,7	0,109	100
<i>Parabacteroides</i>	3,15 ± 4,03	2,63 ± 0,95	0,83	0,529	100
<i>Paraprevotella</i>	0,50 ± 0,89	0,88 ± 0,78	1,76	0,129	100
<i>Phascolarctobacterium</i>	1,05 ± 2,16	0,93 ± 1,26	0,89	0,652	57
<i>Prevotella</i>	0,22 ± 0,35	2,06 ± 3,31	9,24	0,033	100
<i>Pseudomonas</i>	0,17 ± 0,11	0,57 ± 0,40	3,43	1	100
<i>Roseburia</i>	1,40 ± 1,40	1,21 ± 1,23	0,87	0,485	100
<i>Ruminococcus</i>	1,59 ± 3,04	0,61 ± 0,82	0,39	0,457	97
<i>Xanthomonas</i>	0,07 ± 0,08	0,66 ± 0,59	10	1	100

Примечание: в таблице даны только роды, найденные в более чем 50% образцов и с представленностью не менее 0,5%.

Были выявлены различия в количественном содержании бактериальных генов для продукции и деструкции нейрометаболических соединений в составе сравниваемых метагеномов детей разного возраста, что является важнейшим результатом данного исследования. В МП обнаружено двукратное увеличение представленности генов, кодирующих ферменты, участвующие в продукции пропионовой, уксусной и масляной кислот, глутамата, триптофана, деградации гистидина, продукции конъюгированной линолевой кислоты и белков с антиоксидантными свойствами. Все эти соединения, как известно, оказывают положительное влияние на функционирование как кишечника, так и головного мозга и сохранение общего гомеостаза организма. Сообщалось, что уровень короткоцепочечных жирных кислот влияет на энергетический гомеостаз хозяина [23]. Триптофан служит субстратом для выработки нейромедиатора серотонина [24]. Нейротрансмиттеры серотонин и глутамат являются критическим звеном при депрессивном состоянии [25]. Конъюгированная линолевая кислота и белки с антиоксидантными свойствами играют важную защитную роль при окислительном стрессе. Содержание других выявленных генов было незначительным и с небольшой количественной разницей. Эти данные, вероятно, отражают разную степень значимости исследуемых бактериальных генов в поддержании нормального развития нервной системы у здоровых детей. Дальнейшие транскриптомные и метаболомные анализы будут проведены для экспериментального подтверждения полученных результатов биоинформатического анализа метагеномов.

Ранее проведенные исследования (основанные на анализе генов 16S рПНК), направленные на сравнение кишечной микробиоты детей разного возраста, показали существенные различия в таксономическом составе [26]. В нашем исследовании для сравнительного метагеномного анализа использованы данные, полученные с применением технологии секвенирования

метагенома методом дробовика. Хотя для сравнения была использована небольшая выборка МП, полученные результаты также показывают среднестатистическую разницу в составе таксонов кишечной микробиоты детей разного возраста. В МП было показано статистически значимое увеличение бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria*, и отсутствовало достоверное различие для типов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Альфа-биоразнообразие МП оказалось выше как на родовом, так и на видовом уровнях, что соответствует опубликованным данным о более разнообразной микробиоте подростков по сравнению с маленькими детьми [26]. Высокое биоразнообразие часто коррелирует с повышенным содержанием пробиотических бактерий. В наших исследованиях в МП выявлено больше бифидобактерий (*B. adolescentis*) и лактобактерий. Известно, что бифидобактерии и лактобациллы проявляют пробиотические свойства, и недавно они были предложены в качестве «психобиотиков» за их способность продуцировать нейромодуляторы и влиять на взаимоотношения кишечника и мозга [27]. Статистически значимое увеличение относительного содержания было показано в МП для представителей рода *Prevotella* и снижение содержания бактерии *A. muciniphila*, которая показывает отрицательную корреляцию с ожирением и воспалением [28]. Возможно, наблюдаемые изменения в составе микробиоты у детей по мере их взросления происходят под воздействием диеты и гормонов. В свою очередь изменения в композиции микробиоты могут влиять на развитие различных отделов головного мозга [29].

Нами получены данные о штаммовом разнообразии сравниваемых групп метагеномов. Выявлено медианное увеличение бактериальных штаммов в МП для патогенных бактерий видов *C. botulinum*, *C. perfringens*, *E. coli* и *S. pneumoniae*. Возможно, это связано с возрастанием случаев применения антибиотикотерапии во время взросления. Интересно отметить, что в группе МП

Таблица 4. Относительная представленность видов бактерий, найденных в группах ММД и МП

Вид	Представленность в группе ММД, %	Представленность в группе МП, %	Соотношение ММД/МП	Скорректированное P-value	Число найденных образцов (из 30), %
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1,35 ± 3,33	0,37 ± 0,75	0,28	0,127	90
<i>Alistipes communis</i>	0,94 ± 1,57	1,20 ± 0,91	1,27	0,075	100
<i>Alistipes dispar</i>	0,65 ± 1,39	0,29 ± 0,26	0,44	0,299	100
<i>Alistipes finegoldii</i>	2,55 ± 4,74	1,53 ± 2,25	0,6	0,662	100
<i>Alistipes onderdonkii</i>	2,65 ± 3,10	1,40 ± 2,10	0,53	0,3	100
<i>Alistipes shahii</i>	1,41 ± 2,37	1,82 ± 2,19	1,29	0,322	100
<i>Bacteroides caccae</i>	2,03 ± 3,24	2,21 ± 1,58	1,09	0,174	100
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	1,69 ± 4,02	3,52 ± 6,67	2,09	0,111	100
<i>Bacteroides dorei</i>	7,92 ± 7,74	4,15 ± 3,17	0,52	0,358	100
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,52 ± 3,84	1,62 ± 0,88	0,46	0,101	100
<i>Bacteroides ovatus</i>	4,87 ± 5,50	1,74 ± 0,97	0,36	0,218	100
<i>Bacteroides sp. A1C1</i>	1,77 ± 1,19	1,03 ± 0,67	0,58	0,05	97
<i>Bacteroides sp. CBA7301</i>	0,28 ± 0,34	0,75 ± 1,35	2,65	0,252	100
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,39 ± 2,29	1,38 ± 0,81	0,58	0,515	100
<i>Bacteroides uniformis</i>	5,87 ± 3,97	3,44 ± 2,51	0,59	0,109	100
<i>Bacteroides vulgatus</i>	7,78 ± 8,96	9,41 ± 10,14	1,21	0,54	100
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	2,17 ± 3,21	0,94 ± 0,83	0,43	0,629	100
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,41 ± 1,08	2,55 ± 6,60	6,17	0,227	93
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,76 ± 2,14	0,19 ± 0,36	0,25	0,568	97
<i>Blautia sp. SC05B48</i>	0,87 ± 1,56	0,18 ± 0,10	0,21	0,315	100
<i>Butyrivibrio faecalis</i>	0,33 ± 0,39	0,60 ± 0,84	1,84	0,208	100
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5,15 ± 4,85	3,42 ± 1,91	0,66	0,571	100
<i>Flavonifractor plautii</i>	1,00 ± 1,57	0,24 ± 0,18	0,24	0,012	100
<i>Lachnospira eligens</i>	1,22 ± 2,76	0,29 ± 0,29	0,24	0,151	100
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	0,75 ± 0,79	1,28 ± 0,97	1,7	0,134	100
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1,63 ± 2,03	1,35 ± 0,38	0,83	0,261	100
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	0,50 ± 0,89	0,88 ± 0,78	1,76	0,16	100
<i>Roseburia intestinalis</i>	0,99 ± 1,35	0,91 ± 1,08	0,92	0,878	100
<i>Ruminococcus bicirculans</i>	1,45 ± 2,99	0,41 ± 0,82	0,29	0,306	97
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	0,05 ± 0,08	0,64 ± 0,58	11,73	1	100

Примечание: в таблице даны только виды, найденные в более чем 50% образцов и с представленностью не менее 0,5%.

в среднем больше штаммов на образец для вида *E. faecium* и меньше штаммов для *B. fragilis*. Изменения в штаммовом составе микробиоты могут привести к изменению ее метаболической активности, поскольку продуцирование различных активных соединений бактериями штаммоспецифично. Комбинирование методов секвенирования методом дробовика и подхода метагеномных сигнатур в совокупности с биоинформатическими инструментами, позволяющими проводить таксономический анализ на уровне штаммов, может дать нам возможность строить метагеномные сигнатуры уже на уровне штаммов. Это, в свою очередь, должно помочь выявить способность к специфичной продукции нейроактивных соединений у новых штаммов. Данную информацию можно будет использовать в дальнейшем для создания методов диагностики состояния пациентов с такими нейropsychиатрическими заболеваниями, как депрессия, а также для разработки таргетной терапии для улучшения их состояния с применением фарма-, про-, пре и/или психобиотиков [30].

ВЫВОДЫ

Полученные результаты подтверждают и расширяют растущий массив доказательств того, что микробные сообщества кишечника становятся более разнообразными и функциональными в процессе взросления их хозяев. Кишечные бактериальные сообщества значительно обогащаются генами, участвующими в метаболизме нейроактивных соединений и соединений с противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, необходимыми для неврологической функции. Эти изменения происходят в ответ на внутренние и внешние факторы, такие как диета, антибиотики, гормоны, различные стрессы и др. Выявленная нейрометаболическая сигнатура микробиома у здоровых детей раннего возраста может служить биомаркером нормального состояния МКЧ. Будущие исследования должны быть направлены на выявление метагеномной сигнатуры кишечной микробиоты здоровых детей разного возраста из разных медико-социальных групп.

Таблица 5. Разнообразие штаммов в найденных видах бактерий, определенное при помощи программы TAGMA в группах ММД и МП

Вид	ММД		МП	
	Число образцов; доля образцов (из 23)	Штаммов на образец в среднем [мин.; макс.]	Число образцов; доля образцов (из 7)	Штаммов на образец в среднем [мин.; макс.]
<i>Anaerostipes hadrus</i>	20; 0,87	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	23; 1,00	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	22; 0,96	2 [1; 3]	7; 1,00	2 [1; 3]
<i>Bacteroides clarus</i>	22; 0,96	1 [1; 2]	6; 0,86	1 [1; 1]
<i>Bacteroides dorei</i>	14; 0,61	3 [3; 3]	5; 0,71	3 [1; 3]
<i>Bacteroides faecis</i>	18; 0,78	1 [1; 2]	4; 0,57	2 [1; 2]
<i>Bacteroides finegoldii</i>	21; 0,91	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [2; 3]
<i>Bacteroides fragilis</i>	20; 0,87	7 [2; 11]	7; 1,00	2 [1; 11]
<i>Bacteroides intestinalis</i>	22; 0,96	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Bacteroides ovatus</i>	22; 0,96	5 [1; 5]	7; 1,00	5 [1; 5]
<i>Bacteroides vulgatus</i>	21; 0,91	3 [1; 4]	7; 1,00	3 [2; 4]
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	21; 0,91	3 [1; 4]	7; 1,00	3 [2; 4]
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14; 0,61	2 [1; 3]	6; 0,86	2 [1; 3]
<i>Bifidobacterium longum</i>	20; 0,87	4 [1; 6]	5; 0,71	4 [3; 5]
<i>Blautia obeum</i>	23; 1,00	3 [3; 3]	7; 1,00	3 [3; 3]
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	22; 0,96	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	14; 0,61	1 [1; 1]	5; 0,71	1 [1; 1]
<i>Clostridium asparagiforme</i>	21; 0,91	1 [1; 1]	3; 0,43	1 [1; 1]
<i>Clostridium botulinum</i>	23; 1,00	2 [1; 6]	7; 1,00	3 [1; 5]
<i>Clostridium pasteurianum</i>	22; 0,96	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Clostridium perfringens</i>	23; 1,00	2 [1; 5]	7; 1,00	4 [2; 5]
<i>Clostridium sporogenes</i>	17; 0,74	1 [1; 2]	5; 0,71	2 [1; 2]
<i>Coprococcus catus</i>	13; 0,57	1 [1; 1]	6; 0,86	1 [1; 1]
<i>Coprococcus comes</i>	19; 0,83	1 [1; 2]	6; 0,86	1 [1; 2]
<i>Dialister invisus</i>	14; 0,61	2 [1; 2]	4; 0,57	2 [1; 2]
<i>Dorea formicigenerans</i>	23; 1,00	2 [1; 3]	7; 1,00	2 [1; 3]
<i>Eggerthella lenta</i>	16; 0,70	2 [1; 2]	2; 0,29	2 [1; 2]
<i>Enterococcus faecium</i>	23; 1,00	1 [1; 8]	6; 0,86	2 [1; 2]
<i>Escherichia coli</i>	20; 0,87	10 [2; 54]	7; 1,00	25 [4; 40]
<i>Eubacterium ramulus</i>	22; 0,96	1 [1; 1]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Eubacterium rectale</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Eubacterium ventriosum</i>	13; 0,57	1 [1; 1]	5; 0,71	1 [1; 1]
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	23; 1,00	5 [5; 5]	7; 1,00	5 [5; 5]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17; 0,74	2 [1; 29]	6; 0,86	2 [1; 5]
<i>Parabacteroides merdae</i>	15; 0,65	3 [2; 3]	5; 0,71	2 [2; 3]
<i>Roseburia intestinalis</i>	23; 1,00	4 [4; 4]	7; 1,00	4 [4; 4]
<i>Roseburia inulinivorans</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [2; 2]
<i>Ruminococcus bromii</i>	23; 1,00	1 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Ruminococcus gnavus</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	2 [1; 2]
<i>Ruminococcus lactaris</i>	23; 1,00	1 [1; 1]	7; 1,00	1 [1; 1]
<i>Ruminococcus torques</i>	23; 1,00	2 [1; 2]	7; 1,00	1 [1; 2]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14; 0,61	1 [1; 4]	3; 0,43	5 [1; 10]
<i>Streptococcus suis</i>	12; 0,52	1 [1; 1]	4; 0,57	1 [1; 1]
<i>Veillonella parvula</i>	12; 0,52	1 [1; 3]	3; 0,43	1 [1; 3]

Литература

1. Олескин А. В., Шендеров Б. А., Роговский В. С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020; 286 с.
2. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017; 66 (4): 515–22.
3. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1388.
4. Oleskin AV, Shenderov BA, Rogovsky VS. Role of neurochemicals in the interaction between the micro-biota and the immune and the nervous system of the host organism. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2017; 9 (3): 215–34.
5. Warner BB. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders. *Pediatr Res.* 2019; 85 (2): 216–24.
6. Шендеров Б. А., Голубев В. Л., Данилов А. Б., Прищепа А. В. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания. *Неврология.* 2016; 1: 7–13.
7. Yahfoufi N, Matar C, Ismail N. Adolescence and aging: impact of adolescence inflammatory stress and microbiota alterations on brain development, aging, and neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; 75 (7): 1251–7.
8. Forde BM, O'Toole PW. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Brief Funct Genomics.* 2013; 12 (5): 440–53.
9. Averina OV, Kovtun AS, Polyakova SI, Savilova AM, Rebrikov DV, Danilenko VN. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *J Med Microbiol.* 2020; 69 (4): 558–71.
10. Kovtun AS, Averina OV, Alekseeva MG, Danilenko VN. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of children with autistic spectrum disorder as possible predictors of the disease. *Microb Drug Resist.* 2020; 26 (11): 1307–20.
11. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
12. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30 (15): 2114–20.
13. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9 (4): 357–9.
14. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017; 27 (5): 824–34.
15. Ковтун А. С., Аверина О. В., Захаревич Н. В., Касьянов А. С., Даниленко В. Н. In silico определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме. *Генетика.* 2018; 54 (9): 1101–10.
16. Caspani G, Kennedy S, Foster JA, Swann J. Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. *Microb Cell.* 2019; 6 (10): 454–81.
17. Wood DE, LU J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019; 20 (1): 257.
18. Klimina KM, Voroshilova VN, Poluekyova EU, Veselovsky VA, Yunes RA, Kovtun AS, et al. Toxin-antitoxin systems: a tool for taxonomic analysis of human intestinal microbiota. *Toxins (Basel).* 2020; 12 (6): 388.
19. Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucl Acids Res.* 2010; 38 (12): e132.
20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25 (14): 1754–60.
21. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010; 26 (1): 139–40.
22. Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, et al. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Na. Commun.* 2019; 10: 1517.
23. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond).* 2015; 39 (9): 1331–8.
24. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kaptruczak N, Dougherty DM. Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res.* 2009; 2: 45–60.
25. Lewis CP, Port JD, Blacker CJ, Sonmez AI, Seewoo BJ, Leffler JM, et al. Altered anterior cingulate glutamatergic metabolism in depressed adolescents with current suicidal ideation. *Transl Psychiatry.* 2020; 10: 119.
26. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012; 486 (7402): 222–7.
27. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019; 11 (4): 1071–85.
28. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microb Pathog.* 2016; 106: 171–81.
29. Bonham KS, Bruchhage MMK, Rowland S, Volpe AR, Dyer K, RESONANCE Consortium, et al. Gut microbes and their genes are associated with brain development and cognitive function in healthy children. 2020. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.13.944181v3>.
30. Yunes RA, Poluektova EU, Vasileva EV, Odorskaya MV, Marsova MV, Kovalev GL, et al. A Multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020; 12 (3): 973–9.

References

1. Oleskin AV, Shenderov BA. Microbial communication and microbiota-host interactions: biomedical, biotechnological, and biopolitical implications. New York: Nova Science Publishers, 2020; 389 p.
2. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int.* 2017; 66 (4): 515–22.
3. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Nomoto K, Kawashima K, Nagata S, et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1388.
4. Oleskin AV, Shenderov BA, Rogovsky VS. Role of neurochemicals in the interaction between the micro-biota and the immune and the nervous system of the host organism. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2017; 9 (3): 215–34.
5. Warner BB. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders. *Pediatr Res.* 2019; 85 (2): 216–24.
6. Shenderov BA, Golubev VL, Danilov AB, Prischepa AV. Kishchnaya mikhrobiota cheloveka i neiroidenerativnyye zabolevaniya. *Nevrologiya.* 2016; 1: 7–13. Russian.
7. Yahfoufi N, Matar C, Ismail N. Adolescence and aging: impact of adolescence inflammatory stress and microbiota alterations on brain development, aging, and neurodegeneration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; 75 (7): 1251–7.
8. Forde BM, O'Toole PW. Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Brief Funct Genomics.* 2013; 12 (5): 440–53.
9. Averina OV, Kovtun AS, Polyakova SI, Savilova AM, Rebrikov DV, Danilenko VN. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *J Med Microbiol.* 2020; 69 (4): 558–71.
10. Kovtun AS, Averina OV, Alekseeva MG, Danilenko VN. Antibiotic

- resistance genes in the gut microbiota of children with autistic spectrum disorder as possible predictors of the disease. *Microb Drug Resist*. 2020; 26 (11): 1307–20.
11. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
 12. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114–20.
 13. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9 (4): 357–9.
 14. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res*. 2017; 27 (5): 824–34.
 15. Kovtun AS, Averina OV, Zakharevich NV, Kasianov AS, Danilenko VN. In silico identification of metagenomic signature describing neurometabolic potential of normal human gut microbiota. *Russ J Genet*. 2018; 54 (9): 1101–10.
 16. Caspani G, Kennedy S, Foster JA, Swann J. Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. *Microb Cell*. 2019; 6 (10): 454–81.
 17. Wood DE, LU J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 2019; 20 (1): 257.
 18. Klimina KM, Voroshilova VN, Poluekyova EU, Veselovsky VA, Yunes RA, Kovtun AS, et al. Toxin-antitoxin systems: a tool for taxonomic analysis of human intestinal microbiota. *Toxins (Basel)*. 2020; 12 (6): 388.
 19. Zhu W, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucl Acids Res*. 2010; 38 (12): e132.
 20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25 (14): 1754–60.
 21. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26 (1): 139–40.
 22. Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, et al. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Na. Commun*. 2019; 10: 1517.
 23. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39 (9): 1331–8.
 24. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kaptruczak N, Dougherty DM. Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009; 2: 45–60.
 25. Lewis CP, Port JD, Blacker CJ, Sonmez AI, Seewoo BJ, Leffler JM, et al. Altered anterior cingulate glutamatergic metabolism in depressed adolescents with current suicidal ideation. *Transl Psychiatry*. 2020; 10: 119.
 26. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486 (7402): 222–7.
 27. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019; 11 (4): 1071–85.
 28. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog*. 2016; 106: 171–81.
 29. Bonham KS, Bruchhage MMK, Rowland S, Volpe AR, Dyer K, RESONANCE Consortium, et al. Gut microbes and their genes are associated with brain development and cognitive function in healthy children. 2020. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.13.944181v3>.
 30. Yunes RA, Poluektova EU, Vasileva EV, Odorskaya MV, Marsova MV, Kovalev GL, et al. A Multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020; 12 (3): 973–9.

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ДИАГНОСТИКЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

П. Л. Ануфриев , М. М. Танашян, Т. С. Гулевская

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Активное развитие в последние десятилетия методов ангио- и нейровизуализации определяет актуальность совершенствования этиопатогенетической классификации ишемического инсульта, используемой для выбора целенаправленной тактики лечения и вторичной профилактики этого заболевания. С целью уточнить возможности клинической диагностики патогенетических вариантов ишемического инсульта в 125 случаях выполнено посмертное макро- и микроскопическое исследование мозга и сердечно-сосудистой системы для верификации патогенеза инсульта, установленного в результате предшествующего обследования пациентов. Показаны широкие возможности диагностики ведущих патогенетических подтипов инсульта (атеросклероз крупной артерии, кардиоаортальная эмболия, окклюзия мелкой артерии) при использовании комплекса современных клинико-инструментальных методов и основных морфологических критериев этих подтипов, отмеченных в общепризнанной классификации TOAST. Вместе с тем, клиническое и патоморфологическое исследование позволило выделить в подтипе «атеросклероз крупной артерии» инсульты, обусловленные различными изменениями одной церебральной артерии — атеротромботической окклюзией (44% инсультов этого подтипа), артерио-артериальной эмболией (13%) и критическим атеростенозом (10%), а также инсульты, возникающие по механизму сосудистой мозговой недостаточности (33%). Таким образом, высокая информативность существующих методов исследования позволяет более дифференцированно подходить к установлению причины ишемического инсульта, что в полной мере отвечает персонализированной направленности современной медицины.

Ключевые слова: ишемический инсульт, инфаркт головного мозга, патогенез, атеросклероз, артериальная гипертония

Финансирование: исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Острые церебральные нарушения сосудистого и несосудистого генеза: патогенетические, диагностические и терапевтические аспекты», номер государственной регистрации AAAA-A20-120110390021-4.

Вклад авторов: П. Л. Ануфриев — анализ и статистическая обработка данных, подготовка текста; М. М. Танашян, Т. С. Гулевская — дизайн исследования, анализ полученных данных, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 11/14 от 19 ноября 2014 г.)

 **Для корреспонденции:** Павел Лазаревич Ануфриев
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367; anufriev@neurology.ru

Статья получена: 24.11.2020 **Статья принята к печати:** 15.12.2020 **Опубликована онлайн:** 25.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.081

CONTEMPORARY APPROACH TO DIAGNOSIS OF ISCHEMIC STROKE PATHOGENETIC VARIANTS IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS AND ARTERIAL HYPERTENSION

Anufriev PL , Tanashjan MM, Gulevskaja TS

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The angio- and neurovisualization methods vigorously developing in recent decades determine the relevance of improvement of etiopathogenetic ischemic stroke classification used for the treatment tactics selection and for secondary prevention of the disorder. The study was aimed to clarify the capabilities of clinical diagnosis for pathogenetic variants of ischemic stroke. For that, in 125 postmortem cases, the macro and microscopic examination of brain and cardiovascular system was carried out in order to verify the stroke pathogenesis established as a result of the previous patients' examination. The study demonstrates the great potential of the major pathogenetic stroke subtypes (large-artery atherosclerosis, cardioembolism, small-artery occlusion) diagnosis using the complex of contemporary clinical and instrumental methods and the main morphological criteria of these subtypes in accordance with the TOAST classification. Moreover, the clinical and pathomorphological assessment allowed us to differentiate stroke resulting from various alterations of single cerebral artery, the atherothrombotic occlusion (44% of cases for the subtype), arterio-arterial embolism (13%) and critical stenosis (10%), as well as stroke resulting from cerebrovascular insufficiency (33%), within the "large-artery atherosclerosis" subtype. Thus, the high informativity of the existing examination methods allows for a more differentiated understanding of the cause of ischemic stroke, which is fully in line with modern personalized medicine.

Keywords: ischemic stroke, cerebral infarction, pathogenesis, atherosclerosis, arterial hypertension

Funding: the study was carried out as part of the public contract "Acute Vascular and Nonvascular Cerebral Lesions: Pathogenetic, Diagnostic and Therapeutic Aspects", state registration no. AAAA-A20-120110390021-4.

Author contribution: Anufriev PL — data analysis and statistical processing, manuscript writing; Tanashjan MM, Gulevskaja TS — study design, data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol № 11/14 dated November 19, 2014)

 **Correspondence should be addressed:** Pavel L. Anufriev
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; anufriev@neurology.ru

Received: 24.11.2020 **Accepted:** 15.12.2020 **Published online:** 25.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.081

На протяжении последних десятилетий ишемические инсульты остаются одной из наиболее важных медико-социальных проблем в связи с высокими показателями заболеваемости и смертности [1, 2]. Решение данной

проблемы в определенной степени ограничено сложностью изучения патогенеза этих состояний вследствие выраженного полиморфизма обуславливающих подавляющее большинство ишемических инсультов изменений сердечно-сосудистой

системы и головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии (АГ). Во второй половине прошлого века появились основанные на представлениях о гетерогенности нарушений мозгового кровообращения клинические классификации, которые начали использовать для выбора целенаправленной тактики лечения и вторичной профилактики ишемических инсультов, а также для стандартизации при проведении клинических испытаний и эпидемиологических исследований. Международное признание, в том числе в Российской Федерации, получила этиопатогенетическая классификация TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment). [3–5]. Однако значительная частота инсульта с неустановленной причиной (до 30–40%) свидетельствовала о недостаточной определенности критериев диагностики вариантов инсульта, выделенных в этой классификации [6, 7].

Отмеченный в последние десятилетия активный рост клинико-диагностических возможностей, прежде всего появление высокоинформативных модификаций магнитно-резонансной томографии мозга, сопровождался уточнением классификации TOAST. Это позволило в несколько раз снизить частоту инсульта с неустановленной причиной [8, 9]. В уточненной версии этой классификации, Stop Stroke Study (SSS), определены критерии очевидного, вероятного и возможного характера ведущих патогенетических подтипов ишемического инсульта — атеросклероза крупной артерии, кардиоаортальной эмболии и окклюзии мелкой артерии.

Появление ряда других классификационных систем связано с насущной потребностью в совершенствовании этиопатогенетической классификации инсульта в соответствии с современными возможностями его диагностики и лечения [10–15]. В них продолжают оставаться предметом дискуссии наиболее значимые критерии диагностики основных подтипов инсульта, отмеченных в классификации TOAST, и предлагаются дополнительные признаки этих подтипов. К наиболее дискуссионным можно отнести следующие вопросы: минимальная степень выраженности одиночного и множественного атеросклеротического стеноза (атеростеноза) церебральных артерий, при которой развиваются нарушения мозгового кровообращения; величина, локализация и другие морфологические особенности инфарктов при разных подтипах инсульта; значение разнообразных диффузных и мелкоочаговых изменений мозга в диагностике гипертонического лакунарного инсульта, относящегося к подтипу «окклюзия мелкой артерии». Некоторые классификационные системы предлагают на основании определенных клинико-морфологических признаков выделять инсульты с тем или иным механизмом развития, как в рамках существующих патогенетических подтипов, так и в отдельный подтип.

Обширную и наиболее достоверную информацию о механизмах развития ишемических нарушений мозгового кровообращения дают патоморфологические исследования при условии детальной оценки изменений мозга и сердечно-сосудистой системы. Эти исследования приобретают особенно важное значение в сопоставлении с данными предшествующего обследования пациентов, позволяющего уточнить критерии клинико-инструментальной диагностики патогенетических подтипов инсульта. Актуальность патоморфологических исследований и клинико-патоморфологических сопоставлений, охватывающих многообразие патогенеза ишемических изменений мозга при атеросклерозе, АГ и весьма частом

их сочетании, подчеркивает немногочисленность таких работ и противоречивый характер полученных данных.

Целью настоящего исследования было уточнить возможности клинической диагностики патогенетических вариантов ишемического инсульта, связанных с атеросклерозом и АГ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено клинко-патоморфологическое сопоставление в 125 случаях ишемического инсульта, наблюдавшихся в Научном центре неврологии с 1990 по 2015 г. Критерии включения пациентов в исследование: умершие мужчины и женщины в возрасте 45–74 лет с инфарктами мозга. Критерии исключения: отсутствие сосудистой патологии в виде атеросклероза аорты и церебральных артерий, АГ, ишемической болезни сердца (ИБС). Среди пациентов преобладали мужчины (78%), средний возраст пациентов составил 62 года. Атеросклероз аорты и церебральных артерий разной степени выраженности в сочетании с АГ выявлен во всех случаях, а различные формы ИБС — в 64% случаев. Летальный исход в большинстве случаев был обусловлен отеком мозга при наличии крупных инфарктов или кровоизлияний, а при отсутствии таковых — тромбозом легочной артерии, сердечно-сосудистой недостаточностью, связанной с ИБС, а также почечной или полиорганной недостаточностью, возникшей при тяжелом инфекционном заболевании.

Патогенетический подтип инсультов устанавливали в соответствии с классификацией SSS-TOAST, ориентируясь на критерии того или иного подтипа [8]. Для этого оценивали информацию, полученную при компьютерной томографии (56% случаев) или магнитно-резонансной томографии мощностью 0,5 и 1,5 Тесла (44%), а также данные об изменениях аорты и церебральных артерий, полученные в результате цветового дуплексного сканирования магистральных артерий головы, в том числе в сочетании с транскраниальной доплерографией с эмболодетекцией (16% случаев), компьютерной томографической ангиографией (28%) или магнитно-резонансной ангиографией (34%). Учитывали данные анамнеза о предшествующих инсульту эпизодах нестабильности сердечной деятельности и артериального давления (АД), данные офтальмологического и эндокринологического обследования, электрокардиографии, включая холтеровское мониторирование (сутки и более), а также трансэзофагеальной эхокардиографии (22%).

При патоморфологическом исследовании учитывали характеристику инфарктов мозга — локализацию, величину, вид (белый или геморрагический), степень организации; изменения артерий от дуги аорты до мелких сосудов поверхности мозга включительно — эмболы, осложненные атеросклеротические поражения (кровоизлияние в атеросклеротическую бляшку (АСБ), ее изъязвление, тромбоз), степень выраженности атеростеноза (в соответствии с методикой клинико-инструментального исследования); состояние ликворной системы; наличие мелких кровоизлияний и расширенных периваскулярных пространств (криблур). Устанавливали выраженность связанных с атеросклерозом и АГ изменений сердца, наличие кардиогенных эмболов в ветвях брюшной аорты.

При микроскопическом исследовании уточняли осложненные атеросклеротические поражения, характер окклюзии крупных и мелких поверхностных артерий,

мелкоочаговых изменений мозга; оценивали состояние перивентрикулярного белого вещества. В каждом случае вырезали 5–10 блоков мозга размерами 2,5 x 3 см и толщиной 0,5 см. Исследование крупных артерий проводили на блоках такой же толщины, вырезанных перпендикулярно продольной оси сосуда. Для микроскопии парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином Карazzi и эозином, с помощью методов Вейгерта–Ван-Гизона (для оценки изменений артерий) и Клювера–Барреры (для оценки состояния белого вещества). Анализ полученных данных позволял установить причину каждого инфаркта.

Для выявления различий использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку результатов проводили с помощью программы Statistica (StatSoft Inc.; США), версия 13.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с классификацией SSS-TOAST, 76 инсультов (из 125) выделены в подтип «атеросклероз крупной артерии» на основании выявления изменений артерий на стороне инфаркта в виде окклюзии или атеростеноза, как выраженного ($\geq 50\%$), так и умеренного (30–49%), при отсутствии патологии сердца и аорты с высоким риском эмболии. При клинко-инструментальном и последующем патоморфологическом исследовании установлены четыре причины инсультов этого подтипа: критический атеростеноз (70–90%) одной артерии — 10%; множественный атеростеноз — 33%; обтурирующий тромбоз в области АСБ (атеротромбоз) — 44%; артерио-артериальная тромбоэмболия (13%), при которой в сосудах, расположенных проксимально области окклюзии, выявляли АСБ с пристеночным тромбом (рис. 1).

Возникновение инсульта в случаях со стенозом одной артерии было обусловлено внезапным и значительным увеличением объема АСБ вследствие обширного кровоизлияния или пристеночного тромбоза. Обтурирующий тромбоз возникал при деструктивных процессах в АСБ, таких как истончение и разрушение покрышки в области очагов атероматоза и кальциноза. Степень сужения просветов сосудов в случаях с множественным стенозом колебалась от 30 до 70%, причем в 10 наблюдениях (из 25) его максимальная выраженность не превышала 50%. Установлено разнообразие величины и локализации инфарктов с небольшим преобладанием (в 1,5 раза, $p < 0,05$) крупных инфарктов (рис. 2).

Отмечено, что окклюзия или стеноз одной артерии определяют возникновение инфарктов строго в бассейне измененного сосуда, тогда как при множественном стенозе возникают очаговые изменения в области смежного кровоснабжения и лакунарные инфаркты. Как показало микроскопическое исследование, в пределах и вблизи инфарктов в зонах смежного кровоснабжения и лакунарных инфарктов имеются артерии с «перекалибровкой» просвета в сторону его уменьшения вследствие склероза внутренней оболочки или пролиферации ее элементов с образованием дополнительной внутренней эластической мембраны. В этих случаях отсутствовали сахарный диабет, окклюзии, выраженные атеростенозы и тяжелые гипертонические изменения экстра- и интрацеребральных артерий диаметром 200–500 мкм в области исследованных очагов, рассматриваемые в качестве основных причин мелкоочаговых ишемических повреждений мозга [3, 14, 16, 17].

В подтип «кардиоаортальная эмболия» выделили 32 инсульта на основании отсутствия стеноза церебральных артерий $\geq 50\%$ на стороне инфаркта и выявления патологии сердца и аорты с высоким риском эмболии. При этом установлено почти двукратное преобладание фибрилляции предсердий ($p < 0,05$), которую рассматривают как наиболее распространенную причину кардиогенного эмболического инсульта [18, 19] (рис. 3).

Посмертное исследование подтвердило наличие эмболизованной АСБ в дуге аорты и отмеченных форм ИБС, причем морфологическим маркером мерцательной аритмии служил мелкоочаговый склероз миокарда предсердий. В артериях, расположенных проксимально по отношению к области окклюзии, обнаруживались АСБ, суживающие просвет не более чем на 30%, в которых отсутствовали изменения, определяющие возможность эмболии.

Инфаркты при этом подтипе инсульта могли занимать основную часть бассейна внутренней сонной или средней мозговой артерии, но чаще бассейн 1–2-х ветвей средней или передней мозговой артерии (62% случаев). Системный характер эмболии и наличие геморрагического компонента в инфарктах определялись в 40 и 47% случаев соответственно, причем установленная при патоморфологическом исследовании кардиогенная эмболия ветвей брюшной части аорты с развитием инфарктов в почках и селезенке имела бессимптомный характер в связи с небольшими размерами очагов (1–2 см).

Классификация SSS-TOAST допускает возможность установления подтипа «кардиоаортальная эмболия» при

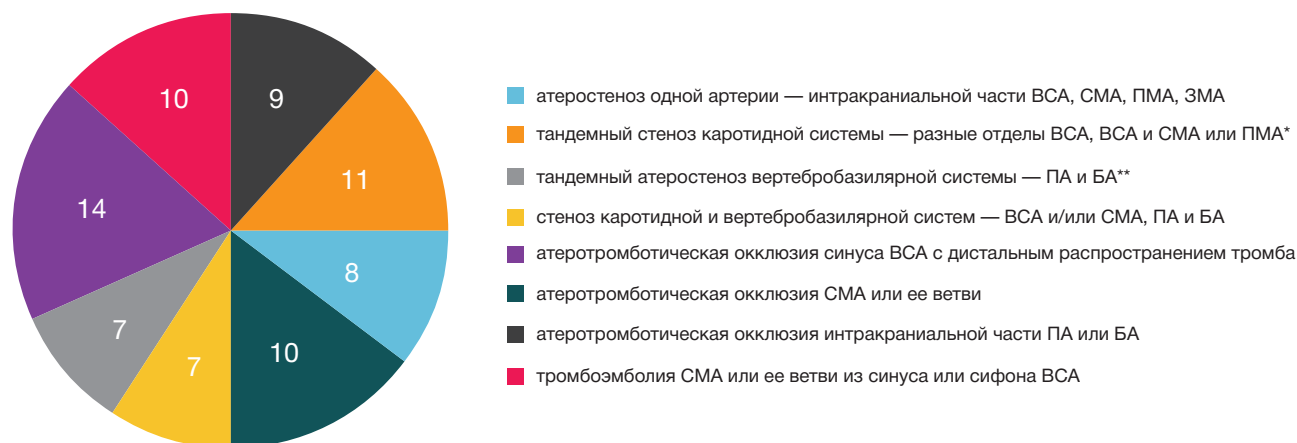


Рис. 1. Причины инсультов подтипа «атеросклероз крупной артерии». ВСА — внутренняя сонная артерия, СМА — средняя мозговая артерия, ПМА — передняя мозговая артерия, ЗМА — задняя мозговая артерия, ПА — позвоночная система, БА — базилярная артерия; * — в сочетании с контрлатеральным стенозом ВСА или СМА, ** — в сочетании с контрлатеральным стенозом ПА



Рис. 2. Инфаркты при инсульте подтипа «атеросклероз крупной артерии». ВСА — внутренняя сонная артерия, СМА — средняя мозговая артерия, ПМА — передняя мозговая артерия, ЗМА — задняя мозговая артерия, БА — базилярная артерия, НЗАМ — нижняя задняя артерия мозжечка, ЗСК — зона смежного кровоснабжения; * — в области верхней лобной борозды и на границе верхней и средней трети центральных извилин, ** — в области межтеменной борозды и нижней височной извилины

обнаружении признаков очевидной эмболии из сердца и аорты, что, однако, может вызывать определенные трудности. Так, в результате эхокардиографии и посмертного исследования тромбы в сердце были обнаружены всего в 12 случаях (из 31), а окклюзия церебральных артерий выявлена только в половине случаев, главным образом при локализации эмболов во внутренней сонной или средней мозговой артерии. Выявление окклюзии оказалось невозможным при госпитализации пациентов спустя четыре и более суток от момента дебюта инсульта вследствие известного феномена «исчезающей окклюзии», обусловленного спонтанной фрагментацией эмболов и дистальной миграцией их фрагментов. Этот феномен нашел свое отражение и в ряде посмертных наблюдений, в которых эмболия ветвей средней или передней мозговой артерии верифицировалась только в результате микроскопии с обнаружением тромбоэмболов в мелких артериях мягкой мозговой оболочки вблизи инфаркта.

Небольшое число инсультов (17) отнесено к подтипу «окклюзия мелкой артерии» на основании обнаружения инфаркта диаметром ≤ 20 мм в бассейне пенетрирующих артерий полушария или ствола мозга при отсутствии изменений экстра- и интракраниальных артерий на стороне очагового поражения в виде окклюзии или стеноза, в том числе умеренного. Выявленные очаги размерами 1–2 см в 11 случаях инсульта располагались в области колена и заднего бедра внутренней капсулы, в 6 случаях — в таламусе и глубоких отделах основания моста. Их расценивали как гипертонические лакунарные инфаркты, что подтверждало наличие эпизодов повышения АД до 180/110 мм рт. ст. и выше в анамнезе и при госпитализации, выявление ангиопатии сетчатки глаз по гипертоническому типу и гипертрофия миокарда левого желудочка сердца. При патоморфологическом исследовании гипертонические лакунарные инфаркты, как и атеросклеротические, имели меньшие, чем при нейровизуализации, размеры (0,5–1,5 см), что связано с их организацией. Подтверждена патогенетическая связь этих инфарктов с АГ, так как в непосредственной близости к очагам определялись артерии с характерными для этого заболевания изменениями — гиалинозом или организующейся плазморрагией с фокусами фибриноидного некроза, сопровождающимися резким сужением просветов вплоть до полного закрытия.

Следует отметить наличие множественных инфарктов, включая «немые», в одном и том же артериальном бассейне в 49% случаев инсульта подтипа «атеросклероз крупной артерии». Основную часть «немых» ишемических очагов составили одиночные и множественные лакунарные инфаркты (54 из 78), связь которых с АГ исключали при микроскопии. Остальные бессимптомные инфаркты были малыми корковыми, которые возникали при наличии критических атеростенозов и окклюзий мелких артерий поверхности мозга, но чаще всего вследствие выраженных стенозов более крупных артерий, как и лакунарные инфаркты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование продемонстрировало разнообразие ишемических повреждений мозга и изменений сердечно-сосудистой системы в случаях сочетания атеросклероза церебральных артерий, ИБС и АГ. Клиническая диагностика этих изменений требует использования комплекса методов, которые, как показала данная работа, необходимо выполнять в течение первых 1–3 суток от момента дебюта инсульта. Современные методы исследования дают обширные сведения о морфологии ишемического инсульта. Так, цветовое дуплексное сканирование магистральных артерий головы позволяет не только с точностью до 95% определить степень стеноза, но также одновременно обнаружить изъязвления, кровоизлияния и другие структурные особенности АСБ, с которыми ассоциирован повышенный риск развития инсульта [20]. Широкие возможности верификации кардиогенной эмболической патологии связаны с активным использованием эхокардиографии и холтеровского мониторинга, а также с внедрением в клиническую практику долгосрочного электрокардиографического мониторинга (30 суток и более) и магнитно-резонансной томографии сердца [21–23]. Методы нейровизуализации дают исчерпывающую информацию об острых очаговых повреждениях мозга, диффузном изменении белого вещества и состоянии церебральной перфузии, а также позволяют визуализировать осложненные атеросклеротические поражения [24–26]. Магнитно-резонансная ангиография стала методом выбора в диагностике изменений интракраниальных артерий, включая окклюзии и стенозы перфорирующих артерий



Рис. 3. Патология с высоким риском эмболии церебральных артерий

в области их отхождения, которые относят к основным причинам мелкоочаговых повреждений мозга [27].

Настоящее исследование является одной из немногочисленных российских работ, в которой на основании патоморфологической верификации показаны высокие возможности диагностики ведущих патогенетических подтипов ишемического инсульта (атеросклероз крупной артерии, кардиоаортальная эмболия, окклюзия мелкой артерии) при использовании комплекса современных клиничко-инструментальных методов, а также основных морфологических критериев этих подтипов, выделенных в классификации SSS-TOAST. Кроме того, в исследовании отмечен непостоянный характер рассматриваемых в литературе дополнительных признаков подтипа «кардиоаортальная эмболия» — системный характер эмболии и наличие геморрагического компонента в инфарктах, и подтипа «атеросклероз крупной артерии» — возникновение множественных инфарктов, включая «немые», в одном и том же артериальном бассейне [8, 28]. Небольшое количество гипертонических лакунарных инсультов не позволило определенно судить о значении других характеристик, отмеченных в литературе в качестве дополнительных маркеров этих инсультов (диффузное снижение плотности белого вещества и кривбурности, обусловленные персистирующим отеком, расширение желудочковой системы и субарахноидального пространства в области борозд полушарий, мелкие кровоизлияния, сочетание клинически значимых лакунарных инфарктов с такими же «немыми» инфарктами, расположенными в другом артериальном бассейне) [13]. Тот или иной признак обнаружен не более чем в двух случаях инсульта как при нейровизуализации, так и в результате патоморфологического исследования.

Высокая информативность имеющихся в настоящее время клиничко-инструментальных методов, по нашему мнению, позволяет проводить более углубленную диагностику патогенетических вариантов инсульта. Углубленная дифференциальная диагностика особенно важна для подтипа «атеросклероз крупной артерии», в котором, согласно полученным клиничко-инструментальным и патоморфологическим данным, объединены инсульты, обусловленные различными причинами — критическим атеростенозом или артерио-артериальной тромбозом эмболией интракраниальной артерии, атеротромботической окклюзией экстра- или интракраниальной артерии, а также множественным атеростенозом с максимальной степенью его выраженности $\geq 50\%$. Более низкая величина максимального стеноза при множественном атеросклеротическом

поражении по сравнению с одиночным стенозом может быть связана с наличием локальных препятствий для коллатерального кровообращения, осуществляемого посредством анастомозов виллизиева круга и артериальной сети поверхности мозга. Следует, по-видимому, согласиться с мнением тех авторов, которые в случаях инсульта, возникающем при множественном стенозе, предлагают оценивать не его максимальную степень выраженности, а суммарный стеноз церебральных артерий [15].

Инфаркты при множественном атеростенозе развивались по механизму сосудистой мозговой недостаточности, учение о которой было разработано еще в 1950-х гг. D. Denny-Brown и E. Corday. Согласно этому учению, возникновение инфарктов зависит не только от локальных препятствий кровотоку, но и от состояния общей гемодинамики. В соответствии с известным в ангионеврологии принципом «последнего луга» Шнайдера-Цюльха, при нарушениях общей гемодинамики очаги ишемии появляются прежде всего в наиболее удаленных от основного источника кровоснабжения участках мозга, т. е. в областях смежного кровоснабжения ветвей внутренних сонных и/или позвоночных артерий, которые остаются интактными при достаточном уровне системного АД и общего объема кровотока. Области, наиболее удаленными от артерий поверхности мозга, являются глубокие отделы полушарий и моста мозга, что определяет возможность развития в них лакунарных инфарктов. В наших наблюдениях с множественными стенозами о возникновении инфарктов в областях смежного кровоснабжения и лакунарных инфарктов по механизму сосудистой мозговой недостаточности свидетельствовали эпизоды нестабильности АД с тенденцией к гипотонии, которые предшествовали дебюту инсультов и были связаны с приступом стенокардии, декомпенсацией хронической сердечной недостаточности при постинфарктном кардиосклерозе, а также с избыточным приемом антигипертензивных средств. Патоморфологической особенностью отмеченных инфарктов было наличие в них стенозированных артерий со склеротическими изменениями стенок, что может быть расценено как адаптивная реакция в ответ на редуцированный кровоток, обусловленный атеростенозом проксимально расположенных крупных артерий. Наличие особенностей патогенеза и отчетливых дифференциально-диагностических признаков инсультов, возникающих по механизму сосудистой мозговой недостаточности, позволило выделить их в отдельный «гемодинамический» подтип в классификации, разработанной в Научном центре неврологии [11, 28].

Актуальность углубленной дифференциальной диагностики патогенетических вариантов инсульта отражена и в других классификациях инсульта. В одной из них в рамках подтипа «атеросклероз крупной артерии» особым образом выделяют инсульты, не только возникающие по механизму сосудистой мозговой недостаточности, но и обусловленные атеростенозом или атеротромбозом артерии поверхности мозга с развитием окклюзии пенетрирующего сосуда в области его отхождения, а также аорто- и артерио-артериальной эмболией [14]. Эти обособленные патогенетические варианты инсульта рассмотрены в некоторых клинических исследованиях последних лет, посвященных дальнейшей разработке целенаправленных методов лечения и профилактики ишемических нарушений мозгового кровообращения, оправданной с позиции современной персонализированной медицины [29, 30].

ВЫВОДЫ

Исследование продемонстрировало многообразие патогенеза ишемических изменений мозга в случаях сочетания атеросклероза церебральных артерий, ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии и, вместе с тем, возможность эффективной клинической

диагностики ведущих патогенетических подтипов ишемического инсульта на основании критериев, отмеченных в последней версии классификации TOAST. Высокая информативность имеющихся в настоящее время методов исследования позволяет, по нашему мнению, более дифференцированно подходить к установлению причины ишемического инсульта, что в полной мере отвечает персонализированной направленности современной медицины. Такого подхода требует подтип «атеросклероз крупной артерии», к которому относятся инсульты, обусловленные различными изменениями одной церебральной артерии — критическим атеростенозом, атеротромботической окклюзией и артерио-артериальной эмболией, а также инсульты, возникающие по механизму сосудистой мозговой недостаточности. Последние заслуживают особого внимания, так как их патогенетическую обособленность определяет триада специфических признаков: корковые и корково-подкорковые инфаркты в зонах смежного кровоснабжения или лакунарные инфаркты в глубоких отделах полушарий или моста мозга; множественные атеростенозы (включая контрлатеральные), максимальная степень выраженности которых может не превышать 50%; экстрацеребральные факторы редукции мозгового кровотока, предшествующие инсульту.

Литература

- Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. GBD 2016 Stroke Collaborators. *Lancet Neurol.* 2019; 18 (5): 439–58.
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics — 2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016; 133 (4): 38–360.
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993; 24 (1): 35–41.
- Скворцова В. И., Губский Л. В., Стаховская Л. В., Шамалов Н. А., Мешкова К. С. Сосудистые заболевания головного мозга. В книге: Гусева Е. И., Коновалова А. Н., Скворцовой В. И., Гехт А. Б., главные редакторы. Неврология. Национальное руководство. М. ГЭОТАР-Медиа, 2009; с. 592–656.
- Adams HP, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. *Stroke.* 2015; 46 (5): 114–17.
- Nam HS, Kim HC, Kim YD, Lee HS, Kim J, Lee DH, et al. Long-term mortality in patients with stroke of undetermined etiology. *Stroke.* 2012; 43 (11): 2948–56.
- Timsit S, Bailly P, Nowak E, Merrien FM, Herve D, Viakhireva-Dovganyuk I, et al. Cryptogenic mechanism in ischaemic stroke patients is a predictor of 5-year survival: A population-based study. *European Stroke Journal.* 2016; 1 (4): 279–87.
- Ay H, Furie K, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2005; 58 (5): 688–97.
- Radu RA, Terecoasa EO, Bajenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clin Neurol Neurosurg.* 2017; 159: 93–106.
- Touboul PJ, Elbaz A, Koller C, Lucas C, Adrai V, Chedru F et al. Common carotid artery intima-media thickness and brain infarction: the Etude du Profil Génétique de l'Infarctus Cérébral (GENIC) case-control study. The GENIC Investigators. *Circulation.* 2000; 102 (3): 313–18.
- Пирадов М. А., Танашян М. М., Максимова М. Ю., редакторы. Инсульт: современные технологии диагностики и лечения. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2018; 360 с.
- Ay H, Benner T, Arsava EM, Furie KL, Singhal AB, Jensen MB, et al. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke.* 2007; 38 (11): 2979–84.
- Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009; 27 (5): 502–8.
- Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang DZ. Chinese ischemic stroke subclassification. *Front Neurol.* 2011; 2: 1–5.
- Bogatzki C, Wannarong T, McLeod AI, Heisel M, Hackam D, Spence JD. SPARKLE (Subtypes of Ischaemic Stroke Classification System), incorporating measurement of carotid plaque burden: a new validated tool for the classification of ischemic stroke subtypes. *Neuroepidemiology.* 2014; 42 (4): 243–51.
- Fisher CM. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology.* 1982; 32 (8): 871–6.
- Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: a neglected, understudied, and underused concept. *Neurology.* 1989; 39 (9): 1246–50.
- Kamel H, Healey JS. Cardioembolic stroke. *Circ Res.* 2017; 120 (3): 514–26.
- O'Carroll CB, Barrett KM. Cardioembolic stroke. *Continuum (Minneapolis).* 2017; 23 (1, Cerebrovasc Disease): 111–32.
- Brinjikji W, Rabinstein AA, Lanzino G, Murad MH, Williamson EE, DeMarco JK, et al. Ultrasound characteristics of symptomatic carotid plaques: a systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis.* 2015; 40 (3–4): 165–74.
- Longobardo L, Zito C, Carerj S, Caracciolo G, Umland M, Khandheria BK. Role of echocardiography in assessment of cardioembolic sources: a strong diagnostic resource in patients with ischemic stroke. *Curr Cardiol Rep.* 2018; 20 (12): 136.
- Yong JH, Thavorn K, Hoch JS, Mamdani M, Thorpe KE, Dorian P, et al. Potential cost-effectiveness of ambulatory cardiac rhythm monitoring after cryptogenic stroke. *Stroke.* 2016; 47 (9): 2380–5.
- Baher A, Mowla A, Kodali S, Polsani VR, Nabi F, Nagueh SF, et al. Cardiac MRI improves identification of etiology of acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2014; 37 (4): 277–284.

24. Lin MP, Liebeskind DS. Imaging of ischemic stroke. *Continuum (Minneapolis)*. 2016; 22 (5, Neuroimaging): 1399–423.
25. Staals J, Makin SD, Doubal FN, Dennis MS, Wardlaw JM. Stroke subtype, vascular risk factors, and total MRI brain small vessel disease burden. *Neurology*. 2014; 83 (14): 1228–34.
26. Kerwin WS, Miller Z, Yuan C. Imaging of the high-risk carotid plaque: magnetic resonance imaging. *Semin Vasc Surg*. 2017; 30 (1): 54–61.
27. Ma SJ, Sarabi MS, Yan L, Shao X, Chen Y, Yang Q, et al. Characterization of lenticulostriate arteries with high resolution black-blood T1-weighted turbo spin echo with variable flip angles

at 3 and 7 Tesla. *Neuroimage*. 2019; 199: 184–93.

28. Суслина З. А., Гулевская Т. С., Максимова М. Ю., Моргунов В. А. Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика. М.: МЕДпресс-информ, 2016; 536 с.
29. Feng X, Chan KL, Lan L, Abrigo J, Liu J, Fang H, et al. Stroke mechanisms in symptomatic intracranial atherosclerotic disease: classification and clinical implications. *Stroke*. 2019; 50 (10): 2692–9.
30. Wong KS, Caplan LR, Kim JS. Stroke mechanisms. *Front Neurol Neurosci*. 2016; 40: 58–71.

References

1. Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. GBD 2016 Stroke Collaborators. *Lancet Neurol*. 2019; 18 (5): 439–58.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics — 2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 133 (4): 38–360.
3. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24 (1): 35–41.
4. Skvortsova VI, Gubskij LV, Stahovskaja LV, Shamalov NA, Meshkova KS. Sosudistye zabolevanija golovnog mozga. V knige: Guseva EI, Konovalova AN, Skvortsovoj VI, Geht AB, glavnye redaktory. *Nevrologija. Nacional'noe rukovodstvo*. M. GJeOTAR-Media, 2009; p. 592–656. Russian.
5. Adams HP, Biller J. Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. *Stroke*. 2015; 46 (5): 114–17.
6. Nam HS, Kim HC, Kim YD, Lee HS, Kim J, Lee DH, et al. Long-term mortality in patients with stroke of undetermined etiology. *Stroke*. 2012; 43 (11): 2948–56.
7. Timsit S, Bailly P, Nowak E, Merrien FM, Herve D, Viakhireva-Dovganyuk I, et al. Cryptogenic mechanism in ischaemic stroke patients is a predictor of 5-year survival: A population-based study. *European Stroke Journal*. 2016; 1 (4): 279–87.
8. Ay H, Furie K, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2005; 58 (5): 688–97.
9. Radu RA, Terecoasa EO, Bajenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clin Neurol Neurosurg*. 2017; 159: 93–106.
10. Touboul PJ, Elbaz A, Koller C, Lucas C, Adrai V, Chedru F et al. Common carotid artery intima-media thickness and brain infarction: the Etude du Profil Génétique de l'Infarctus Cérébral (GENIC) case-control study. The GENIC Investigators. *Circulation*. 2000; 102 (3): 313–18.
11. Piradov MA, Tanashjan MM, Maksimova MJu, redaktory. *Insul't: sovremennye tehnologii diagnostiki i lechenija*. 3-e izd. M.: MEDpress-inform, 2018; 360 p. Russian.
12. Ay H, Benner T, Arsava EM, Furie KL, Singhal AB, Jensen MB, et al. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke*. 2007; 38 (11): 2979–84.
13. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 27 (5): 502–8.
14. Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang DZ. Chinese ischemic stroke subclassification. *Front Neurol*. 2011; 2: 1–5.
15. Bogiatzi C, Wannarong T, McLeod AI, Heisel M, Hackam D, Spence JD. SPARKLE (Subtypes of Ischaemic Stroke Classification System), incorporating measurement of carotid plaque burden: a new validated tool for the classification of ischemic stroke subtypes. *Neuroepidemiology*. 2014; 42 (4): 243–51.
16. Fisher CM. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology*. 1982; 32 (8): 871–6.
17. Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: a neglected, understudied, and underused concept. *Neurology*. 1989; 39 (9): 1246–50.
18. Kamel H, Healey JS. Cardioembolic stroke. *Circ Res*. 2017; 120 (3): 514–26.
19. O'Carroll CB, Barrett KM. Cardioembolic stroke. *Continuum (Minneapolis)*. 2017; 23 (1, Cerebrovasc Disease): 111–32.
20. Brinjikji W, Rabinstein AA, Lanzino G, Murad MH, Williamson EE, DeMarco JK, et al. Ultrasound characteristics of symptomatic carotid plaques: a systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis*. 2015; 40 (3–4): 165–74.
21. Longobardo L, Zito C, Carerj S, Caracciolo G, Umland M, Khandheria BK. Role of echocardiography in assessment of cardioembolic sources: a strong diagnostic resource in patients with ischemic stroke. *Curr Cardiol Rep*. 2018; 20 (12): 136.
22. Yong JH, Thavorn K, Hoch JS, Mamdani M, Thorpe KE, Dorian P, et al. Potential cost-effectiveness of ambulatory cardiac rhythm monitoring after cryptogenic stroke. *Stroke*. 2016; 47 (9): 2380–5.
23. Bahar A, Mowla A, Kodali S, Polsani VR, Nabi F, Nagueh SF, et al. Cardiac MRI improves identification of etiology of acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2014; 37 (4): 277–284.
24. Lin MP, Liebeskind DS. Imaging of ischemic stroke. *Continuum (Minneapolis)*. 2016; 22 (5, Neuroimaging): 1399–423.
25. Staals J, Makin SD, Doubal FN, Dennis MS, Wardlaw JM. Stroke subtype, vascular risk factors, and total MRI brain small vessel disease burden. *Neurology*. 2014; 83 (14): 1228–34.
26. Kerwin WS, Miller Z, Yuan C. Imaging of the high-risk carotid plaque: magnetic resonance imaging. *Semin Vasc Surg*. 2017; 30 (1): 54–61.
27. Ma SJ, Sarabi MS, Yan L, Shao X, Chen Y, Yang Q, et al. Characterization of lenticulostriate arteries with high resolution black-blood T1-weighted turbo spin echo with variable flip angles at 3 and 7 Tesla. *Neuroimage*. 2019; 199: 184–93.
28. Suslina ZA, Gulevskaja TS, Maksimova MJu, Morgunov VA. Narusheniya mozgovogo krovoobrashhenija: diagnostika, lechenie, profilaktika. M.: MEDpress-inform, 2016; 536 p. Russian.
29. Feng X, Chan KL, Lan L, Abrigo J, Liu J, Fang H, et al. Stroke mechanisms in symptomatic intracranial atherosclerotic disease: classification and clinical implications. *Stroke*. 2019; 50 (10): 2692–9.
30. Wong KS, Caplan LR, Kim JS. Stroke mechanisms. *Front Neurol Neurosci*. 2016; 40: 58–71.

ПАТТЕРНЫ АТРОФИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЛОБНО-ВИСОЧНОЙ ДЕМЕНЦИИ: ДАННЫЕ ВОКСЕЛЬ-ОРИЕНТИРОВАННОЙ МОРФОМЕТРИИ

Д. Р. Ахмадуллина¹ ✉, Р. Н. Коновалов¹, Ю. А. Шпилюкова¹, Д. А. Гришина^{2,3}, Е. С. Бердникович¹, С. С. Фоменко¹, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин¹

¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Лобно-височная деменция (ЛВД) — нейродегенеративное заболевание, вторая по частоте деменция с ранним началом, проявляющаяся речевыми и поведенческими нарушениями. Выявление паттернов атрофии важно для диагностики данной патологии. Однако визуальная оценка данных магнитно-резонансной томографии может быть недостаточно чувствительной, что требует использования объективного метода определения объема серого вещества (СВ). Целью исследования было оценить паттерн атрофии СВ у пациентов с ЛВД в сравнении с контрольной группой при помощи воксель-ориентированной морфометрии (ВОМ). В исследование включены 16 пациентов с ЛВД (12 — с аграмматическим вариантом первичной прогрессирующей афазии (авППА), три — с поведенческим вариантом ЛВД, один — с логопеническим вариантом ППА) и 10 здоровых добровольцев. При проведении ВОМ в группе ЛВД и контрольной группе выявлено три статистически значимые ($p_{FWE-corr} < 0,05$) зоны атрофии — в левой нижней лобной извилине, левой фузиформной и левой надкраевой извилинах. В связи с преобладанием в группе ЛВД пациентов с авППА дополнительно проводили ВОМ в этой группе и группе контроля, при которой был выявлен иной паттерн атрофии: уменьшение объема СВ обнаружено в левой нижней лобной и левой средней лобной извилинах ($p_{FWE-corr} < 0,05$). Полученные результаты показывают, что для ЛВД независимо от клинического варианта характерен свой определенный паттерн атрофии, захватывающий как лобно-височные отделы, так и теменную долю. На примере авППА было показано, что у каждого из вариантов заболевания локализация атрофического процесса имеет отличный от других характер.

Ключевые слова: лобно-височная деменция, воксель-ориентированная морфометрия, первичная прогрессирующая афазия, поведенческий вариант ЛВД

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (номер проекта 19-015-00533).

Вклад авторов: Д. Р. Ахмадуллина — клиническая оценка, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка рукописи; Р. Н. Коновалов — анализ и интерпретация данных, планирование и руководство исследованием; Ю. А. Шпилюкова, Д. А. Гришина — клиническая оценка, подготовка черновика рукописи; Е. С. Бердникович — клиническая оценка; С. С. Фоменко — анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка рукописи; Е. Ю. Федотова — планирование и руководство исследованием; С. Н. Иллариошкин — планирование и руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 12-7/19 от 25 декабря 2019 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Дилара Робертовна Ахмадуллина
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367; akhmadullinadr1@gmail.com

Статья получена: 21.10.2020 **Статья принята к печати:** 18.11.2020 **Опубликована онлайн:** 08.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.075

BRAIN ATROPHY PATTERNS IN PATIENTS WITH FRONTOTEMPORAL DEMENTIA: VOXEL-BASED MORPHOMETRY

Akhmadullina DR¹ ✉, Kononov RN¹, Shpilyukova YuA¹, Grishina DA^{2,3}, Berdnikovich ES¹, Fomenko SS¹, Fedotova EYu¹, Illarioshkin SN¹

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Frontotemporal dementia (FTD) is a neurodegenerative disorder characterized by language and behaviour deficits, which is considered the second most common cause of early-onset dementia. Detection of brain atrophy patterns is important for FTD diagnosis. However, the visual assessment of magnetic resonance imaging data may not be sensitive enough requiring the use of objective gray matter (GM) volume determination method. The study was aimed to assess the GM atrophy pattern in patients with FTD compared to control group patients using voxel-based morphometry (VBM). The study included 16 patients with FTD (12 patients with nonfluent agrammatic variant primary progressive aphasia (nfvPPA), three patients with behavioral variant of FTD, and one patient with logopenic variant PPA) and 10 healthy volunteers. VBM of patients with FTD and healthy controls revealed three significant ($p_{FWE-corr} < 0.05$) atrophy areas in the left inferior frontal, left fusiform, and left supramarginal gyri. Taking into account the predominance of patients with nfvPPA in the group of FTD patients, the additional VBM of this group and control group was carried out, which revealed a distinct atrophy pattern: the reduced GM volume was detected in the left inferior frontal and left middle frontal gyri ($p_{FWE-corr} < 0.05$). The results obtained indicate that regardless of the clinical variant, there is a certain atrophy pattern characteristic of FTD, which involves both frontotemporal areas and parietal lobe. The example of nfvPPA shows that each variant of the disease is associated with distinct localization of atrophy.

Keywords: frontotemporal dementia, voxel-based morphometry, primary progressive aphasia, behavioral variant frontotemporal dementia

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 19-015-00533).

Author contribution: Akhmadullina DR — clinical assessment, data analysis and interpretation, literature analysis, manuscript writing; Kononov RN — data analysis and interpretation, study planning and management; Shpilyukova YuA, Grishina DA — clinical assessment, manuscript draft preparation; Berdnikovich ES — clinical assessment; Fomenko SS — data analysis and interpretation, literature analysis, manuscript writing; Fedotova EYu — study planning and management; Illarioshkin SN — study planning and management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol № 12-7/19 dated December 25, 2019).

✉ **Correspondence should be addressed:** Dilyara R. Akhmadullina
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367; akhmadullinadr1@gmail.com

Received: 21.10.2020 **Accepted:** 18.11.2020 **Published online:** 08.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.075

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой нейродегенеративное заболевание, для которого характерны прогрессирующие нарушения поведения и/или речи. Дебютирует ЛВД, как правило, в возрасте 45–65 лет и является второй по частоте встречаемости после болезни Альцгеймера (БА) деменцией с ранним (до 65 лет) началом [1].

В соответствии с преобладающим дефицитом выделяют три основных клинических подтипа заболевания: поведенческий вариант ЛВД (пвЛВД), а также семантический и аграмматический варианты первичной прогрессирующей афазии (свППА и лвППА соответственно). Логопенический вариант ППА (лвППА) традиционно относят к атипичным формам БА, однако до 24% случаев лвППА патоморфологически могут быть отнесены к ЛВД [2]. Для пвЛВД характерно развитие постепенно нарастающих регуляторных нарушений, апатии, расторможенности, нарушений пищевого поведения, аномальной двигательной активности и эйфории. Пациенты могут совершать опасные, импульсивные поступки, теряют интерес к близким людям, возможно развитие раздражительности и нарушения сна [3]. В случае первичных прогрессирующих афазий (ППА) среди наиболее выраженных и инвалидизирующих проявлений заболевания можно назвать нарушения речи. При свППА у пациентов наблюдают потерю знаний о смысле отдельных слов и назначений предметов. Сначала эти нарушения затрагивают редко используемые понятия, но с развитием заболевания распространяются на более привычные слова и предметы. Основными симптомами лвППА являются грамматические нарушения в устной, а позже и в письменной, речи и апраксия речи. Со временем у пациентов возникают трудности понимания сложных грамматических конструкций, речь становится скудной и часто бывает представлена отдельными короткими предложениями, а позже словосочетаниями. Для лвППА наиболее характерны трудности при подборе слов, а также нарушение повторения длинных предложений, так как дефицит затрагивает рабочую фонологическую память. Вышеперечисленные проявления вариантов ЛВД могут сочетаться с двигательными нарушениями в виде болезни двигательного нейрона (БДН) или синдромов паркинсонизма (в виде кортикобазального синдрома или прогрессирующего надъядерного паралича) [4].

Помимо разнообразия клинической картины при ЛВД отмечают наличие генетической и патоморфологической гетерогенности. До 40% случаев заболевания являются семейными, и на настоящий момент известно более 20 генов, мутации в которых приводят к развитию ЛВД. При этом подавляющее большинство генетических случаев связано с мутациями в трех генах: *C9orf72*, *GRN*, *MAPT* [5]. При гистологическом анализе при ЛВД можно наблюдать патологическое накопление тау-белка, TDP-43 или белков семейства FET, в соответствии с чем выделяют три патоморфологических варианта заболевания [6].

С учетом выраженной гетерогенности ЛВД непростой задачей являются изучение и диагностика заболевания. Существующие диагностические критерии опираются на клинические проявления и данные нейровизуализации, а именно визуальную оценку атрофии головного мозга (ГМ) по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) и/или компьютерной томографии (КТ) или гипоперфузии/гипометаболизма по данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и/или однофотонной эмиссионной КТ. При этом для каждого из вариантов выделены соответствующие характерные зоны поражения — лобные доли и передняя часть височных долей с двух сторон для

пвЛВД, лобная и островковая доли с преимущественным левосторонним поражением для авППА, передние височные отделы для свППА и левая теменная доля и задние отделы области вокруг силвиевой борозды для лвППА [7, 8].

Вместе с тем за последние годы было показано, что визуальной оценки данных МРТ может быть недостаточно для выявления характерного паттерна атрофии. По данным отдельных работ, ее диагностическая точность в выявлении пвЛВД варьирует от 59 до 70% [9, 10]. Одним из способов, позволяющих повысить объективность МР-исследования, является воксель-ориентированная морфометрия (ВОМ), при которой путем повоксельного сравнения объема ГМ двух заданных групп выявляют зоны значимой атрофии серого вещества (СВ).

Использование ВОМ в изучении ЛВД помогло показать, что патогенетический процесс не ограничен лобными и височными долями и при различных вариантах может затрагивать теменные и затылочные отделы, мозжечок, островковые доли и подкорковые структуры [11–15]. Вместе с тем, с накоплением все новых данных стало ясно, что полученные результаты значительно варьируют от исследования к исследованию. Так, мета-анализ работ, посвященных ВОМ при пвЛВД, выявил значимые области атрофии в лобных и островковых долях, а также стриатуме с двух сторон, но не показал значимого поражения височных долей (признак, который входит в диагностические критерии пвЛВД), хотя его отмечали в отдельных исследованиях [16].

Более того, в некоторых работах было показано, что клиническая картина ППА может отличаться в зависимости от родного языка пациентов, следовательно, возможна и вариация паттернов атрофии ЛВД в зависимости от изучаемой популяции [17, 18]. Вместе с тем, работ по изучению особенностей атрофии при ЛВД в российской популяции до настоящего момента не проводилось.

Целью нашего исследования было выявить паттерн атрофии, характерный для пациентов с отдельными вариантами ЛВД в русской популяции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Научного центра неврологии. Критерии включения: соответствие действующим диагностическим критериям ЛВД; возраст старше 18 лет. Критерии исключения: наличие противопоказаний к проведению МРТ; тяжелое состояние, требующее поддержания жизненно важных функций аппаратным методом; наличие у пациентов структурных очаговых поражений головного мозга (опухоль, последствия нарушения мозгового кровообращения или черепно-мозговой травмы и др.). В исследование включено 16 пациентов (из них 6 мужчин и 10 женщин; средний возраст $61,2 \pm 9,4$ года), составивших группу ЛВД, и 10 здоровых добровольцев (из них 4 мужчины и 6 женщин; средний возраст $55,6 \pm 11,3$ лет). Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

В основной группе у 12 пациентов (68,75%) наблюдался авППА, у трех (18,75%) — пвЛВД и у одного (6,25%) — лвППА. В случае с лвППА была проведена люмбальная пункция с определением уровня β -амилоида, нормальные значения которого позволили исключить БА. У одного пациента с авППА были отмечены проявления БДН (фенотип ППА-БДН). Среди пациентов с авППА средний возраст составил $60,6 \pm 7,5$ лет, четверо были мужского пола.

Длительность заболевания на момент проведения исследования варьировала от 12 до 84 месяцев и в среднем составила $47,6 \pm 21,3$ месяца. Тяжесть заболевания оценивали по шкале оценки тяжести ЛВД [19]: у 3 пациентов диагностирована очень легкая, у 4 — легкая, у 7 — умеренная стадия ЛВД; кроме них в группу входило по одному пациенту с тяжелой и очень тяжелой стадиями заболевания. При оценке по батарее лобной дисфункции (БЛД) общий балл варьировал от 3 до 15, средние значения составили $9,3 \pm 3,9$ балла. Оценка по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA) была затруднительна у 8 пациентов в связи с выраженными речевыми и/или поведенческими нарушениями (апатия, неусидчивость, отказ от выполнения тестов), среди прошедших тестирование средний балл составил $22,25 \pm 6,04$. Кроме того, у каждого пациента оценивали литеральную и семантическую беглость речи, показатели которых оказались значительно снижены (в среднем, 3 и 7 слов за минуту соответственно).

Всем участникам исследования проводили МРТ головного мозга в режиме 3D-T1 MPR (multiplanar reconstruction) на томографе Magnetom Verio (Siemens; Германия) с величиной магнитной индукции 3 Тесла. Для постобработки и статистического анализа использовали пакет программ SPM12 (Statistical Parametric Mapping; Institute of Neurology, Великобритания) на базе Matlab R2019b (Mathworks; США).

Постобработка включала нормализацию полученных изображений к одному стереотаксическому MNI (Montreal Neurological Institute) пространству, сегментацию полученных изображений на СВ, белое вещество и цереброспинальную жидкость с использованием алгоритма DARTEL (Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra), а также дальнейшее сглаживание полученных изображений с изотропным гауссовым ядром с полной шириной на полувысоте 8 мм, позволяющее нивелировать индивидуальные особенности анатомии.

При помощи утилиты Easy Volumes (Institute of Neurology; Великобритания) проводили расчет объема серого вещества всего ГМ, а также объема СВ лобных, височных, теменных, затылочных, островковых долей и базальных ганглиев с двух сторон.

Визуализацию результатов BOM, вывод данных статистического анализа и определение локализации координат осуществляли с помощью программы xjView [20].

Оценка результатов BOM включала групповой анализ с использованием two-sample t-тест на уровне всего мозга с повоксельным сравнением объема серого вещества между изучаемыми группами. Порог для включения отдельных вокселей в кластеры был установлен на уровне $p < 0,0001$. В анализ были включены кластеры в сером веществе полушарий большого мозга с минимальным объемом зоны ≥ 100 вокселей и уровнем значимости $p < 0,05$ с коррекцией на множественные сравнения, контролирующей групповую вероятность ошибки первого рода (FWE, family-wise error). Анализ результатов проводили на кластерном и пиковом уровнях.

Статическую обработку данных проводили с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM; США). Анализ различий объема СВ головного мозга в двух группах осуществляли при помощи критерия Манна-Уитни (с поправкой Бонферрони). Для определения взаимосвязи между клиническими данными и атрофией СВ головного мозга был выполнен корреляционный анализ с применением коэффициента Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным проведенной BOM, у пациентов с ЛВД в сравнении с группой контроля было выявлено статистически значимое уменьшение объема СВ в левых нижней лобной, надкраевой и фузиформной извилинах (табл. 1, рис.). Наибольшая зона атрофии была отмечена в левой нижней лобной извилине (НЛИ).

Так как в выборке пациентов с ЛВД отмечалось значительное превалирование случаев авППА, был проведен дополнительный анализ этой группы. При проведении BOM значимые зоны атрофии в группе авППА в сравнении с контрольной группой выявлены в небольших участках левых средней и нижней лобных извилин (см. табл. 1).

На следующем этапе проводили расчет объема СВ всего головного мозга и отдельных его областей — лобных, височных, теменных, затылочных и островковых долей, а также базальных ядер правого и левого полушария в

Таблица 1. Зоны статистически значимого ($p_{FWE-corr} < 0,05$) уменьшения объема серого вещества по данным BOM

Локализация региона атрофии	Кластерный уровень		Пиковый уровень			MNI координаты пика зоны (x, y, z), мм
	Объем зоны в вокселях	pFWE-corr	T	Z	pFWE-corr (пиковый уровень)	
Группа ЛВД и контрольная группа						
Нижняя лобная извилина, S	8198	< 0,001	11,14	6,47	< 0,001	−36, 3, 24
			9,66	6,05	< 0,001	−44, 14, 17
Надкраевая извилина, S	350	< 0,001	7,66	5,35	0,003	−47, −41, 35
			6,57	4,88	0,021	−35, −44, 44
			6,54	4,87	0,022	−33, −39, 33
Фузиформная извилина, S	136	0,001	7,04	5,09	0,009	−54, −8, −27
			6,91	5,03	0,011	−57, −17, −23
Группа авППА и контрольная группа						
Средняя лобная извилина, S	122	< 0,001	9,24	5,63	0,002	−30, 38, 33
			7,56	5,08	0,023	−30, 47, 23
Нижняя лобная извилина, S	155	< 0,001	8,46	5,39	0,006	−50, 14, 17
			7,95	5,21	0,013	−53, 6, 15
			7,89	5,19	0,014	−56, −3, 17

Примечание: S — слева.

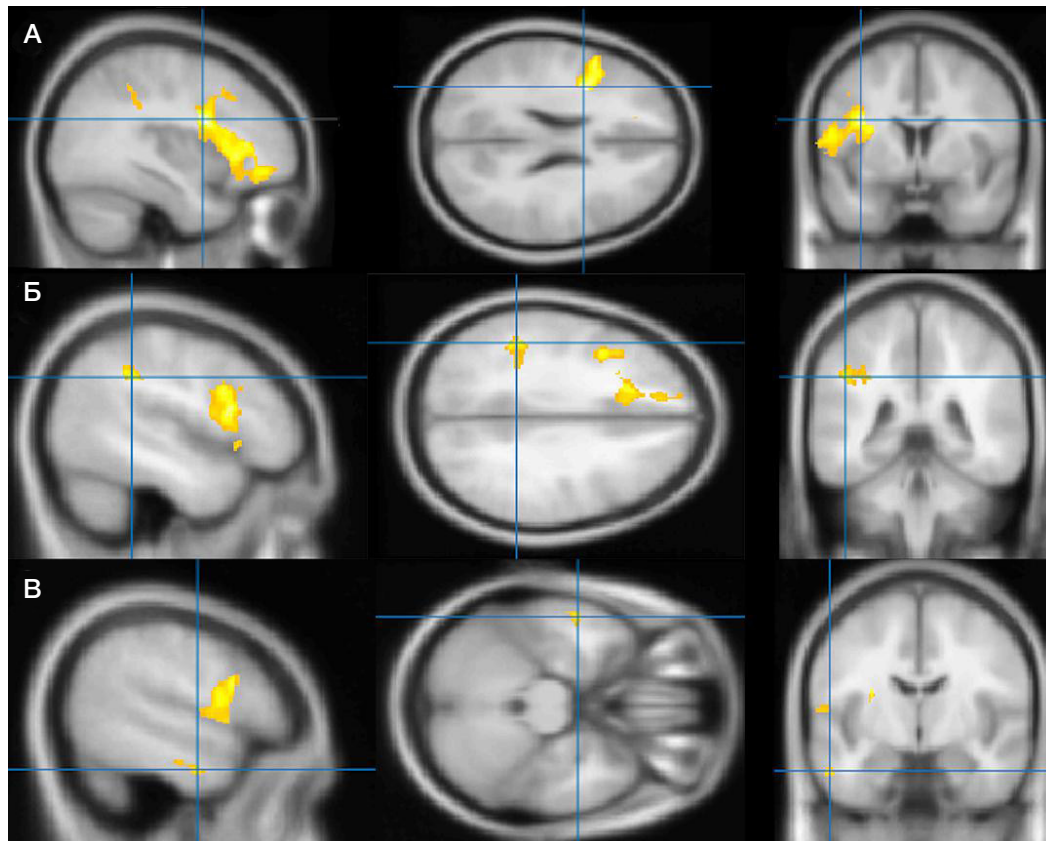


Рис. Локализация зон статистически значимого ($p_{FWE-corr} < 0,05$) уменьшения объема СВ головного мозга у пациентов с ЛВД по сравнению с контрольной группой. **А.** Левая нижняя лобная извилина. **Б.** Левая надкраевая извилина. **В.** Левая фузиформная извилина. Слева направо: сагиттальный, аксиальный и коронарный срезы

обеих группах. Исследованные группы статистически значимо ($p < 0,05$) различались по всем перечисленным областям (табл. 2).

При проведении корреляционного анализа была найдена статистически значимая отрицательная корреляционная связь между объемом серого вещества левой височной доли и продолжительностью заболевания (коэффициент Спирмена $-0,53$; $p = 0,035$). Корреляций с другими клиническими и нейропсихологическими данными (общий балл по шкалам МоСА и БЛД, семантическая и литеральная беглость речи, тяжесть заболевания) найдено не было.

Таблица 2. Объем серого вещества пациентов с ЛВД и группы контроля

Объем серого вещества	ЛВД	Контроль	Значимость различий по критерию Манна-Уитни (p)
	Медиана [LQ; UQ]	Медиана [LQ; UQ]	
Всего головного мозга	508,4 [474,8; 534,2]	656,2 [597,6; 721,0]	$< 0,001$
Лобной доли, S	33,4 [30,0; 35,4]	53,4 [47,1; 56,5]	$< 0,001$
Лобной доли, D	40,2 [35,7; 44,6]	56,6 [48,7; 59,0]	$< 0,001$
Височной доли, S	33,4 [31,1; 39,4]	50,0 [43,4; 54,8]	$< 0,001$
Височной доли, D	41,4 [35,5; 47,2]	51,9 [46,2; 57,8]	0,002
Теменной доли, S	30,3 [28,1; 35,7]	46,5 [38,5; 49,3]	$< 0,001$
Теменной доли, D	38,0 [33,6; 41,8]	49,2 [41,8; 52,9]	0,003
Затылочной доли, S	14,8 [13,4; 16,7]	20,3 [17,4; 23,4]	$< 0,001$
Затылочной доли, D	12,4 [11,0; 13,0]	15,6 [13,2; 16,4]	0,003
Островковой доли, S	5,5 [5,2; 6,0]	7,9 [7,1; 8,4]	$< 0,001$
Островковой доли, D	6,3 [5,5; 7,0]	7,9 [7,2; 8,5]	0,001
Базальных ядер, S	8,0 [7,0; 9,4]	12,1 [10,8; 12,5]	$< 0,001$
Базальных ядер, D	10,0 [7,8; 10,4]	12,0 [10,9; 12,6]	0,001

Примечание: LQ — нижний квартиль, UQ — верхний квартиль, S — слева, D — справа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что в группе ЛВД статистически значимое уменьшение объема СВ отмечалось в трех областях — нижней лобной, надкраевой и фузиформной извилинах левого полушария.

Наибольший кластер атрофии выявлен в НЛИ — области, где расположена зона Брока, играющая важную роль в регуляции работы моторно-фонологической сети и обеспечивающая правильное применение и понимание грамматически и синтаксически сложных конструкций.

Атрофия данной зоны является одним из характерных признаков авГПА и коррелирует с общей тяжестью афазии и выраженностью аграмматизмов [21, 22]. Наибольшую атрофию левой НЛИ можно объяснить преобладанием в общей группе ЛВД пациентов с данным фенотипом.

Вовлечение в патологический процесс фузиформной извилины было ранее описано при всех вариантах ГПА и пвЛВД [22, 23]. Вместе с орбитофронтальной корой, миндалевидными телами и другими височными ассоциативными зонами она образует систему восприятия, которая распознает и анализирует социально важные сигналы, получаемые от других людей (например, выражение их лиц) [24], т. е. играет роль в обеспечении социального поведения. Кроме того, показано, что атрофия фузиформных извилин при пвЛВД коррелирует с выраженностью расторможенности [25].

Надкраевая извилина участвует в работе кратковременной фонологической памяти, фонологическом анализе речи и, по-видимому, связана с зонами головного мозга, обеспечивающими моторную речевую функцию [26]. Хотя ее поражение традиционно считают одним из нейровизуализационных признаков лвГПА, в отдельных работах атрофия надкраевой извилины была также описана при аграмматическом и семантическом вариантах ГПА [7, 27, 28].

Так как у подавляющего большинства пациентов в группе ЛВД наблюдали фенотип авГПА, можно было бы предположить, что уменьшение объема СВ всех трех областей было ассоциировано с авГПА, тогда как вклад других вариантов оказался не столь значимым. Однако при проведении ВОМ группы пациентов с авГПА и контрольной группы был выявлен иной паттерн атрофии — поражение НЛИ и средней лобной извилины (СЛИ). Вовлечение НЛИ оказалось менее обширным и выраженным, нежели в общей группе ЛВД, тогда как поражение СЛИ было специфичным для этой группы. Похожий паттерн атрофии описан и ранее, например, в мета-анализе 2007 г., где у пациентов с авГПА нашли уменьшение объема оперкулярной части НЛИ, СЛИ, чечевицеобразного ядра и верхних отделов височных извилин [15], и в другой работе, где помимо двух вышеописанных зон было найдено поражение левой прецентральной извилины [29]. Уменьшение объема зоны атрофии НЛИ и ее выраженности может быть связано с тем, что при схожей средней продолжительности заболевания на момент проведения исследования (47,5 месяцев в группе авГПА и 48 — среди других пациентов), у пациентов с пвЛВД и лвГПА, в среднем, отмечали более тяжелую стадию заболевания (средние значения логит-показателя шкалы оценки тяжести ЛВД составили 2,63 в группе авГПА и –0,04 среди других пациентов).

Таким образом, выявленная при анализе всей группы атрофия левых фузиформной и надкраевой извилин не может быть объяснена смещением выборки в сторону авГПА и, по-видимому, является результатом поражения этих зон при всех исследуемых вариантах.

При исследовании корреляций клинических и нейropsychологических данных с объемом отдельных долей и подкорковых структур в нашей работе была выявлена только одна умеренная статистически значимая отрицательная корреляционная связь между объемом левой височной доли и продолжительностью заболевания. Вовлечение именно области левой височной доли может быть объяснено поражением левой фузиформной извилины. Однако с учетом преобладания случаев авГПА и выявления наиболее обширной и выраженной атрофии в НЛИ можно было ожидать наличие корреляций между объемом левой лобной извилины с тяжестью заболевания и нарушением беглости речи, что было описано в других работах. Отсутствие подобной связи может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, при проведении анализа учитывали объем не отдельных извилин, а всех долей полностью. Во-вторых, тяжесть заболевания оценивали по шкале оценки тяжести ЛВД (опросника, который включает в себя все разнообразие симптомов заболевания), тогда как с учетом превалирования случаев ГПА правомерной была бы дополнительная оценка состояния при помощи шкал оценки тяжести афазии. Отсутствие корреляций по баллам БЛД и МоСА также может быть связано с тем, что они больше направлены на выявление нарушений регуляторных функций, характерных для пвЛВД, нежели для выявления нарушений речи.

Следует учесть, что в нашей работе было несколько ограничений: небольшой объем выборки, неравномерное распределение в группе пациентов с разными вариантами ЛВД и отсутствие пациентов с свГПА. В связи с малым количеством пациентов с пвЛВД и лвГПА в нашей работе не проводилось сравнения отдельных вариантов заболевания (авГПА, пвЛВД, лвГПА) между собой, что не позволяет сделать однозначное заключение об отличии паттерна атрофии при авГПА от других вариантов ЛВД. Эти ограничения необходимо учитывать при планировании дальнейших исследований в данной области.

ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании с использованием ВОМ выявлено, что среди пациентов с ЛВД в сравнении с контрольной группой отмечается поражение левых нижней лобной, фузиформной и надкраевой извилин. Для авГПА характерен ограниченный паттерн атрофии, включающий левые СЛИ и НЛИ. Полученные результаты соответствуют представлениям о функциональной анатомии речевых функций и социального поведения. Результаты исследования частично согласуются с предыдущими исследованиями, проведенными в других странах, хотя в них, как правило, отмечалось более обширное вовлечение серого вещества головного мозга с поражением большего числа областей. Требуется дальнейшее изучение нейровизуализационных характеристик ЛВД на большей выборке пациентов для подтверждения полученных результатов.

Литература

1. Finger EC. Frontotemporal Dementias. Continuum. 2016; 22: 464–89.
2. Bergeron D, Gorno-Tempini ML, Rabinovici GD, Santos-Santos MA, Seeley W, Miller BL, et al. Prevalence of amyloid- β pathology in distinct variants of primary progressive aphasia. Ann Neurol. 2018; 84 (5): 729–40.
3. Гришина Д. А., Яхно Н. Н., Захаров В. В. Эмоциональные, аффективные и поведенческие нарушения при поведенческой форме лобно-височной деменции. Журнал неврологии и психиатрии им С. С. Корсакова. 2017; 117 (11): 13.
4. Olney NT, Spina S, Miller BL. Frontotemporal Dementia. Neurol

- Clin. 2017; 35 (2): 339–74.
5. Шпилюкова Ю. А., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С. Н. Генетическое разнообразие лобно-височной деменции. Молекулярная биология. 2020; 54 (1): 17–28.
6. Mackenzie IRA, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem*. 2016; 54–70.
7. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011; 76 (11): 1006–14.
8. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011 Sep; 134 (9): 2456–77.
9. Vijverberg EGB, Wattjes MP, Dols A, Krudop WA, Möller C, Peters A, et al. Diagnostic Accuracy of MRI and Additional [18F]FDG-PET for Behavioral Variant Frontotemporal Dementia in Patients with Late Onset Behavioral Changes. *J Alzheimer's Dis*. 2016; 53 (4): 1287–97.
10. Harper L, Fumagalli GG, Barkhof F, Scheltens P, O'Brien JT, Bouwman F, et al. MRI visual rating scales in the diagnosis of dementia: Evaluation in 184 post-mortem confirmed cases. *Brain*. 2016; 139 (4): 1211–25.
11. Pan PL, Song W, Yang J, Huang R, Chen K, Gong QY, et al. Gray Matter Atrophy in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012; 33 (2–3): 141–8.
12. Rohrer JD, Ridgway GR, Modat M, Ourselin S, Mead S, Fox NC, et al. Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations. *Neuroimage*. 2010; 53 (3): 1070–6.
13. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain*. 2012; 135 (3): 736–50.
14. Josephs KA, Whitwell JL, Parisi JE, Petersen RC, Boeve BF, Jack CR, et al. Caudate atrophy on MRI is a characteristic feature of FTLDD-FUS. *Eur J Neurol*. 2010; 17 (7): 969–75.
15. Schroeter ML, Raczka K, Neumann J, Yves von Cramon D. Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations — A meta-analysis involving 267 subjects. *Neuroimage*. 2007 Jul; 36 (3): 497–510.
16. Seeley WW. Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2019 Feb; 25 (1): 76–100.
17. Folegatti A, Pia L, Berti A, Cubelli R. Stress assignment errors in surface dyslexia: Evidence from two Italian patients with a selective deficit of the orthographic input lexicon. *Behav Neurol*. 2015; 2015: 1–8.
18. Canu E, Agosta F, Battistella G, Spinelli EG, DeLeon J, Welch AE, et al. Speech production differences in English and Italian speakers with nonfluent variant PPA. *Neurology*. 2020; 94 (10): e1062–72.
19. Шпилюкова Ю. А., Юсупова Д. Г., Ахмадуллина Д. Р., Полежаева Н. В., Наминов А. В., Синельников М. В. и соавт. Шкала оценки тяжести лобно-височной деменции (Frontotemporal dementia rating scale — FTD-FRS): лингвокультурная адаптация в России. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020; 14 (2): 82–7.
20. xjView. Version 9.6 [software]. Available from: <http://www.alivelearn.net/xjview>.
21. Tetzloff KA, Utianski RL, Duffy JR, Clark HM, Strand EA, Josephs KA, et al. Quantitative analysis of agrammatism in agrammatic primary progressive aphasia and dominant apraxia of speech. *J Speech, Lang Hear Res*. 2018; 61 (9): 2337–46.
22. Whitwell JL, Duffy JR, Strand EA, Xia R, Mandrekar J, Machulda MM, et al. Distinct regional anatomic and functional correlates of neurodegenerative apraxia of speech and aphasia: An MRI and FDG-PET study. *Brain Lang*. 2013; 125 (3): 245–52.
23. Brambati SM, Amici S, Racine CA, Neuhaus J, Miller Z, Ogar J, et al. Longitudinal gray matter contraction in three variants of primary progressive aphasia: A tensor-based morphometry study. *NeuroImage Clin*. 2015; 8: 345–55.
24. Bickart KC, Brickhouse M, Negreira A, Sapolsky D, Barrett LF, Dickerson BC. Atrophy in distinct corticolimbic networks in frontotemporal dementia relates to social impairments measured using the social impairment rating scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85 (4): 438–48.
25. Sheelakumari R, Bineesh C, Varghese T, Kesavadas C, Verghese J, Mathuranath PS. Neuroanatomical correlates of apathy and disinhibition in behavioural variant frontotemporal dementia. *Brain Imaging Behav*. 2020 Oct; 14 (5): 2004–11.
26. Oberhuber M, Hope TMH, Seghier ML, Parker Jones O, Prejawa S, Green DW, et al. Four Functionally Distinct Regions in the Left Supramarginal Gyrus Support Word Processing. *Cereb Cortex*. 2016; 26 (11): 4212–26.
27. Preiß D, Billette OV, Schneider A, Spotorno N, Nestor PJ. The atrophy pattern in Alzheimer-related PPA is more widespread than that of the frontotemporal lobar degeneration associated variants. *NeuroImage Clin*. 2019; 24: 101994.
28. Bisenius S, Neumann J, Schroeter ML. Validating new diagnostic imaging criteria for primary progressive aphasia via anatomical likelihood estimation meta-analyses. *Eur J Neurol*. 2016; 23 (4): 704–12.
29. Ballard KJ, Savage S, Leyton CE, Vogel AP, Hornberger M, Hodges JR. Logopenic and Nonfluent Variants of Primary Progressive Aphasia Are Differentiated by Acoustic Measures of Speech Production. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e89864.

References

1. Finger EC. Frontotemporal Dementias. *Continuum*. 2016; 22: 464–89.
2. Bergeron D, Gorno-Tempini ML, Rabinovici GD, Santos-Santos MA, Seeley W, Miller BL, et al. Prevalence of amyloid- β pathology in distinct variants of primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2018; 84 (5): 729–40.
3. Grishina DA, Yakhno NN, Zakharov VV. Emotional, affective and behavioral disorders in a behavioral variant of frontotemporal dementia. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017; 117 (11): 13.
4. Olney NT, Spina S, Miller BL. Frontotemporal Dementia. *Neurol Clin*. 2017; 35 (2): 339–74.
5. Shpiilyukova YuA, Fedotova EYu, Illarioshkin SN. Genetic diversity of frontotemporal dementia. *Molecular Biology*. 2020; 54 (1): 17–28.
6. Mackenzie IRA, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem*. 2016; 54–70.
7. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011; 76 (11): 1006–14.
8. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*. 2011 Sep; 134 (9): 2456–77.
9. Vijverberg EGB, Wattjes MP, Dols A, Krudop WA, Möller C, Peters A, et al. Diagnostic Accuracy of MRI and Additional [18F]FDG-PET for Behavioral Variant Frontotemporal Dementia in Patients with Late Onset Behavioral Changes. *J Alzheimer's Dis*. 2016; 53 (4): 1287–97.
10. Harper L, Fumagalli GG, Barkhof F, Scheltens P, O'Brien JT, Bouwman F, et al. MRI visual rating scales in the diagnosis of dementia: Evaluation in 184 post-mortem confirmed cases. *Brain*. 2016; 139 (4): 1211–25.
11. Pan PL, Song W, Yang J, Huang R, Chen K, Gong QY, et al. Gray Matter Atrophy in Behavioral Variant Frontotemporal Dementia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2012; 33 (2–3): 141–8.
12. Rohrer JD, Ridgway GR, Modat M, Ourselin S, Mead S, Fox NC, et al. Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations. *Neuroimage*. 2010; 53 (3): 1070–6.

13. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain*. 2012; 135 (3): 736–50.
14. Josephs KA, Whitwell JL, Parisi JE, Petersen RC, Boeve BF, Jack CR, et al. Caudate atrophy on MRI is a characteristic feature of FTL-D-FUS. *Eur J Neurol*. 2010; 17 (7): 969–75.
15. Schroeter ML, Raczka K, Neumann J, Yves von Cramon D. Towards a nosology for frontotemporal lobar degenerations — A meta-analysis involving 267 subjects. *Neuroimage*. 2007 Jul; 36 (3): 497–510.
16. Seeley WW. Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2019 Feb; 25 (1): 76–100.
17. Folegatti A, Pia L, Berti A, Cubelli R. Stress assignment errors in surface dyslexia: Evidence from two Italian patients with a selective deficit of the orthographic input lexicon. *Behav Neurol*. 2015; 2015: 1–8.
18. Canu E, Agosta F, Battistella G, Spinelli EG, DeLeon J, Welch AE, et al. Speech production differences in English and Italian speakers with nonfluent variant PPA. *Neurology*. 2020; 94 (10): e1062–72.
19. Shpilyukova YuA, Yusupova DG, Akhmadullina DR, Polekhina NV, Naminov AV, Sinelnikov ME, et al. Frontotemporal dementia rating scale (FTD-FRS): linguistic and cultural adaptation in Russia. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2020; 14 (2): 82–7.
20. xjView. Version 9.6 [software]. Available from: <http://www.alivelearn.net/xjview>.
21. Tetzloff KA, Utianski RL, Duffy JR, Clark HM, Strand EA, Josephs KA, et al. Quantitative analysis of agrammatism in agrammatic primary progressive aphasia and dominant apraxia of speech. *J Speech, Lang Hear Res*. 2018; 61 (9): 2337–46.
22. Whitwell JL, Duffy JR, Strand EA, Xia R, Mandrekar J, Machulda MM, et al. Distinct regional anatomic and functional correlates of neurodegenerative apraxia of speech and aphasia: An MRI and FDG-PET study. *Brain Lang*. 2013; 125 (3): 245–52.
23. Brambati SM, Amici S, Racine CA, Neuhaus J, Miller Z, Ogar J, et al. Longitudinal gray matter contraction in three variants of primary progressive aphasia: A tensor-based morphometry study. *NeuroImage Clin*. 2015; 8: 345–55.
24. Bickart KC, Brickhouse M, Negreira A, Sapolsky D, Barrett LF, Dickerson BC. Atrophy in distinct corticolimbic networks in frontotemporal dementia relates to social impairments measured using the social impairment rating scale. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85 (4): 438–48.
25. Sheelakumari R, Bineesh C, Varghese T, Kesavadas C, Verghese J, Mathuranath PS. Neuroanatomical correlates of apathy and disinhibition in behavioural variant frontotemporal dementia. *Brain Imaging Behav*. 2020 Oct; 14 (5): 2004–11.
26. Oberhuber M, Hope TMH, Seghier ML, Parker Jones O, Prejawa S, Green DW, et al. Four Functionally Distinct Regions in the Left Supramarginal Gyrus Support Word Processing. *Cereb Cortex*. 2016; 26 (11): 4212–26.
27. Preiß D, Billette OV, Schneider A, Spotorno N, Nestor PJ. The atrophy pattern in Alzheimer-related PPA is more widespread than that of the frontotemporal lobar degeneration associated variants. *NeuroImage Clin*. 2019; 24: 101994.
28. Bisenius S, Neumann J, Schroeter ML. Validating new diagnostic imaging criteria for primary progressive aphasia via anatomical likelihood estimation meta-analyses. *Eur J Neurol*. 2016; 23 (4): 704–12.
29. Ballard KJ, Savage S, Leyton CE, Vogel AP, Hornberger M, Hodges JR. Logopenic and Nonfluent Variants of Primary Progressive Aphasia Are Differentiated by Acoustic Measures of Speech Production. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e89864.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ КОГНИТИВНОЙ НАГРУЗКЕ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА

В. Ф. Фокин ✉, А. А. Шабалина, Н. В. Пономарева, Р. Б. Медведев, О. В. Лагода, М. М. Танашян

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Нейроиммунное взаимодействие — один из наиболее активных механизмов влияния на когнитивные функции при хронической ишемии мозга (ХИМ). Целью работы было исследовать динамику провоспалительных интерлейкинов в слюне IL1 β и IL6, а также противовоспалительного интерлейкина IL10 до и после выполнения когнитивных тестов больными ХИМ (средний возраст 65,4 \pm 9,1 года). После выполнения когнитивных тестов содержание IL1 β и IL6 в слюне достоверно увеличилось, соответственно на 101,6 \pm 19,1 пг/мл (n = 74) и 32,8 \pm 6,1 пг/мл (n = 74). С помощью методов дисперсионного анализа (ANOVA) и непараметрической статистики показана сопряженность изменчивости интерлейкинов с успешностью выполнения когнитивных заданий. Так, в группе со значительным приращением IL1 β наблюдалось снижение ряда когнитивных показателей по сравнению с группой с более низкой или отрицательной изменчивостью IL1 β : большее число ошибок в тесте вычитания (F = 11,5; n = 63; p = 0,001) и более низкие показатели в тесте Лурия (F = 6,8; n = 65; p = 0,01). Коэффициент ранговой корреляции IL6 с количеством ошибок в тесте вычитания был положительным и достоверно отличался от нуля (R = 0,26; n = 62; p = 0,042). В группе с положительным ростом IL10 наблюдалось более успешное выполнение корректурного теста (F = 5,2; n = 67; p = 0,03), а также меньшее число ошибок в тесте вычитания (F = 6,8; n = 63; p = 0,01), по сравнению с группой больных с отрицательной изменчивостью IL10. Успешность выполнения ряда других когнитивных тестов не была связана с изменчивостью интерлейкинов. Обсуждены возможные механизмы влияния интерлейкинов на когнитивные функции больных ХИМ и практическое использование полученных данных.

Ключевые слова: нейроиммунное взаимодействие, хроническая ишемия мозга, интерлейкины, IL1 β , IL6, IL10, когнитивные функции.

Вклад авторов: В. Ф. Фокин — анализ данных, написание статьи; А. А. Шабалина — биохимический анализ цитокинов, участие в написании статьи; Н. В. Пономарева — сбор и анализ психометрических данных, участие в написании статьи; Р. Б. Медведев — клинические обследования, анализ литературы, дизайн исследования; О. В. Лагода — анализ клинических данных, дизайн исследования; М. М. Танашян — дизайн исследования, обобщение клинического материала в контексте полученных результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 11/14 от 19 ноября 2014 г.); все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Виталий Федорович Фокин
Волоколамское ш., д. 80, г. Москва, 125367; vfv@mail.ru

Статья получена: 06.11.2020 **Статья принята к печати:** 17.12.2020 **Опубликована онлайн:** 28.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.085

INTERLEUKIN DYNAMICS DURING COGNITIVE STRESS IN PATIENTS WITH CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA

Fokin VF ✉, Shabalina AA, Ponomareva NV, Medvedev RB, Lagoda OV, Tanashyan MM

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Neuroimmune interactions represent a highly dynamic mechanism for the regulation of cognitive function in chronic cerebral ischemia (CCI). The aim of this study was to investigate changes in salivary proinflammatory cytokines IL1 β and IL6 and anti-inflammatory IL10 in patients with CCI (mean age 65.4 \pm 9.1 years) before and after cognitive tests. After cognitive tests, the levels of salivary IL1 β and IL6 were significantly elevated by 101.6 \pm 19.1 pg/ml (n = 74) and 32.8 \pm 6.1 pg/ml (n = 74), respectively. Using one-way ANOVA and non-parametric statistical methods, we were able to demonstrate associations between changes in salivary interleukins and cognitive performance. In the group of patients with a significant increase in IL1 β , some cognitive parameters were lower than in the group with negative or zero dynamics of this cytokine: the patients made more mistakes in the subtraction test (F = 11.5; n = 63; p = 0.001) and performed worse in the Luria test (F = 6.8; n = 65; p = 0.01). For IL6, Spearman's rank correlation coefficient for the number of mistakes in the subtraction test was positive and differed significantly from 0 (R = 0.26; n = 62; p = 0.042). The group with positive IL10 dynamics performed better in N-back test (F = 5.2; n = 67; p = 0.03) and made fewer mistakes in the subtraction test (F = 6.8; n = 63; p = 0.01) in comparison with patients who demonstrated negative IL10 dynamics. Good performance in other cognitive tests was not correlated with interleukin dynamics. The article also discusses possible mechanisms underlying interleukin effects on cognitive function in patients with CCI and applications of the obtained data.

Keywords: neuroimmune interactions, vascular encephalopathy, interleukins, IL1 β , IL6, IL10, cognitive function

Author contribution: Fokin VF performed data analysis and wrote the manuscript; Shabalina AA performed biochemical analysis of cytokines and participated in writing the manuscript; Ponomareva NV collected and analyzed psychometric data, participated in writing the manuscript; Medvedev RB performed clinical examinations, analyzed the literature and proposed the study design; Lagoda OV analyzed clinical data and proposed the study design; Tanashyan MM proposed the study design, summarized clinical data in the context of the obtained results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (Protocol No. 11/14 dated November 19, 2014); all study participants signed informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vitaly F. Fokin
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; vfv@mail.ru

Received: 06.11.2020 **Accepted:** 17.12.2020 **Published online:** 28.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.085

Ведущим направлением исследований в области неврологии является анализ молекулярных механизмов неврологических заболеваний, связанных с нарушением когнитивных функций [1]. При сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях основной проблемой остается

прогрессирующее когнитивное снижение вплоть до деменций. Большинство из этих заболеваний возрастозависимы. При так называемом нормальном старении можно также наблюдать ряд ишемических и атрофических изменений, которые по сравнению с более молодым возрастом

можно рассматривать как патологические, тем более что в этом случае тоже происходит когнитивное снижение. Сосудистые заболевания и процесс старения сопровождается воспалением, развивающееся при активном участии иммунных процессов. Нейроиммунное взаимодействие является значимой частью патогенетического механизма, от которой во многом зависит как течение болезни, так и состояние психических функций [2–8].

Поиск закономерных изменений содержания воспалительных интерлейкинов (IL) в слюне (IL1 β , IL6 и IL10) под влиянием когнитивной нагрузки актуален для современной нейроиммунологии. Хроническая ишемия мозга (ХИМ) является патологической формой сосудистого старения, прогрессирующей развивающейся хронической сосудистой недостаточности, сопровождающейся общемозговой симптоматикой, а также когнитивным снижением, вызванным лакунарными инфарктами в коре и подкорковой области. Ишемические процессы сопровождается воспалением с образованием активных форм кислорода, активацией микроглии и других глияльных клеток, запуская выработку цитокинов, включая воспалительные интерлейкины [9, 10].

Провоспалительный интерлейкин IL1 β , связанный с воспалительными и иммунными процессами, обладает межсистемным действием, изменяя активность нервной, иммунной и гормональной систем. IL1 β и рецепторы к нему найдены, в том числе, и в мозге, особенно их много в гиппокампе. Имеются обоснованные предположения, что IL1 β востребован в процессах гиппокампальной модуляции пластичности и памяти [4]. В большинстве работ обнаружено, что рост IL1 β отрицательно влияет на когнитивные функции. Существует также относительно меньшее число работ, показывающих отсутствие или даже положительное влияние IL1 β на обучение и память. В физиологических концентрациях IL1 β способствует посттетанической потенциации, но при более высоких концентрациях может ингибировать этот процесс и ухудшать обучение и память. Более того, такие цитокины, как IL1 β , IL6 и др., активируются в головном мозге после индукции длительной потенциации [5]. Центральное введение IL1 β крысам оказывало влияние на процессы воспаления и на условно-рефлекторные свойства памяти; этот когнитивный эффект коррелировал с уровнем глюкокортикоидов [6]. Кроме того, IL1 β взаимодействует с вегетативной нервной системой [7], которая может быть посредником в его влиянии на когнитивные процессы.

Интерлейкин 6 (IL6) — один из главных медиаторов острой фазы воспаления. Нейроны, астроциты, микроглия и эндотелиальные клетки служат источниками IL6 в ЦНС. Этот медиатор играет решающую роль в патогенезе воспалительных заболеваний и в физиологическом гомеостазе нервной ткани [8].

В последнее время стали появляться работы, указывающие на влияние IL6 на когнитивные функции. В ряде исследований применяли дисперсионный анализ для выделения факторов, влияющих на уровень IL6. Возраст, артериальная гипертензия, диабет, курение, умеренное употребление алкоголя, общий гомоцистеин, толщина интимы сонной артерии и индекс массы тела были положительно связаны с уровнями IL6. В модели многомерной линейной регрессии IL6 был отрицательно связан с оценкой шкалы Mini mental state examination с поправкой на социально-демографические и сосудистые факторы риска. В отношении IL6 известно, что его могут продуцировать клетки мозга, включая нейроны при их

деполяризации [11]. Вероятно, такой процесс может активироваться при когнитивной нагрузке.

Повышение уровня IL6 отмечают при снижении когнитивных функций, что может быть связано с контролем посттетанической потенциации [12, 13]. IL6 взаимодействует, так же как IL1 β , и с вегетативной нервной системой [14].

Противовоспалительный цитокин IL10 ингибирует выработку воспалительных цитокинов, таких как IL1 β , IL6, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), и способствует высвобождению других противовоспалительных цитокинов, включая рецепторный антагонист IL1 β , обладающий противовоспалительными свойствами. Было показано, что в мозге крыс IL10 снижает уровень IL1 β и TNF α после черепно-мозговой травмы и улучшает неврологическое восстановление [15]. Гиперактивный ответ микроглии при длительном воспалении часто связан с более высокой индукцией воспалительного IL1 β и противовоспалительного IL10 [16], что нередко происходит на фоне активации симпатической нервной системы [17]. IL10 блокирует ингибирующий эффект IL1 β на посттетаническую потенцию [18].

Наша гипотеза состоит в том, что существует определенная избирательность влияния интерлейкинов на когнитивные функции, в большей мере связанная с долгосрочным запоминанием.

Целью работы было оценить сопряженность когнитивных процессов с изменениями про- и противовоспалительных интерлейкинов у больных ХИМ, проанализировать, насколько специфично когнитивные процессы связаны с изменчивостью воспалительных цитокинов при когнитивной нагрузке.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 31 мужчина и 63 женщины с ХИМ в возрасте от 42 до 85 лет (средний возраст $65,4 \pm 9,1$ года, второе значение — стандартное отклонение). Патоморфологической основой когнитивных нарушений при ХИМ являются диффузные и множественные лакунарные очаговые изменения в подкорковом белом веществе и коре головного мозга, причем наиболее часто подкорковые нарушения в большей мере связаны либо с атеросклеротическим поражением мозговых сосудов, либо с липоглиалиномом мелких пенетрирующих артерий, кровоснабжающих глубокие отделы мозга. Основные этиологические причины ХИМ: атеросклероз, артериальная гипертензия (включая гипертоническую болезнь), венозная недостаточность, диабетическая ангиопатия, а также васкулиты различной этиологии, заболевания крови и т. д. При этом заболевании наблюдаются нарушения когнитивных функций, больные различались, в основном, по количественным характеристикам нарушения памяти, работоспособности, раздражительности, проявлений стволовой симптоматики и т. д. Критерии включения пациентов в исследование: соответствие I и II стадии дисциркуляторной энцефалопатии (стадии начальных проявлений и субкомпенсации по критериям О. С. Левина [19–20]); праворукость; оценка по шкале MoCa 26 и более баллов (при оценке менее 26 баллов для дальнейшей работы отбирали пациентов, не нуждающихся в повседневной жизни в постоянной опеке со стороны окружающих, т. е. недементных). Критерии исключения: деменция выраженной 1 балл и более по клинически рейтинговой шкале деменции (Clinical Dementia Rating Scale);

Таблица 1. Статистические характеристики интерлейкинов до и после когнитивной нагрузки, а также величина их изменения

Переменные	n	Среднее, пг/мл	Стандартное отклонение, пг/мл	Стандартная ошибка, пг/мл	p
IL1 β , до	94	584,9468	275,1798	28,38263	< 0,000001
IL1 β , после	74	678,9865	272,2785	31,65174	< 0,000001
IL β , разность	74	101,6216	170,5874	19,83039	0,000002
IL6, до	94	152,5894	66,2574	6,83393	< 0,000001
IL6, после	74	191,2527	88,2664	10,26076	< 0,000001
IL6, разность	74	32,8459	52,4934	6,10223	0,000001
IL10, до	92	0,9592	0,1949	0,02032	< 0,000001
IL10, после	74	0,9159	0,2505	0,02912	< 0,000001
IL10, разность	74	-0,0177	0,2047	0,02379	0,459261

Примечание: p — уровень значимости.

наличие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения; черепно-мозговая травма; тяжелая кардиальная, метаболическая (сахарный диабет 2-го типа) патология; почечная недостаточность; некомпенсированные нарушения функций щитовидной железы.

При тестировании когнитивных функций больные последовательно выполняли ряд тестов. Вначале — корректурную пробу, при которой в тексте без пробелов испытуемые искали в течение трех минут две рядом стоящие одинаковые буквы. Подобное тестирование основано на n-back-тесте Кирчнера при $n = 1$. Здоровые испытуемые, как правило, выполняли этот тест без ошибок или с одной ошибкой.

Затем проводили тест на вербальную беглость, когда пациенты называли максимальное число слов на три различные буквы (С, К, А). Данные суммировали и усредняли.

Проводили оценку вербальной памяти (по А. Р. Лурия). Испытуемым предлагали запомнить 10 слов при пятикратном повторении. Затем испытуемые выполняли арифметический тест: вычитание из 100 по 7, после которого снова воспроизводили запомненные слова. Подсчитывалось число непосредственно и отсроченно воспроизведенных слов. Здоровые испытуемые запоминали 9–10 слов, безошибочно выполняли тест на вычитание, при отсроченном воспроизведении запоминали 8–10 слов. Тестирование проводили в приведенной выше последовательности тестов.

Для общей оценки когнитивных функций и отбора пациентов использовали Монреальскую шкалу оценки когнитивных функций (MoCa).

Уровень интерлейкинов исследовали в пробах слюны до и после выполнения когнитивных тестов. Определение цитокинов в слюне проводили твердофазным иммуноферментным методом (ELISA) сэндвич-типа. Для определения IL10 использовали наборы реагентов eBioscience (Bender MedSystems; Австрия), для IL1 β и IL6 — наборы Вектор-Бест («Вектор-Бест»; Россия). Диапазон измерения: 1–2000 пг/мл. При всех исследованиях использовали калибраторы фирм — производителей реагентов с дополнительно приобретенными калибраторами.

Определение проводили в дублях на плащечном ридере VICTOR 2 (Perken Elmer; США) с использованием контрольных образцов с низким и высоким содержанием исследуемых параметров. Образцы слюны собирали по протоколу, описанному ранее [21], до и после когнитивных проб. Больные не употребляли алкоголь в течение недели, не пили чай или кофе за 1 ч до забора слюны, за 10 мин до этого прополаскивали рот водой. Сбор слюны осуществляли путем ее сплевывания в пробирку объемом не менее 1,5 мл. Слюну собирали за 10 мин до проведения когнитивных тестов, и не позже 10 мин после их выполнения. Образцы слюны, загрязненные кровью, исключали из исследования. Для этого использовали набор иммуноферментного анализа для определения загрязнения слюны кровью.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica-12 (Dell; США). Оценивали нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова. Вычисляли средние арифметические, стандартные отклонения, стандартные ошибки и дисперсию, проводили однофакторный дисперсионный и корреляционный анализ. Если распределение отличалось от нормального, применяли непараметрические методы — коэффициент ранговой корреляции Спирмана.

Однофакторный дисперсионный анализ по методу ANOVA использовали для определения сопряженности реактивности интерлейкинов на когнитивные тесты с успешностью выполнения этих тестов, для чего пациенты были разбиты на группы с изменчивостью ниже и выше среднего уровня. IL10 разделяли на группы с негативной и позитивной изменчивостью, так как средняя величина изменчивости IL10 не отличалась от нуля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

До и после выполнения когнитивных тестов достоверных гендерных различий в изменении содержания интерлейкинов IL1 β , IL6 и IL10 обнаружено не было, поэтому оценку реактивности интерлейкинов проводили в смешанной группе мужчин и женщин. Количество интерлейкинов

Таблица 2. Сдвиги содержания интерлейкинов в двух группах IL1 β и IL10 в слюне под влиянием когнитивной нагрузки

	Среднее IL1 β , пг/мл	Стандартная ошибка IL1 β , пг/мл	Среднее IL10, пг/мл	Стандартная ошибка IL10, пг/мл
1-я группа (значения ниже среднего уровня)	-0,34 ($n = 44$)	14,7 ($p = 0,98$)	-0,10 ($n = 40$)	0,02 ($p < 0,00001$)
2-я группа (значения выше среднего уровня)	251,2 ($n = 30$)	26,8 ($p < 0,00001$)	0,13 ($n = 33$)	0,02 ($p < 0,00001$)

Примечание: p — уровень значимости.

Таблица 3. Сопряженность сдвигов IL1 β с когнитивными характеристиками

IL1 β	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Вычитание (100–7)	63	11,49	0,001
Отсроченное запоминание (по Лурия)	65	6,84	0,01

Примечание: *F* — коэффициент Фишера; *p* — уровень значимости.

в фоне IL1 β и IL6 в слюне коррелировало с возрастом: $r = 0,25$, $n = 94$, $p = 0,031$ и $r = 0,21$, $n = 94$, $p = 0,041$ соответственно. Изменчивость интерлейкинов после выполнения когнитивных тестов IL1 β и IL6 не коррелировала с возрастом больных; для IL10 обнаружена слабая корреляция $r = 0,24$, $p = 0,042$, $n = 74$.

Статистические характеристики интерлейкинов представлены в табл. 1.

Изменчивость IL10 достоверно не отличалась от нуля, тогда как все остальные показатели средних достоверно различались.

Изменчивость распределения интерлейкинов по критерию Колмогорова–Смирнова для IL1 β и IL10 не отличалась от нормального, в отличие от распределения IL6. Для IL1 β и IL10 был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Совокупности данных изменчивости IL1 β и IL10 были разделены на две группы: ниже и выше средних значений. Средние сдвиги IL1 β и IL10 в двух группах представлены в табл. 2. Пациенты всех групп не различались по возрасту.

Изменчивость IL1 β в первой группе достоверно не отличалась от нуля, тогда как во всех остальных случаях сдвиги были высокодостоверны (см. табл. 2). Межгрупповые различия изменчивости интерлейкинов по группам достоверны для IL1 β и для IL10: $F = 81,6$ при $p < 0,000001$ и $F = 147,8$ при $p < 0,000001$ соответственно.

Рассмотрим сопряженность когнитивных характеристик с величиной сдвигов интерлейкинов IL1 β , IL10 под влиянием выполнения когнитивных тестов.

Положительная изменчивость IL1 β во второй группе, связанная с увеличением содержания IL1 β , сопровождалась менее успешным выполнением тестов (табл. 3, рис. 1).

Сдвиги противовоспалительного IL10 также связаны с когнитивными функциями, однако полученные зависимости противоположны тем, которые были найдены для воспалительных интерлейкинов 1 β и IL6: большая позитивная реактивность IL10 сопряжена с более успешным выполнением когнитивных функций (табл. 4; рис. 2).

Найденные паттерны — количество буквенных паттернов, обнаруженных в корректурном тесте.

Графически различия когнитивных показателей, сопряженных со сдвигами IL10, представлены на рис. 2.

При сравнении рис. 1 и 2 видна прямо противоположная зависимость когнитивных функций от реактивных изменений про- и противовоспалительных интерлейкинов.

Сдвиги IL6 не соответствовали нормальному распределению по критерию Колмогорова–Смирнова, поэтому для оценки связанности сдвигов IL6 с когнитивными характеристиками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмана, применяемый для непараметрических выборок. Значение коэффициента Спирмана для теста вычитания из 100 по 7 и сдвигов IL6 достоверно отличалось от нуля ($r = 0,26$; $n = 62$; $p = 0,042$). Так же как для IL1 β большее число ошибок связано с большей положительной динамикой IL6.

Ряд когнитивных характеристик не был чувствителен к сдвигам интерлейкинов, среди них тест МоСа, показатель беглости словесных ответов и тест Лурия на непосредственное воспроизведение слов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные содержания интерлейкинов в слюне в норме значительно варьируют, например для IL10 [22–23]. У пожилых и старых людей на содержание интерлейкинов в слюне может оказать влияние множество причин от перенесенных заболеваний до качества и числа протезированных зубов. В этом случае целесообразно использовать относительные показатели в одной и той же группе больных, в частности, ряд авторов используют такие показатели, как отношение различных воспалительных интерлейкинов между собой, например IL1 β и IL10, или реактивные изменения интерлейкинов на стресс. При этом указывают на рост воспалительных интерлейкинов при стрессе, включая и IL10 [23]. При когнитивной нагрузке увеличивается рост содержания IL1 β и IL6, при отсутствии изменений в IL10. Отсутствие сдвигов уровня IL10 на когнитивную нагрузку можно объяснить, вероятно, слабым стрессом, ограниченным в основном проявлением симпатoadреналовой активации.

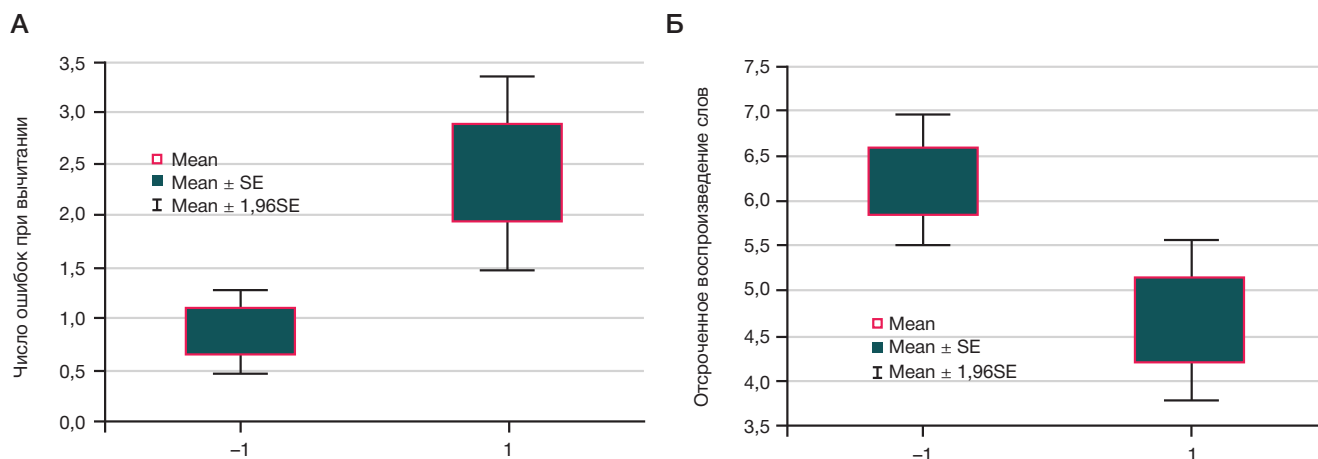


Рис. 1. Показатели выполнения когнитивных тестов в первой и второй группах изменчивости IL1 β . –1 — 1-я группа IL1 β , 1 — 2-я группа изменчивости IL1 β . А. Число допущенных ошибок при вычитании (100–7). Б. Отсроченное воспроизведение слов в тесте Лурия.

Таблица 4. Сопряженность реактивных изменений IL10 с когнитивными характеристиками

IL10	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Вычитание (100–7)	63	6,83	0,01
Найденные паттерны	67	5,16	0,026

Примечание: *F* — коэффициент Фишера; *p* — уровень значимости.

Многие белки, впервые идентифицированные в иммунной системе, были обнаружены и в синапсах нейронов, участвующих в когнитивных процессах [24]. В настоящей работе было показано увеличение содержания провоспалительных интерлейкинов в слюне при выполнении когнитивных тестов у больных с ХИМ. Большей выработке провоспалительных интерлейкинов соответствовало менее успешное выполнение когнитивных тестов. У больных с ХИМ воспалительные процессы усилены по сравнению с нормой [25]. Активация нейронов в этих условиях приводит к увеличению выработки провоспалительных интерлейкинов, но в разной степени в зависимости от тяжести заболевания. Известно, например, что симпатические нейроны продуцируют IL6 и реагируют на него аутокринным или паракринным образом в присутствии растворимого рецептора IL6 [26]. Можно предположить, что активацию нейронов у таких больных сопровождает рост интерлейкинов воспаления. Известно, что воспалительные цитокины нарушают функцию нейронов в мозге взрослого человека за счет их прямого воздействия на нейроны или косвенных механизмов, опосредованных ненейронными клетками (например, микроглией и астроцитами) [27]. Небольшой стресс при когнитивном тестировании больных ХИМ практически неизбежен, поскольку при данном заболевании когнитивные задания многие больные воспринимают как психоэмоциональную нагрузку. Стресс может привести к стимуляции продукции цитокинов, в том числе IL1 β , IL6 и др. С одной стороны, нормальный физиологический уровень IL1 β необходим для обучения и памяти, с другой — повышенный уровень IL1 β неблагоприятен для когнитивной деятельности. Показано, что вызванное стрессом увеличение циркуляции IL6 усиливает воспалительные процессы, вызывая повышение уровня IL1 β в головном мозге и, как следствие, способствует увеличению тревожности [28]. Действие IL1 β на механизмы памяти и обучения связывают часто с его влиянием на синаптические механизмы длительной потенциации в гиппокампе. IL1 β вызывает гиперполяризацию и модулирует синаптическое торможение в преоптических и передних гипоталамических нейронах, а также отменяет длительную депрессию синаптической передачи в гиппокампе. Сеть цитокинов,

включающая IL1 β , IL18, IL6 и TNF α , взаимодействует с нейронами во время долгосрочной потенциации и обучения. Блокада эндогенного IL1 β способствует формированию памяти [29].

Действие IL10 прямо противоположно влиянию воспалительных интерлейкинов. Известно, что IL10 включен в регуляцию цитокинов по механизму обратной связи и тормозит действие воспалительных цитокинов. Отсутствие направленной динамики этого интерлейкина при когнитивной нагрузке, вероятно, связано с его невысокой вовлеченностью в собственно когнитивные процессы. Влияние IL10 на когнитивные функции может быть опосредовано его влиянием на воспалительные цитокины IL1 β и IL6 [30].

Коррелирующие со сдвигами уровня интерлейкинов когнитивные функции были связаны с удержанием в сознании следов памяти, т. е. пластическими перестройками в мозге. С этой точки зрения показательно, что непосредственное повторение слов после их называния в тесте Лурия не было связано со сдвигом воспалительных интерлейкинов, тогда как отсроченное воспроизведение было сопряжено с изменением уровня IL1 β . Это подтверждает возможную роль данного интерлейкина в подавлении посттетанической потенциации. Вероятно, многие эффекты влияния воспалительных интерлейкинов связаны именно с этим механизмом.

Полученные результаты имеют определенную практическую ценность. В существующих многочисленных рекомендациях для пожилых и старых людей с хроническими сосудистыми нарушениями указывается на целесообразность когнитивной нагрузки (решение кроссвордов, изучение иностранных языков и т. п.). Полученные результаты указывают, что в некоторых случаях когнитивная нагрузка может привести к увеличению содержания воспалительных интерлейкинов и сопровождающим их процессам окислительного стресса. Они ставят под сомнение безоговорочную ценность подобных рекомендаций. Дальнейшие исследования могут быть связаны с поиском биологических маркеров воспалительных интерлейкинов, которые были бы удобны для контроля когнитивной нагрузки и реактивных изменений воспалительных цитокинов.

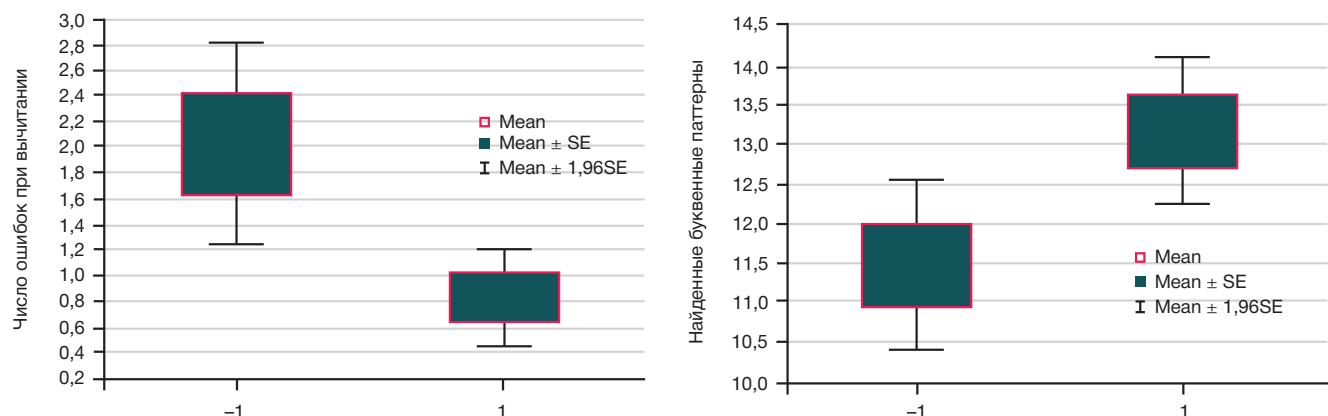


Рис. 2. Показатели выполнения когнитивных тестов при отрицательной и положительной реактивности IL10. Условные обозначения те же, что на рис. 1

ВЫВОДЫ

Реактивность про- и противовоспалительных интерлейкинов IL1 β , IL6, IL10 связана с выполнением когнитивных функций у больных ХИМ. Выполнение когнитивных тестов сопровождалось достоверным повышением уровня IL1 β и IL6 в смешанной выборке мужчин и женщин. Изменение уровня всех исследованных интерлейкинов было сопряжено с различной успешностью выполнения ряда когнитивных тестов. Увеличение содержания IL1 β и IL6 в слюне сопровождалось ухудшением выполнения таких тестов, как вычитание из 100 по 7, и для IL1 β — снижением отсроченного воспроизведения слов в тесте Лурия. В группе больных с позитивной динамикой IL10 в слюне было отмечено снижение числа ошибок при вычитании из 100 по 7, а также более успешное выполнение корректурного

теста, по сравнению с группой больных с отрицательной динамикой IL10. Таким образом, значительную положительную динамику уровня провоспалительных цитокинов, вызванную когнитивной нагрузкой, сопровождало снижение когнитивных функций, связанных с отсроченным запоминанием, а аналогичные изменения противовоспалительного интерлейкина IL10 были связаны с более успешным выполнением когнитивных функций. Тесты МоСа, вербальной беглости и некоторые другие не были сопряжены с изменчивостью интерлейкинов. Необходимо обсуждение механизмов влияния интерлейкинов на когнитивные функции. Существует тесная связь между уровнем воспалительных интерлейкинов и некоторыми видами психической активности, что с практической точки зрения требует контроля уровня воспалительных цитокинов при когнитивной нагрузке у больных ХИМ.

Литература

1. Суслина З. А., Иллариошкин С. Н., Пирадов М. А. Неврология и нейронауки — прогноз развития. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2007; 1 (1): 5–9.
2. Фокин В. Ф., Пономарева Н. В., Андросова Л. В., Селезнева Н. Д. Взаимодействие нервной и иммунной систем при нормальном старении и деменциях альцгеймеровского типа. *Физиология человека*. 1996; 26 (6): 55–59.
3. Пономарева Н. В., Андросова Л. В., Ключников С. А., Абрамычева Н. Ю., Малина Д. Д., Филиппова Ю. В. и др. Нарушение нейро-иммунного взаимодействия на преклинической стадии болезни Гентингтона и его роль в развитии заболевания. *Руководство для врачей*. В сборнике: Материалы XX Конгресса по неврологии под ред. С. Н. Иллариошкина и О. С. Левина. Москва, 2017; с. 253–7.
4. Huang ZB, Sheng GQ. Interleukin-1 β with learning and memory. *Neurosci Bull*. 2010; 26 (6): 455–68. DOI: 10.1007/s12264-010-6023-5.
5. Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacol Rev*. 2018; 70 (2): 278–314. DOI: 10.1124/pr.117.014647.
6. Song C, Phillips AG, Leonard B. Interleukin 1 beta enhances conditioned fear memory in rats: possible involvement of glucocorticoids. *Eur J Neurosci*. 2003; 18: 1739–43. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02886.x.
7. Haefeli WE, Bargetzi MJ, Starnes HF, Blaschke TF, Hoffman BB. Evidence for activation of the sympathetic nervous system by recombinant human interleukin-1 beta in humans. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1993 Feb; 13 (2): 136–40. DOI: 10.1097/00002371-199302000-00009. PMID: 8318499.
8. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012; 8 (9): 1254–66. DOI: 10.7150/ijbs.4679. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23136554; PMCID: PMC3491449.
9. Батышева Т. Т., Артемова И. Ю., Вдовиченко Т. В. Хроническая ишемия мозга: механизмы развития и современное комплексное лечение. *Consilium medicum* 2004; 3 (4). Доступно по ссылке: http://old.consilium-medicum.com/media/refer/04_04/51.shtml.
10. Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 2001 Feb; 14 (1): 89–94. DOI: 10.1097/00019052-200102000-00014. PMID: 11176223.
11. Sallmann S, Jüttler E, Prinz S, et al. Induction of Interleukin-6 by Depolarization of Neurons. *Journal of Neuroscience* 1 December 2000; 20 (23): 8637–42; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-23-08637.2000.
12. Balschun D, Wetzel W, Del Rey A, Pitossi F, Schneider H, Zuschratter W, Besedovsky HO. Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J*. 2004 Nov; 18 (14): 1788–90. DOI: 10.1096/fj.04-1625fje. PMID: 15345694.
13. Wright CB, Sacco RL, Rundek T, Delman J, Rabbani L, Elkind M. Interleukin-6 is associated with cognitive function: The Northern Manhattan Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2006; 15 (1): 34–38. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2005.08.009.
14. Helwig BG, Craig RA, Fels RJ, Blecha F, Kenney MJ. Central nervous system administration of interleukin-6 produces splenic sympathoexcitation. *Auton Neurosci*. 2008; 141 (1–2): 104–11. DOI: 10.1016/j.autneu.2008.04.008.
15. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
16. Henry C, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1[beta] and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*. 2009; 23: 309.
17. Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, et al. Catecholamine-induced interleukin-10 release: a key mechanism in systemic immunodepression after brain injury. *Crit Care*. 1999; 3: R107. Available from: <https://doi.org/10.1186/cc375>.
18. Kelly A, Lynch A, Vereker E, Nolan Y, Queenan P, Whittaker E, O'Neill LA, Lynch MA. The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7; 276 (49): 45564–72. DOI: 10.1074/jbc.M108757200. PMID: 11581275.
19. Левин О. С. Дисциркуляторная энцефалопатия: современные представления о механизмах развития и лечении. *Consilium medicum*. 2007; 8: 72–79.
20. Танащян М. М., Максимова М. Ю., Домашенко М. А. Дисциркуляторная энцефалопатия. *Путеводитель врачебных назначений. Терапевтический справочник*. 2015; 2: 1–25.
21. La Fratta I, Tatangelo R, Campagna G, et al. The plasmatic and salivary levels of IL-1 β , IL-18 and IL-6 are associated to emotional difference during stress in young male. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 3031. DOI: 10.1038/s41598-018-21474-y. PMID: 29445205; PMCID: PMC5813044.
22. Szabo YZ, Newton TL, Miller JJ, Lyle KB, Fernandez-Botran R. Acute stress induces increases in salivary IL-10 levels. *Stress*. 2016; 19 (5): 499–505. DOI: 10.1080/10253890.2016.1206885.
23. Rezazadeh F, Shahbazi F, Andisheh-Tadib A. Evaluation of salivary level of IL-10 in patients with oral lichen planus, a preliminary investigation. *Comp Clin Pathol*. 2017; 26: 531–4. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2415-5>.
24. Nisticò R, Salter E, Nicolas C, et al. Synaptoimmunology — roles in health and disease. *Mol Brain*. 2017; 10: 26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0308-9>.
25. Liu F, McCullough L. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34: 1121–30. Available from: <https://doi.org/10.1038/aps.2013.89>.

26. März P, Cheng JG, Gadiant RA, et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95 (6): 3251–6. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3251.
 27. Liu X, Quan N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts *Front Neurol*. 2018; 9: 8. DOI: 10.3389/fneur.2018.00008.
 28. Gruol DL. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*. 2015 Sep; 96 (Pt A): 42–54. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.023.
 29. Sparkman NL, Johnson RW. Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15: 323–30.
 30. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016; 13: 297. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>.
- References**
1. Suslina ZA, Illarionovskiy SN, Piradov MA. Nevrologiya i neyronauki — prognoz razvitiya. *Annaly klinicheskoy i jeksperimental'noj nevrologii*. 2007; 1 (1): 5–9. Russian.
 2. Fokin VF, Ponomareva NV, Androsova LV, Selezneva ND. Vzaimodejstvie nervnoj i immunoj sistem pri normal'nom starenii i demencijah al'czejmerovskogo tipa. *Fiziologiya cheloveka*. 1996; 26 (6): 55–59. Russian.
 3. Ponomareva NV, Androsova LV, Klyushnikov SA, Abramychyeva NYu, Malina DD, Filippova YuV, i dr. Narushenie nejro-immunnogo vzaimodejstviya na preklinicheskoy stadii bolezni Gentingtona i ego rol' v razvitiy zabolevaniya. *Rukovodstvo dlja vrachej. V sbornike: Materialy HH Kongressa po nevrologii pod red. S. N. Illarionovskina i O. S. Levina*. Moskva, 2017; s. 253–7. Russian.
 4. Huang ZB, Sheng GQ. Interleukin-1 β with learning and memory. *Neurosci Bull*. 2010; 26 (6): 455–68. DOI: 10.1007/s12264-010-6023-5.
 5. Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacol Rev*. 2018; 70 (2): 278–314. DOI: 10.1124/pr.117.014647.
 6. Song C, Phillips AG, Leonard B. Interleukin 1 beta enhances conditioned fear memory in rats: possible involvement of glucocorticoids. *Eur J Neurosci*. 2003; 18: 1739–43. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02886.x.
 7. Haefeli WE, Bargetzi MJ, Starnes HF, Blaschke TF, Hoffman BB. Evidence for activation of the sympathetic nervous system by recombinant human interleukin-1 beta in humans. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1993 Feb; 13 (2): 136–40. DOI: 10.1097/00002371-199302000-00009. PMID: 8318499.
 8. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012; 8 (9): 1254–66. DOI: 10.7150/ijbs.4679. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23136554; PMCID: PMC3491449.
 9. Batysheva TT, Artemova IYu, Vdovichenko TV. Hronicheskaja ishemija mozga: mehanizmy razvitiya i sovremennoe kompleksnoe lechenie. *Consilium medicum* 2004; 3 (4). Dostupno po ssylke: http://old.consilium-medicum.com/media/refer/04_04/51.shtml. Russian.
 10. Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 2001 Feb; 14 (1): 89–94. DOI: 10.1097/00019052-200102000-00014. PMID: 11176223.
 11. Sallmann S, Jüttler E, Prinz S, et al. Induction of Interleukin-6 by Depolarization of Neurons. *Journal of Neuroscience* 1 December 2000; 20 (23): 8637–42; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-23-08637.2000.
 12. Balschun D, Wetzel W, Del Roy A, Pitossi F, Schneider H, Zuschratter W, Besedovsky HO. Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J*. 2004 Nov; 18 (14): 1788–90. DOI: 10.1096/fj.04-1625fje. PMID: 15345694.
 13. Wright CB, Sacco RL, Rundek T, Delman J, Rabbani L, Elkind M. Interleukin-6 is associated with cognitive function: The Northern Manhattan Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2006; 15 (1): 34–38. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2005.08.009.
 14. Helwig BG, Craig RA, Fels RJ, Blecha F, Kenney MJ. Central nervous system administration of interleukin-6 produces splenic sympathoexcitation. *Auton Neurosci*. 2008; 141 (1–2): 104–11. DOI: 10.1016/j.autneu.2008.04.008.
 15. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
 16. Henry C, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1[β] and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*. 2009; 23: 309.
 17. Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, et al. Catecholamine-induced interleukin-10 release: a key mechanism in systemic immunodepression after brain injury. *Crit Care*. 1999; 3: R107. Available from: <https://doi.org/10.1186/cc375>.
 18. Kelly A, Lynch A, Vereker E, Nolan Y, Queenan P, Whittaker E, O'Neill LA, Lynch MA. The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 β on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7; 276 (49): 45564–72. DOI: 10.1074/jbc.M108757200. PMID: 11581275.
 19. Levin OS. Discirkuljatornaja jencefalopatija: sovremennye predstavlenija o mehanizmah razvitiya i lechenii. *Consilium medicum*. 2007; 8: 72–79. Russian.
 20. Tanashyan MM, Maksimova MYu, Domashenko MA. Discirkuljatornaja jencefalopatija. *Putevoditel' vrachebnyh naznachenij. Terapevticheskij spravochnik*. 2015; 2: 1–25. Russian.
 21. La Fratta I, Tatangelo R, Campagna G, et al. The plasmatic and salivary levels of IL-1 β , IL-18 and IL-6 are associated to emotional difference during stress in young male. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 3031. DOI: 10.1038/s41598-018-21474-y. PMID: 29445205; PMCID: PMC5813044.
 22. Szabo YZ, Newton TL, Miller JJ, Lyle KB, Fernandez-Botran R. Acute stress induces increases in salivary IL-10 levels. *Stress*. 2016; 19 (5): 499–505. DOI: 10.1080/10253890.2016.1206885.
 23. Rezazadeh F, Shahbazi F, Andisheh-Tadib A. Evaluation of salivary level of IL-10 in patients with oral lichen planus, a preliminary investigation. *Comp Clin Pathol*. 2017; 26: 531–4. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2415-5>.
 24. Nisticò R, Salter E, Nicolas C, et al. Synaptoimmunology — roles in health and disease. *Mol Brain*. 2017; 10: 26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0308-9>.
 25. Liu F, McCullough L. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34: 1121–30. Available from: <https://doi.org/10.1038/aps.2013.89>.
 26. März P, Cheng JG, Gadiant RA, et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95 (6): 3251–6. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3251.
 27. Liu X, Quan N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts *Front Neurol*. 2018; 9: 8. DOI: 10.3389/fneur.2018.00008.
 28. Gruol DL. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*. 2015 Sep; 96 (Pt A): 42–54. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.023.
 29. Sparkman NL, Johnson RW. Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15: 323–30.
 30. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016; 13: 297. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>.

МЕТОДИКА УСКОРЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ БАРЬЕРОВ *IN VITRO*С. В. Никулин^{1,2} ✉, А. А. Полозников¹, Д. А. Сахаров²¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия² Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, Россия

Для повышения эффективности разработки лекарственных препаратов необходимо увеличивать производительность экспериментов, проводимых на доклинической стадии. Существенным недостатком используемых на сегодняшний день *in vitro* моделей кишечного барьера является скорость образования функционального монослоя энтероцитов со сформировавшимися плотными контактами. Целью работы было провести комплексный подбор параметров (различные покрытия и плотность клеток) для быстрого и эффективного получения пригодного к проведению экспериментов монослоя клеток Сасо-2. Для оценки состояния культуры клеток при различных условиях применяли прижизненную микроскопию и импедансную спектроскопию. Для определения возможного биологического механизма действия различных белковых субстратов на энтероциты использовали транскриптомный анализ. Показано, что покрытие субстрата для роста клеток коллагеном IV существенно повышает скорость пролиферации и миграции клеток линии Сасо-2. Такое воздействие позволяет в течение 24 ч сформировать функциональный монослой эпителиальных клеток с плотными контактами. С целью получения пригодного для проведения экспериментов кишечного барьера *in vitro* в течение 24 ч начальная плотность клеток должна лежать в диапазоне 90–200 тыс. клеток на 1 см². Обнаружено, что клетки Сасо-2 слабо экспрессируют коллаген IV, при этом рецепторы к коллагену IV у данных клеток экспрессированы на достаточно высоком уровне. Показано также, что еще один компонент базальной мембраны ламинин 332 не оказывает заметного влияния на скорость формирования функционального монослоя эпителиальных клеток. Таким образом, в работе были определены оптимальные параметры, позволяющие существенно повысить производительность экспериментов с *in vitro* моделями кишки.

Ключевые слова: коллаген IV, барьерная ткань, ламинин 332, TEER, внеклеточный матрикс, Сасо-2, импедансная спектроскопия**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-19-10597).**Вклад авторов:** С. В. Никулин — культуральная работа, подготовка образцов для анализа транскриптома, анализ данных, написание статьи; А. А. Полозников — анализ транскриптомных данных, написание статьи; Д. А. Сахаров — организация исследования, написание статьи.**Соблюдение этических стандартов:** все образцы для исследования были получены с соблюдением принципов и правил Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Сергей Вячеславович Никулин
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117321; nikulin.c.b@gmail.com**Статья получена:** 09.11.2020 **Статья принята к печати:** 03.12.2020 **Опубликована онлайн:** 15.12.2020**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.077A METHOD FOR RAPID GENERATION OF MODEL INTESTINAL BARRIERS *IN VITRO*Nikulin SV^{1,2} ✉, Poloznikov AA¹, Sakharov DA²¹ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia² SRC Bioclinicum, Moscow, Russia

To increase the efficiency of drug development process, it is important to improve performance of preclinical experiments. A major drawback of the currently used *in vitro* intestinal barrier models is that it takes a significant time to obtain functional enterocyte monolayers with formed tight junctions. In this work, we have optimized various parameters such as cell density and different coatings, for a more rapid and efficient producing Caco-2 cell monolayers suitable for further experiments. In vivo microscopy and impedance spectroscopy were used to monitor cells state under various conditions. To determine possible biological mechanisms affected by exposure to various protein substrates, the transcriptomic analysis was applied. It was shown that collagen IV coating of the cell growth substrate significantly increased the rate of proliferation and migration of Caco-2 cells. This effect allows forming a functional monolayer of epithelial cells with tight junctions within 24 hours. Optimally, the initial cell density should be 90,000 to 200,000 cells/cm². It was observed that collagen IV was poorly expressed by Caco-2 cells while the collagen IV receptor was expressed at a relatively high level in these cells. Laminin-332, another basement membrane component, was found to have no significant effect on times of formation of functional epithelial monolayers. Thus, using the optimal parameters determined in this study allows to significantly improve efficiency of using the *in vitro* intestinal barrier models.

Keywords: collagen IV, barrier tissues, laminin-332, TEER, extracellular matrix, Caco-2, impedance spectroscopy**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation, protocol № 16-19-10597.**Author contribution:** Nikulin SV — cell culture work, preparation of samples for transcriptome analysis, data analysis, manuscript preparation; Poloznikov AA — analysis of transcriptome data, manuscript preparation; Sakharov DA — supervision, manuscript preparation.**Compliance with ethical standards:** the study complies with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments.✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey V. Nikulin
Vavilova, 7, Moscow, 117321; nikulin.c.b@gmail.com**Received:** 09.11.2020 **Accepted:** 03.12.2020 **Published online:** 15.12.2020**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.077

Кишка является важным органом, в котором происходит переваривание пищи, всасывание в кровоток питательных веществ и различных лекарственных препаратов, а также взаимодействие микроорганизмов с клетками организма-хозяина. Одна из основных функций кишки — барьерная функция. Нарушение барьерной функции ассоциировано с целым рядом патологических состояний, включая воспалительные и аутоиммунные заболевания [1]. Часто

к нарушению барьерной функции кишки приводит прием различных противоопухолевых препаратов [2].

Различают три основных способа транспорта молекул через кишечный барьер: активный транспорт, пассивная диффузия через клеточную мембрану и пассивная диффузия через межклеточное пространство. Ключевым компонентом клеток, регулирующим парацеллюлярный транспорт, являются плотные контакты [3]. Плотные

контакты представляют собой белковые комплексы, расположенные ближе к апикальной части эпителиальной клетки и состоящие из нескольких цитоплазматических и трансмембранных белков, включая окклюдин и клаудины. За счет динамических изменений плотных контактов возможно быстрое изменение проницаемости кишки [4]. Состояние плотных контактов могут регулировать различные сигнальные молекулы, в том числе некоторые киназы (c-Src, c-Yes, и др.) и цитокины (ФНО α , интерферрон — и др.) [5]. В связи с важностью плотных контактов для функционирования кишки как в норме, так и при патологии, актуальна задача создания *in vitro* моделей для оценки влияния различных воздействий на плотные контакты [6, 7].

Существует несколько различных способов измерения парацеллюлярной проницаемости, отражающей состояние плотных контактов. В частности, популярно применение различных молекулярных меток, концентрация которых может быть точно измерена по обе стороны барьера [8, 9]. Однако данный метод достаточно трудоемкий и времязатратный. Альтернативой может быть измерение трансэпителиального сопротивления (TEER) [10]. Данный способ является быстрым и хорошо подходит для высокопроизводительных скринингов, при этом повышения точности измерения TEER можно добиться за счет применения импедансной спектроскопии [11, 12].

На сегодняшний день для моделирования кишечного барьера *in vitro* широко используют линию клеток Caco-2 [13]. Исходно клетки Caco-2 были получены из аденокарциномы толстой кишки, и оказалось, что они могут спонтанно дифференцироваться в культуре и приобретать многие свойства эпителия тонкой кишки [14, 15]. Известно, что клетки Caco-2 образуют плотные контакты по мере роста и додифференцировки, при этом их плотность выше, чем в нормальной кишке [14, 15]. В связи с таким свойством клетки Caco-2 представляют собой хорошую модель для изучения различных воздействий на плотные контакты. Однако для более широкого применения данной клеточной модели необходимо существенно повысить производительность экспериментов. Частично этого можно добиться при помощи автоматизации культивирования, например с помощью микрофлюидных чипов [16–18], однако необходимо определить наиболее благоприятные условия культивирования, которые позволят быстро получать готовые клеточные модели.

Целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования клеток Caco-2, позволяющих как можно быстрее получить целостный монослой клеток со сформировавшимися плотными контактами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки линии Caco-2 (Институт цитологии РАН; Россия) культивировали в питательной среде MEM (Gibco; США), содержащей 20% об. фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США) и 1% об. раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco; США). Культивирование проводили при 37 °C в атмосфере 5%-го CO $_2$. Субкультивирование производили каждые 2–3 дня по стандартной методике при помощи раствора трипсина-ЭДТА («ПанЭко»; Россия). Подсчет числа клеток проводили при помощи автоматического счетчика клеток Countess (Gibco; США) согласно рекомендациям производителя.

Перед посевом клеток в мембранные полиэфирные (PET) вставки HTS Transwell-96 (Corning; США) с размером

пор 1 мкм производили покрытие части мембран ламином-332 (BioLamina; Швеция) и коллагеном IV («Имтек»; Россия). Для этого в мембранные вставки добавляли по 30 мкл раствора соответствующего белка в DPBS с концентрацией 10 мкг/мл. Затем 96-луночные планшеты с мембранными вставками инкубировали при температуре 4 °C в течение 24 ч. После инкубации отбирали растворы белков из всех лунок и промывали каждую лунку 3 раза с помощью 100 мкл раствора DPBS. Мембранные вставки HTS непосредственно перед посевом клеток заполняли питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру) и инкубировали в клеточном инкубаторе 1 ч. Далее в каждую мембранную вставку добавляли различное число клеток (6250, 12 500 и 25 000 клеток на лунку) в 50 мкл питательной среды для достижения начальной плотности клеток 43 700, 87 400 и 174 800 клеток на 1 см 2 . Эксперимент проводили в трех повторах. Планшеты с мембранными вставками в течение всего эксперимента инкубировали в клеточном инкубаторе.

Для определения значений TEER через 24 и 48 ч от начала эксперимента измеряли импеданс-спектры, при помощи системы импедансной спектроскопии (ИТС «БиоКлиникум»; Россия) и оригинальных электродов (ИТС «БиоКлиникум»; Россия). Значения TEER рассчитывали из описанной ранее эквивалентной электрической схемы [19] при помощи ПО CEISA Impedance fitting (ИТС «БиоКлиникум»; Россия). Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 4.0 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1 (RStudio PBC; США). Для оценки статистической значимости наблюдаемых различий TEER применяли трехфакторный (тип подложки, начальная плотность клеток и время от начала эксперимента) дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Для получения микрофотографий клеток Caco-2 на различных подложках часть лунок в культуральных 96-луночных планшетах (Corning; США) покрывали ламином-332 (BioLamina; Швеция) и коллагеном IV (Имтек; Россия) по аналогичному с мембранными вставками протоколу. Для покрытия использовали по 50 мкл растворов белков. Далее в лунки вносили по 100 мкл клеточной суспензии в полной питательной среде с концентрацией клеток 100 000 и 200 000 клеток на 1 мл (соответствует начальной плотности клеток 31 300 и 62 600 на 1 см 2). Планшеты в течение всего эксперимента инкубировали в клеточном инкубаторе. Микрофотографии получали при помощи инвертированного микроскопа PrimoVert (Carl Zeiss; Германия).

Для получения полностью дифференцированных клеток Caco-2 культивирование проводили по описанной ранее методике [11, 19]. Анализ уровней экспрессии генов в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 проводили при помощи микрочипов GeneChip Human Genome 1.0 ST (Affymetrix; США) [20]. Клетки лизировали при помощи лизирующего буфера QIAzol (Qiagen; Германия). Далее проводили выделение тотальной РНК при помощи набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen; Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; США). Качество РНК оценивали с помощью системы Experion (Bio-Rad; США). Для гибридизации на микрочипах использовали по 500 нг каждого образца РНК. Эксперимент проводили в трех повторах.

Полученные результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения TAC 4.0 (Thermo Fisher Scientific; США). Оценку статистической значимости различий уровней экспрессии между дифференцированными и недифференцированными клетками Caco-2 проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бенджамини–Хохберга. Пороговый уровень значимости был равен 0,05. Гены с уровнем экспрессии ниже 6,0 в логарифмической шкале Affymetrix считали неэкспрессирующимися.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам измерения значений TEER (рис. 1) в мембранных вставках через 24 ч после посева клеток было показано, что TEER возрастает при росте начальной клеточной плотности. Например, для контрольных мембранных вставок без покрытия было обнаружено, что значения TEER примерно на 118 Ом·см² выше при максимальной протестированной начальной плотности посадки клеток по сравнению с минимальной ($p < 0,001$). При этом значимых различий между промежуточной и минимальной плотностями обнаружено не было ($p = 1$). Аналогичные результаты были получены и для покрытия лунок ламинином 332. Причем в случае покрытия ламинином 332 ни для одной протестированной начальной плотности клеток не было обнаружено значительных отличий TEER от контрольных лунок без покрытия (все $p = 1$). Однако при покрытии коллагеном IV результаты существенно отличались. В данном случае были обнаружены значительные отличия от минимальной исследованной начальной плотности 43 700 клеток на квадратный сантиметр как для начальной плотности, равной 87 400 (увеличение на 147 Ом·см²; $p < 0,001$), так и для начальной плотности, равной 174 800 (увеличение на 208 Ом·см²; $p < 0,001$). Таким образом, при покрытии коллагеном IV зависимость значений TEER от начальной плотности клеток была более выраженной. Для начальных плотностей клеток 87 400 и 174 800 см⁻² также было обнаружено сильное повышение TEER (на 188 Ом·см² и 142 Ом·см² соответственно) при покрытии коллагеном IV

по сравнению с контрольными полиэфирными лунками ($p < 0,001$ в обоих случаях).

Через 48 ч от начала эксперимента значения TEER в контрольных лунках без покрытия существенно выросли при начальной плотности клеток, равной 87 400 и 174 800 см⁻², по сравнению с измерениями, проведенными через 24 ч после посева клеток (на 202 Ом·см² и 110 Ом·см² соответственно; $p < 0,001$ и $p = 0,002$ соответственно). При этом значимых различий TEER в лунках с минимальной протестированной начальной плотностью клеток 43 700 см⁻² через 48 ч по сравнению с 24 ч от начала эксперимента обнаружено не было ($p = 1$). В случае покрытия лунок ламинином 332 были получены схожие результаты при сравнении значений TEER через 48 ч и 24 ч после посева клеток: при начальной плотности 43 700 см⁻² значимых различий обнаружено не было ($p = 0,1$), при начальной плотности 87 400 см⁻² значения TEER значимо выросли на 165 Ом·см² ($p < 0,001$), однако при начальной плотности 174 800 см⁻² наблюдаемый рост на 83 Ом·см² не был статистически значимым ($p = 1$). В то же время в покрытых коллагеном IV лунках через 48 ч значения TEER значимо увеличились на 175 Ом·см² по сравнению с измерениями, проведенными в предыдущий день, только при минимальной начальной плотности клеток ($p < 0,001$), а при 87 400 см⁻² и 174 800 см⁻² значимых различий обнаружено не было ($p = 0,2$ и $p = 1$ соответственно).

Интересно, что для лунок без покрытия и при покрытии ламинином 332 значения TEER все еще зависели от начальной плотности клеток через 48 ч после их посева. При сравнении с минимальной протестированной клеточной плотностью в случае непокрытых полиэфирных лунок значения TEER были выше как при начальной плотности 87 400 см⁻² (на 172 Ом·см²; $p < 0,001$), так и при начальной плотности 174 800 см⁻² (на 188 Ом·см²; $p < 0,001$). Аналогичные результаты были получены и в случае покрытия ламинином 332. При этом значения TEER в лунках, покрытых коллагеном IV, значимо не зависели от начальной плотности клеток через 48 ч после начала эксперимента (все $p = 1$) и были выше 200 Ом·см².

С целью оценки влияния покрытия субстрата для роста клеток коллагеном IV и ламинином 332 на

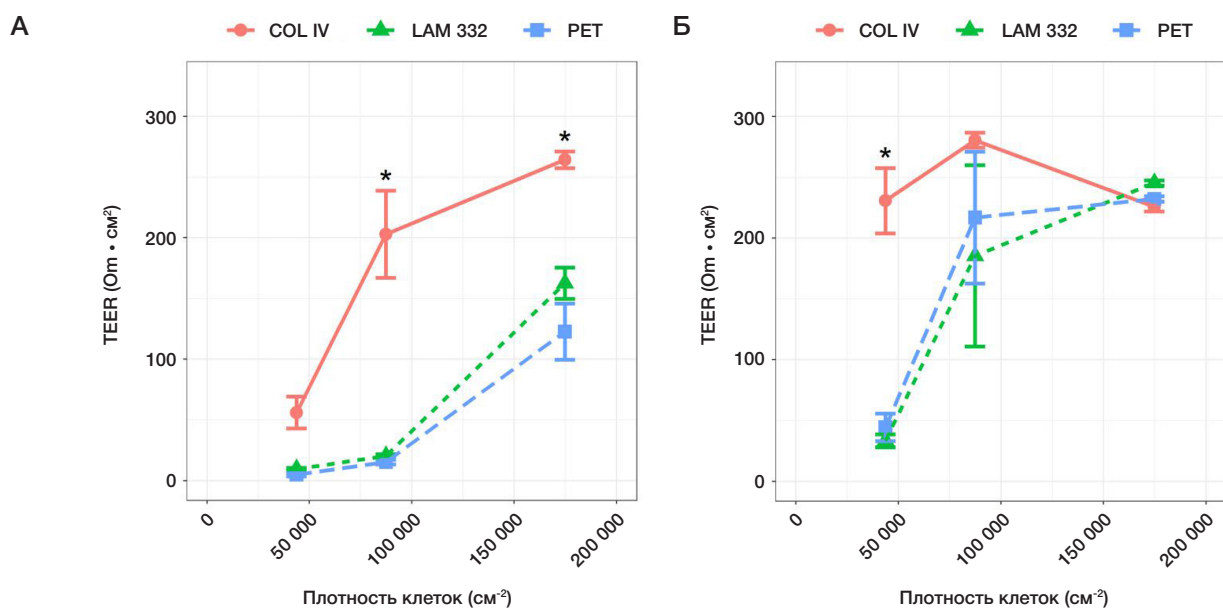


Рис. 1. Зависимость TEER на различных субстратах от начальной плотности клеток через 24 ч (**А**) и через 48 ч (**Б**). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. * — статистически значимые отличия TEER на мембранах с покрытием от контрольных мембран без покрытия; COL IV — коллаген IV; LAM 332 — ламинин 332; PET — полиэфир (мембраны без покрытия)

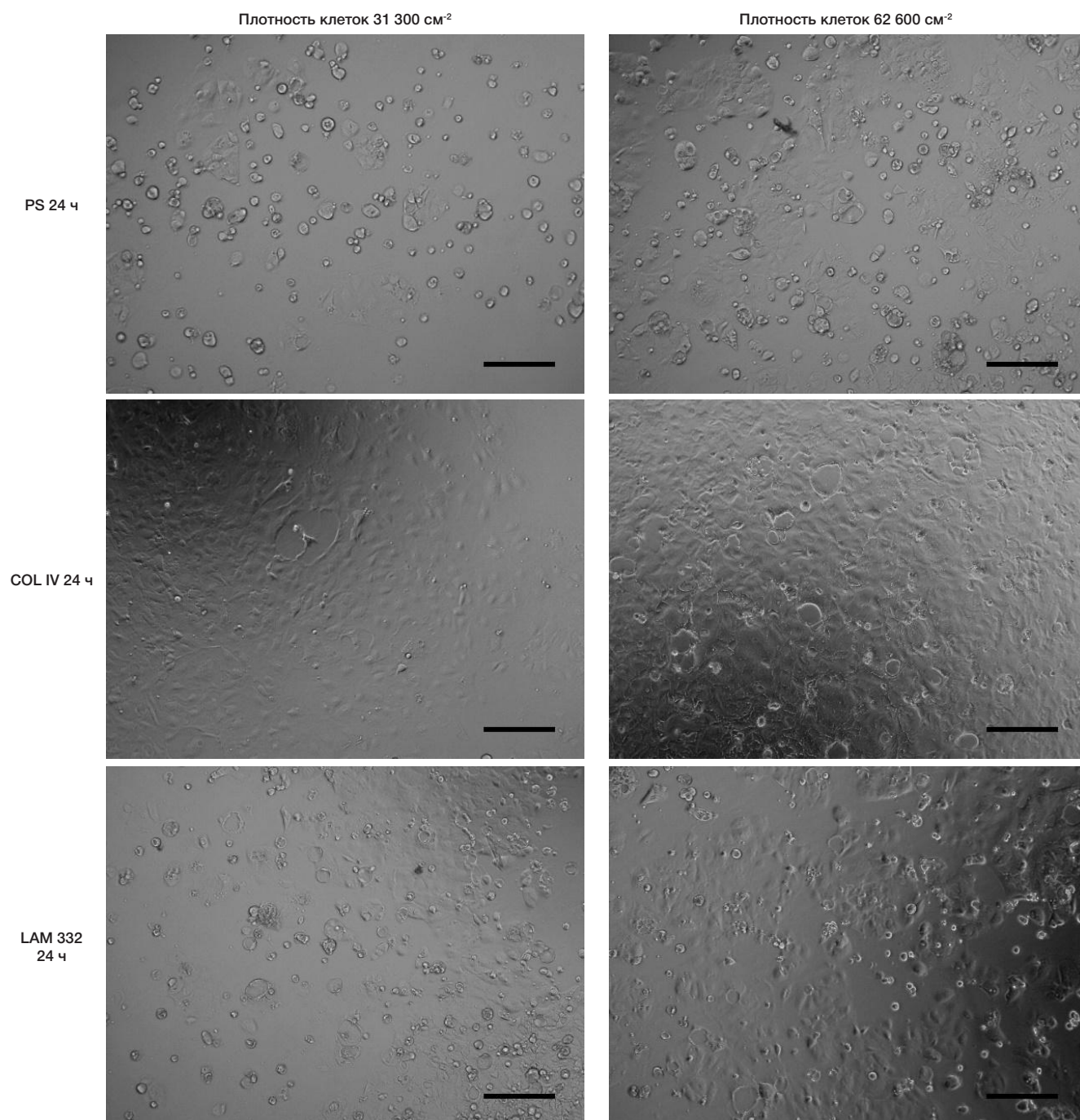


Рис. 2. Микрофотографии монослоя клеток Сасо-2 через 24 ч на различных подложках и при различных начальных плотностях клеток. Отрезок масштаба равен 200 мкм. COL IV — коллаген IV; LAM 332 — ламинин 332; PS — полистирол (лунки без покрытия)

морфологию и скорость роста клеток была проведена прижизненная микроскопия клеток Сасо-2 при различных начальных плотностях через 24 ч после посева клеток (рис. 2). Оказалось, что для контрольных непокрытых полистироловых лунок и в случае покрытия ламинином 332 при рассмотренных начальных плотностях клеток 100%-я конфлюэнтность не достигается. Однако при покрытии коллагеном IV уже при начальной плотности 31 300 см⁻² около 80% поверхности оказывается покрыто клетками, а при начальной плотности 62 600 см⁻² в лунках образуется сформированный монослой. При этом при покрытии коллагеном IV в культуре обнаружено повышенное содержание вытянутых веретенообразных клеток, по сравнению с контрольными лунками и лунками с покрытием ламинином 332.

В результате проведенного транскриптомного анализа было показано (см. табл.), что как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках Сасо-2 экспрессия всех цепей коллагена IV находится на достаточно низком уровне (все значения меньше 7 в логарифмической шкале Affymetrix). Более того, по мере дифференцировки клеток наблюдалось небольшое снижение экспрессии генов COL4A1 и COL4A6.

Известно, что основными рецепторами коллагена IV являются интегрины $\alpha 1 \beta 1$ и $\alpha 2 \beta 1$ [21]. По данным проведенного транскриптомного анализа было показано, что ген ITGB1 ($\beta 1$ -цепь интегрин) экспрессируется на достаточно высоком уровне как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках Сасо-2 (значения в логарифмической шкале Affymetrix — 10,0 и 10,1

Таблица. Уровни экспрессии цепей коллагена IV в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 (в логарифмической шкале Affymetrix)

Ген	Средний уровень экспрессии в дифференцированных клетках Caco-2	Средний уровень экспрессии в недифференцированных клетках Caco-2	Степень изменения	FDR p
COL4A1	6,15	6,39	-1,18	0,0235
COL4A2	6,7	6,74	-1,02	0,3724
COL4A3	5,92	5,96	-1,03	0,3166
COL4A4	5,66	5,67	-1,01	0,5068
COL4A5	6,54	6,74	-1,15	0,0904
COL4A6	5,91	6,29	-1,3	0,0302

соответственно), причем его экспрессия значимо не меняется по мере дифференцировки ($p = 0,4$). Ген ITGA1 ($\alpha 1$ -цепь интегрина) тоже экспрессировался в дифференцированных и в недифференцированных клетках Caco-2 (значения в логарифмической шкале Affymetrix — 8,6 и 9,0 соответственно), однако его экспрессия слегка падала в дифференцированных клетках (в 1,3 раза; $p = 0,002$). Аналогичные результаты были получены и для гена ITGA2 ($\alpha 2$ -цепь интегрина): средние значения экспрессии в дифференцированных и недифференцированных клетках составили 9,2 и 9,5 логарифмических единиц Affymetrix, при этом небольшое снижение экспрессии в дифференцированных клетках было статистически значимым (в 1,3 раза; $p = 0,04$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из полученных данных следует, что коллаген IV является наиболее эффективным субстратом, значительно ускоряющим скорость формирования функционального эпителиального барьера клеток кишки. Известно, что некоторые цепи коллагена IV ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$) участвуют в формировании и развитии кишки, причем данные белки могут синтезировать как эпителиальные, так и мезенхимальные клетки [22]. Судя по результатам проведенного транскриптомного анализа, клетки Caco-2 не могут в достаточной мере синтезировать коллаген IV, при этом на всех стадиях они экспрессируют рецепторы к коллагену IV, что свидетельствует о возможности его влияния на жизнедеятельность клетки.

Исходя из полученных микрофотографий можно сделать вывод, что коллаген IV способствует как пролиферации, так и миграции клеток Caco-2. На сегодняшний день накоплен достаточно большой массив данных, свидетельствующих о том, что коллаген IV стимулирует прикрепление и миграцию клеток Caco-2 [23–25]. Известно также, что коллаген IV может стимулировать пролиферацию некоторых других типов эпителиальных клеток [26, 27]. Таким образом, полученные результаты хорошо согласуются с проведенными ранее исследованиями.

Ранее уже было изучено влияние коллагена IV на величину TEER монослоя клеток Caco-2 и обнаружено, что через несколько дней после посева клеток значения TEER были значительно выше в лунках, покрытых коллагеном IV, однако динамику изменений TEER в течение первых нескольких дней культивирования не определяли [28]. В данной работе было показано, что коллаген IV влияет не только на величины TEER, но и на скорость достижения минимально достаточных для проведения экспериментов с барьерными моделями значений TEER (примерно 200 Ом·см²) [9], причем таких значений точно можно добиться в течение 24 ч, а возможно и раньше. Полученная методика может быть легко перенесена как на другие статические *in vitro* модели барьерных тканей, так и на современные динамические микрофлюидные системы [29, 30].

ВЫВОДЫ

В данной работе было показано, что покрытие субстрата для роста клеток коллагеном IV существенно повышает скорость пролиферации и миграции клеток линии Caco-2. Такое воздействие позволяет быстро в течение 24 ч сформировать функциональный монослой эпителиальных клеток с плотными контактами. Был определен оптимальный диапазон начальной плотности клеток. С целью получения пригодного для проведения экспериментов кишечного барьера *in vitro* в течение 24 ч начальная плотность клеток должна лежать в диапазоне 90–200 тыс. клеток на 1 см². Обнаружено, что коллаген IV слабо экспрессируется клетками Caco-2, при этом рецепторы к коллагену IV у данных клеток экспрессированы на достаточно высоком уровне. В то же время было показано, что еще один компонент базальной мембраны (ламинин 332) не оказывает заметного влияния на скорость формирования функционального монослоя эпителиальных клеток.

Полученные результаты в будущем могут быть использованы для повышения производительности экспериментов с *in vitro* моделями кишечного барьера, как в статических условиях, так и в микрофлюидных системах.

Литература

1. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol [Internet]. 2009 Nov; 9 (11): 799–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2653>.
2. Bajic JE, Johnston IN, Howarth GS, Hutchinson MR. From the Bottom-Up: Chemotherapy and Gut-Brain Axis Dysregulation. Front Behav Neurosci [Internet]. 2018 May 22; 12 (May): 1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00104/full>.
3. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. Intest Res [Internet]. 2015; 13 (1): 11. Available from: <http://irjournal.org/journal/view.php?doi=10.5217/ir.2015.13.1.11>.
4. Varadarajan S, Stephenson RE, Miller AL. Multiscale dynamics of tight junction remodeling. J Cell Sci [Internet]. 2019 Nov 15; 132 (22): jcs229286. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.229286>.
5. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp Mol Med

- [Internet]. 2018 Aug 16; 50 (8): 103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
6. Peters MF, Landry T, Pin C, Maratea K, Dick C, Wagoner MP, et al. Human 3D Gastrointestinal Microtissue Barrier Function As a Predictor of Drug-Induced Diarrhea. *Toxicol Sci* [Internet]. 2019 Mar 1; 168 (1): 3–17. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/1/3/5145097>.
 7. Hashimoto Y, Tachibana K, Krug SM, Kunisawa J, Fromm M, Kondoh M. Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 17; 20 (16): 4016. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4016>.
 8. Hidalgo J, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* [Internet]. 1989 Mar; 96 (3): 736–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508589800721>.
 9. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Sep; 2 (9): 2111–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.303>.
 10. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* [Internet]. 2015 Apr; 20 (2): 107–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214561025>.
 11. Nikulin SV, Gerasimenko TN, Shilin SA, Zakharova GS, Gazizov IN, Poloznikov AA, et al. Application of Impedance Spectroscopy for the Control of the Integrity of In Vitro Models of Barrier Tissues. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2019 Feb 19; 166 (4): 512–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-019-04384-5>.
 12. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2019; 7: 474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32039179>.
 13. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2006 Feb 3; 22 (1): 186–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050208u>.
 14. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *J Pharm Sci* [Internet]. 2000 Jan; 89 (1): 63–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916305408>.
 15. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012 Dec; 64 (SUPPL.): 280–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002657>.
 16. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19. Available from: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-019-0686-y>.
 17. Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014 Feb; 25: 95–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913006794>.
 18. Caicedo HH, Brady ST. Microfluidics: The Challenge Is to Bridge the Gap Instead of Looking for a “Killer App.” *Trends Biotechnol* [Internet]. 2016; 34 (1): 1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.003>.
 19. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2018 Nov 12; 166 (1): 35–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-018-4283-7>.
 20. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo₂ cells in microfluidic chip. *Bio Chip J*. 2016 Sep; 10 (3): 215–20.
 21. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2008 May; 71 (5): 357–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20564>.
 22. Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* [Internet]. 1998 Jul; 212 (3): 437–47. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199807\)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y).
 23. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* [Internet]. 1992 Jul 1; 90 (1): 15–23. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/115828>.
 24. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 cell spreading and p130Cas phosphorylation by FAK-dependent and FAK-independent pathways. *Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 1; 389 (1): 47–55. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2008.389.issue-1/bc.2008.008/bc.2008.008.xml>.
 25. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via $\alpha 1 \beta 1$ - and $\alpha 2 \beta 1$ -integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2004 Apr; 286 (4): G547–57. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00262.2003>.
 26. Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol* [Internet]. 2018 May; 27 (5): 443–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13328>.
 27. Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 Dec 26; 13 (1): 154. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-154>.
 28. Vlasaliu D, Falcone FH, Stolnik S, Garnett M. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Apr; 323 (1): 218–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.022>.
 29. Maoz BM, Herland A, Henry OYF, Leineweber WD, Yadid M, Doyle J, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip* [Internet]. 2017; 17 (13): 2294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00412E>.
 30. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* [Internet]. 2012; 12 (12): 2165. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40074j>.

References

1. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Nov; 9 (11): 799–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2653>.
2. Bajic JE, Johnston IN, Howarth GS, Hutchinson MR. From the Bottom-Up: Chemotherapy and Gut-Brain Axis Dysregulation. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2018 May 22; 12 (May): 1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00104/full>.
3. Lee SH. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res* [Internet]. 2015; 13 (1): 11. Available from: <http://irjournal.org/journal/view.php?doi=10.5217/ir.2015.13.1.11>.
4. Varadarajan S, Stephenson RE, Miller AL. Multiscale dynamics of tight junction remodeling. *J Cell Sci* [Internet]. 2019 Nov 15; 132 (22): jcs229286. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.229286>.
5. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*

- [Internet]. 2018 Aug 16; 50 (8): 103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
6. Peters MF, Landry T, Pin C, Maratea K, Dick C, Wagoner MP, et al. Human 3D Gastrointestinal Microtissue Barrier Function As a Predictor of Drug-Induced Diarrhea. *Toxicol Sci* [Internet]. 2019 Mar 1; 168 (1): 3–17. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/1/3/5145097>.
 7. Hashimoto Y, Tachibana K, Maratea K, Krug SM, Kunisawa J, Fromm M, Kondoh M. Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 17; 20 (16): 4016. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4016>.
 8. Hidalgo J, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* [Internet]. 1989 Mar; 96 (3): 736–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508589800721>.
 9. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Sep; 2 (9): 2111–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.303>.
 10. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J Lab Autom* [Internet]. 2015 Apr; 20 (2): 107–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214561025>.
 11. Nikulin SV, Gerasimenko TN, Shilin SA, Zakharova GS, Gazizov IN, Poloznikov AA, et al. Application of Impedance Spectroscopy for the Control of the Integrity of In Vitro Models of Barrier Tissues. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2019 Feb 19; 166 (4): 512–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-019-04384-5>.
 12. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2019; 7: 474. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32039179>.
 13. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2006 Feb 3; 22 (1): 186–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp050208u>.
 14. Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *J Pharm Sci* [Internet]. 2000 Jan; 89 (1): 63–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916305408>.
 15. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012 Dec; 64 (SUPPL.): 280–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002657>.
 16. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2019 Mar 5; 13 (Suppl 1): 19. Available from: <https://bmcsystbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12918-019-0686-y>.
 17. Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014 Feb; 25: 95–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913006794>.
 18. Caicedo HH, Brady ST. Microfluidics: The Challenge Is to Bridge the Gap Instead of Looking for a “Killer App.” *Trends Biotechnol* [Internet]. 2016; 34 (1): 1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.003>.
 19. Nikulin SV, Knyazev EN, Gerasimenko TN, Shilin SA, Gazizov IN, Zakharova GS, et al. Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2018 Nov 12; 166 (1): 35–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-018-4283-7>.
 20. Samatov TR, Senyavina NV, Galatenko VV, Trushkin EV, Tonevitskaya SA, Alexandrov DE, et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCO₂ cells in microfluidic chip. *Bio Chip J*. 2016 Sep; 10 (3): 215–20.
 21. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2008 May; 71 (5): 357–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20564>.
 22. Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* [Internet]. 1998 Jul; 212 (3): 437–47. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199807\)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3%3C437::AID-AJA11%3E3.0.CO;2-Y).
 23. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* [Internet]. 1992 Jul 1; 90 (1): 15–23. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/115828>.
 24. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 cell spreading and p130Cas phosphorylation by FAK-dependent and FAK-independent pathways. *Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 1; 389 (1): 47–55. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2008.389.issue-1/bc.2008.008/bc.2008.008.xml>.
 25. Sanders MA, Basson MD. Collagen IV regulates Caco-2 migration and ERK activation via $\alpha 1 \beta 1$ - and $\alpha 2 \beta 1$ -integrin-dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2004 Apr; 286 (4): G547–57. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00262.2003>.
 26. Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol* [Internet]. 2018 May; 27 (5): 443–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13328>.
 27. Öhlund D, Franklin O, Lundberg E, Lundin C, Sund M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 Dec 26; 13 (1): 154. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-154>.
 28. Vlasaliu D, Falcone FH, Stolnik S, Garnett M. Basement membrane influences intestinal epithelial cell growth and presents a barrier to the movement of macromolecules. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Apr; 323 (1): 218–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.022>.
 29. Maoz BM, Herland A, Henry OYF, Leineweber WD, Yadid M, Doyle J, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip* [Internet]. 2017; 17 (13): 2294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00412E>.
 30. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* [Internet]. 2012; 12 (12): 2165. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2lc40074j>.

ЛОКАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ОРИГИНАЛЬНОЙ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ С МЕЛАТОНИНОМ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

М. В. Осиков¹, Е. В. Симонян¹, А. А. Агеева¹ ✉, Ю. И. Агеев¹, А. А. Федосов², А. И. Синицкий¹

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

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

Эскалация оксидативного стресса (ОС) при термической травме (ТТ) и плейотропные эффекты мелатонина (МТ) являются предпосылкой для изучения его протекторных свойств в составе новой дермальной пленки (ДП) при ожогах кожи. Цель работы — оценить содержание маркеров ОС в коже при экспериментальной ТТ и применении ДП с МТ. ТТ IIIA степени площадью 3,5% моделировали погружением участка кожи в кипящую воду. ДП площадью 12 см² с МТ в концентрации 5 мг/г наносили ежедневно в течение 5 сут. Вычисляли площадь раны и скорость ее эпителизации. В ожоговой ране определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в спонтанном и металл-зависимом режимах. При ТТ в ране на 5-е и 10-е сут. увеличилось содержание вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, суммарное содержание продуктов ОМБ за счет первичных продуктов нейтрального характера на 5-е сут., первичных и вторичных продуктов нейтрального характера на 10-е сут. Применение ДП при ТТ уменьшило площадь ожога, увеличило скорость эпителизации раны (на 10-е сут. по медиане с 1,90% до 6,57%; $p < 0,05$), снизило содержание в изопропанольной фазе вторичных и конечных (на 10-е сут. по медиане с 0,007 до 0,004 е.и.о.; $p < 0,05$) продуктов ПОЛ, снизило суммарное содержание продуктов ОМБ на 5-е сут. за счет первичных продуктов нейтрального характера, на 10-е сут. за счет первичных и вторичных продуктов нейтрального характера. При ТТ в условиях применения МТ площадь ожога ассоциирована с содержанием в ране вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, суммарным содержанием продуктов ОМБ, содержанием первичных, вторичных, основного и нейтрального характера продуктов ОМБ.

Ключевые слова: термическая травма, окислительный стресс, мелатонин, дермальная пленка

Вклад авторов: М. В. Осиков — концепция и дизайн исследования, интегральный анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; Е. В. Симонян — набор экспериментального материала, анализ полученных данных; А. А. Агеева — набор экспериментального материала, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание текста; Ю. И. Агеев — набор экспериментального материала, статистическая обработка и анализ полученных данных; А. А. Федосов — анализ результатов, редактирование рукописи; А. И. Синицкий — набор экспериментального материала, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета г. Челябинск (протокол № 10 от 15 ноября 2019 г.), выполнено в стандартных условиях вивария при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург), Рекомендациями Европейской комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 г. по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях, а также Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии.

✉ Для корреспонденции: Анна Алексеевна Агеева
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Статья получена: 03.10.2020 Статья принята к печати: 23.10.2020 Опубликовано онлайн: 10.11.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.070

LOCAL ANTIOXIDANT EFFECT OF ORIGINAL DERMAL FILM WITH MELATONIN IN THERMAL INJURY

Osikov MV¹, Simonyan EV¹, Ageeva AA¹ ✉, Ageev Yul¹, Fedosov AA², Sinitsky AI¹

¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Oxidative stress (OS) escalation associated with thermal trauma (TT) and pleiotropic effects of melatonin (MT) suggest a study of protective properties of the latter when applied as part of a novel dermal film (DF) to skin burns. This work aimed to assess the content of OS markers in the skin subjected to experimental TT and treated with DF with MT. Third A degree TT (area of 3.5%) were modeled by immersing a patch of skin in boiling water. Twelve cm² of DF with 5 mg/g of MT were applied daily for 5 days. The parameters calculated were wound's area and epithelialization rate. The products monitored in the burn wound were lipid peroxidation (LPO) products in heptane and isopropanol phases of the lipid extract and protein oxidative modification (POM) products, the modification being spontaneous and metal-dependent. With TT in the wound, the content of secondary and end LPO products in heptane and isopropanol phases increased on the 5th and 10th days; the total content of POM products grew on the 5th day (primary products, neutral) and on the 10th day (primary and secondary products, neutral). Application of DF to a TT wound reduced the burn area, increased the epithelialization rate (by the 10th day, the median went from 1.90% to 6.57%; $p < 0.05$), reduced the content of secondary and end LPO products in isopropanol phase (by the 10th day, the median went from 0.007 to 0.004 u.o.i.; $p < 0.05$), reduced the total content of OMP products, namely that of primary neutral products — on the 5th day, of primary and secondary neutral products — on the 10th day. With TT present in the context of MT application, the burn area showed presence of secondary LPO products in heptane and isopropanol phases, LPO end products in isopropanol phase, POM products in the wound (basic and neutral primary/secondary POM products).

Keywords: thermal trauma, oxidative stress, melatonin, dermal film

Author contribution: MV Osikov — study concept and design, integrated analysis of the data obtained, authoring, manuscript editing; EV Simonyan — experimental material collection, analysis of the data obtained; AA Ageeva — experimental material collection, statistical processing and analysis of the data obtained, authoring; Yul Ageev — experimental material collection, statistical processing and analysis of the data obtained; AA Fedosov — analysis of the results, manuscript editing; AI Sinitsky — experimental material collection, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University, Chelyabinsk (Minutes #10 of November 15, 2019), carried out in standard vivarium conditions with strict adherence to the requirements for animal keeping and care, as well as withdrawal of animals from the experiment and subsequent disposal in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or Other Scientific Purposes (ETS № 123 of March 18, 1986, Strasbourg), EC Recommendations 2007/52/EC of June 18, 2007 outlining procedures of keeping and care for animals used for experimental and other scientific purposes, as well as the European Parliament and EU Council Directive 2010/63/EU of September 22, 2010 on protection of animals used for scientific purposes as governed by the rules of humane treatment of animals, guidelines for their withdrawal from experiments and euthanasia.

✉ Correspondence should be addressed: Anna A. Ageeva
Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Received: 03.10.2020 Accepted: 23.10.2020 Published online: 10.11.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.070

Ежегодно в Российской Федерации регистрируют около 250 тыс. случаев ожогов, из них на долю термической травмы (ТТ) приходится около 80% [1]. Наиболее частыми причинами ТТ являются горячая жидкость и пламя, у двух третей больных площадь ожога составляет менее 10% поверхности тела [2]. Изучение патофизиологии ожоговой раны актуально для ограничения ее прогрессирования и разработки новых патогенетически обоснованных методов сохранной некрэктомии и закрытия раны, современных заменителей. Скорость заживления ожоговой раны, неблагоприятный исход и формирование осложнений при ТТ зависят не только от площади и глубины повреждения, выраженности воспалительного, острофазового ответа и иммунных реакций, но и от локального редокс-статуса [3]. Основными мишенями свободных радикалов в коже служат липиды и белки, продуктами такого взаимодействия выступают метаболиты пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) соответственно. Показана роль продуктов ПОЛ в повреждении ДНК, мутагенных и канцерогенных эффектах, модификации мембранных белков, ферментов, сигнальных молекул [4]. В патогенезе ТТ взаимосвязь воспаления и редокс-статуса в рамках концепции «OxInflammation» описывает проокислительный потенциал очага повреждения с положительной обратной связью с событиями воспалительного процесса, перекрестные взаимодействия медиаторов воспаления и редокс-статуса с возможным исходом в SIRS [5]. Биомаркерами «OxInflammation», в том числе, выступают гидроперекиси липидов 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид, карбонильные производные белков 3-нитротирозин, гидроксигуанозин и др. Обнаружение альдегид- или кетонсодержащих карбонильных производных белков (продуктов ОМБ) и продуктов ПОЛ как маркеров окислительного стресса и эффективности применения антиоксидантов при патологических ситуациях представляет несомненный интерес [6].

Для локальной терапии термических поражений кожи ограниченной площади в настоящее время чаще всего применяют разные виды раневых покрытий, они позволяют исключить болевые ощущения при перевязках, создать «влажную» среду в ране, способствующую дифференцировке клеток, эффективному межклеточному взаимодействию и сокращению сроков лечения. Применяют абсорбирующие повязки, атравматичные (чаще тюлевые) на основе натуральных волокон, порошковые (ксерогелевые), губчатые из пористого материала, гидрогелевые повязки из нерастворимых полимеров, гидроколлоидные из гелеобразующих веществ, пленочные повязки из полупроницаемых полимерных материалов и др. [7]. Универсального покрытия нет, выбор повязки зависит от стадии раневого процесса, степени экссудации и наличия осложнений. Около 80% раневых покрытий выпускают зарубежные фирмы-производители, поэтому исследования по разработке оригинальной дермальной пленки (ДП) востребованы и перспективны. В состав пленочных покрытий могут входить различные фармакологически активные вещества (антимикробные, антисептические, анальгетики и др.), особый интерес вызывают эндогенные регуляторы гомеостаза с плейотропными эффектами [8–11]. Мелатонин (МТ) наряду с регуляцией ритмов сна и бодрствования обладает мультитропными эффектами, включая антиоксидантное действие, про- и противовоспалительное, иммуномодулирующее, антиапоптогенное, регулирующее

пролиферацию и дифференцировку клеток, анти-aging и др., которые привлекают внимание в связи с возможностью применения МТ для терапии заболеваний [12]. Сведения о локальном применении МТ в составе ДП при ТТ в доступной литературе отсутствуют.

Целью исследования было оценить содержание маркеров оксидативного стресса в коже при экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной ДП с МТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 88 крысах-самцах линии Wistar массой 200–240 г. Животные были случайным образом разделены на три группы: группа 1 ($n = 20$) — интактный контроль; группа 2 ($n = 36$) — животные с ТТ; группа 3 ($n = 32$) — животные с ТТ в условиях применения ДП с МТ. Для моделирования ТТ IIIA степени и относительной площадью 3,5% межлопаточный участок кожи погружали в очищенную воду при 98–99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. Экспериментальную модель с использованием горячей воды исследователи наиболее часто рассматривают как стандарт ТТ. Для анестезии использовали препарат «Золетил 100» (тилетамин, золазепам) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Пленку с МТ площадью 12 см² в группе 3 наносили сразу после ТТ, закрепляя асептической повязкой, перевязку осуществляли ежедневно в течение 5 суток. В предварительных исследованиях был разработан состав ДП на основе натрийкарбоксиметилцеллюлозы (поли-1,4-β-О-карбоксиметил-Д-пиранозил-Д-гликопираноза натрия), включен МТ в концентрации 5 мг/г, проведена ее оценка по фармако-технологическим параметрам: органолептическим показателям (вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие примесей и микротрещин), адгезивной способности, механической прочности на разрыв, толщине (заявка на патент № 2020118766). Для вычисления площади раны через 24 ч, на 5-е и 10-е сутки после ТТ методом цифровой планиметрии использовали фотокамеру «Nikon Coolpix S2800» (Nikon; Китай) и пакет программ «Microsoft Office Visio» (Microsoft; США). Скорость эпителизации (VS) рассчитывали по формуле: $VS = (S - S_n) / t$, где S — начальная площадь раны до лечения (в дальнейшем, площадь при предыдущем измерении); S_n — площадь при последующем измерении; t — число дней между измерениями. Площадь раны в последующих измерениях определяли в %, принимая за 100% площадь до лечения, результат выражали в % / сут.

Для приготовления 10% гомогената кожи ожоговую рану иссекали, помещали в охлажденный 0,1 М раствор фосфатного буфера (pH 7,4), после около 40 мг ткани гомогенизировали в стеклянном механическом гомогенизаторе в соотношении 1 : 10 в течение 3 мин при 4 °С с последующим получением 1 мл гомогената. Содержание продуктов ПОЛ в гомогенате определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО-Спектр»; Санкт-Петербург) по описанной ранее методике [13]. В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов, ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов, КД и СТ), 400 нм (основания Шиффа, ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 (ДК), E278/E220 (КД и СТ) и E400/E220 (ШО). Продукты

ОМБ в гомогенате определяли по реакции карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином в спонтанном и металлзависимом по реакции Фентона режимах с последующей регистрацией на спектрофотометре альдегиддинитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) в ультрафиолетовой (УФ) части спектра и области видимого света [14]. Результат выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка (у.е./мг) или в относительных величинах (%). Резервноадаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали, как отношение разницы суммарного содержания продуктов ОМБ в индуцированном и спонтанном режимах к содержанию продуктов ОМБ в металлзависимом режиме. Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 (SPSS: An IBM Company; США). Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q_1 – Q_3). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскелла–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке параметров репарации ожоговой раны обнаружено, что в динамике наблюдений на 10-е сутки наблюдения по сравнению с 5-ми сутками эксперимента уменьшаются абсолютная площадь и относительная площадь раневого дефекта, что приводит к увеличению расчетных показателей — скорости эпителизации раны и доли уменьшения ее площади (табл. 1). На 5-е и 10-е сутки экспериментальной ТТ выявлены изменения содержания продуктов ПОЛ в гомогенате кожи, полученном из ожоговой раны (рис. 1, 2). Так, на 5-е сутки в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта статистически значимо увеличилось содержание кетодиенов, сопряженных триенов и Шиффовых оснований. Как известно, в гептановой фазе происходит накопление преимущественно резервных липидов (триацилглицеридов), а в изопропанольной — мембранных фосфолипидов. Оценка содержания продуктов ПОЛ на 10-е сутки ТТ выявила в гептановой фазе липидного экстракта значимое повышение кетодиенов и сопряженных триенов, Шиффовых оснований, в изопропанольной фазе — повышение только Шиффовых оснований. Содержание в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта гомогената кожи ожоговой раны первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) значимо не изменилось на 5-е и 10-е сутки (рис. 2). В динамике ТТ содержание продуктов ПОЛ в ожоговой ране

снижается: на 10-е сутки по сравнению с 5-ми сутками в гептановой фазе липидного экстракта снижается ($p < 0,01$) содержание Шиффовых оснований, в изопропанольной фазе ($p < 0,01$) — содержание кетодиенов, сопряженных триенов и Шиффовых оснований.

Результаты исследования продуктов ОМБ в гомогенате кожи ожоговой раны представлены в табл. 2. На 5-е и 10-е сутки эксперимента увеличилось суммарное количество продуктов ОМБ. В динамике ТТ суммарное содержание продуктов ОМБ возросло на 10-е сутки по сравнению с 5-ми ($p < 0,01$). При анализе содержания компонентов ОМБ в гомогенате кожи ожоговой раны в спонтанном режиме выявлено, что на 5-е сутки ТТ значимо увеличилось содержание АДНФГ в области УФ-света, суммарное содержание АДНФГ, суммарное содержание продуктов ОМБ в УФ-части спектра. Содержание в гомогенате кожи ожоговой раны на 5-е сутки КДНФГ в УФ- и видимой части спектра значимо не изменилось. На 10-е сутки ТТ зафиксированы неоднозначные изменения различных продуктов ОМБ в ожоговой ране: увеличилось количество АДНФГ и КДНФГ в УФ-части спектра, содержание АДНФГ и КДНФГ в видимой части спектра значимо снизилось. Как следствие, на 10-е сутки ТТ увеличилось суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, суммарное содержание продуктов ОМБ в УФ-части спектра, снизилось суммарное содержание продуктов ОМБ в видимой части спектра. Отметим, что суммарное содержание продуктов ОМБ в видимой части спектра на 10-е сутки значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 5-е сутки.

Проведена оценка РАП в гомогенате кожи ожоговой раны при экспериментальной ТТ путем вычисления разницы между содержанием продуктов ОМБ в металлдуцированном и спонтанном режимах и ее доли в содержании продуктов ОМБ в металлдуцированном режиме (см. табл. 2). Для этого исследовали содержание продуктов ОМБ в гомогенате кожи ожоговой раны после индукции окисления белков компонентами реакционной смеси, содержащей Fe^{2+} и H_2O_2 , что сопровождается образованием высокореакционного радикала OH — в реакции Фентона. Это позволяет оценить прирост образования *in vitro* под действием реактива Фентона карбонильных производных с подсчетом отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному. Обнаружено, что показатели ОМБ в металлдуцированном режиме в гомогенате кожи ожоговой раны повысились на 5-е и 10-е сутки экспериментальной ТТ в отношении суммарного содержания продуктов ОМБ, содержания АДНФГ и КДНФГ при оценке в области как УФ, так и видимого спектра. Кроме этого, увеличилось суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ в области УФ и видимого спектра, а также

Таблица 1. Влияние МТ в составе ДП на показатели репарации раны при экспериментальной ТТ (Me (Q_{25} ; Q_{75}))

Показатель	Группа 2 ТТ 5-е сутки (n = 16)	Группа 2 ТТ 10-е сутки (n = 20)	Группа 3 ТТ+МТ 5-е сутки (n = 16)	Группа 3 ТТ+МТ 10-е сутки (n = 16)
Площадь ожога, см ²	11,66 (11,50; 11,94)	9,48 (9,28; 9,93)*	10,33 (10,17; 10,56)*	8,34 (8,19; 8,51)*
Относительная площадь, %	3,34 (3,25; 3,39)	3,17 (3,10; 3,29)*	3,36 (3,23; 3,42)	3,02 (2,91; 3,13)*
Скорость эпителизации, %/сут.	0,89 (0,86; 0,89)	1,90 (1,88; 1,95)*	1,33 (1,29; 1,35)*	6,57 (5,92; 6,93)*
Уменьшение площади раны, %	2,61 (2,59; 2,64)	3,68 (3,53; 4,23)*	9,80 (9,64; 10,08)*	16,10 (14,62; 17,73)*

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 2 на 5-е сутки; * — с группой 2 на соответствующие сутки.

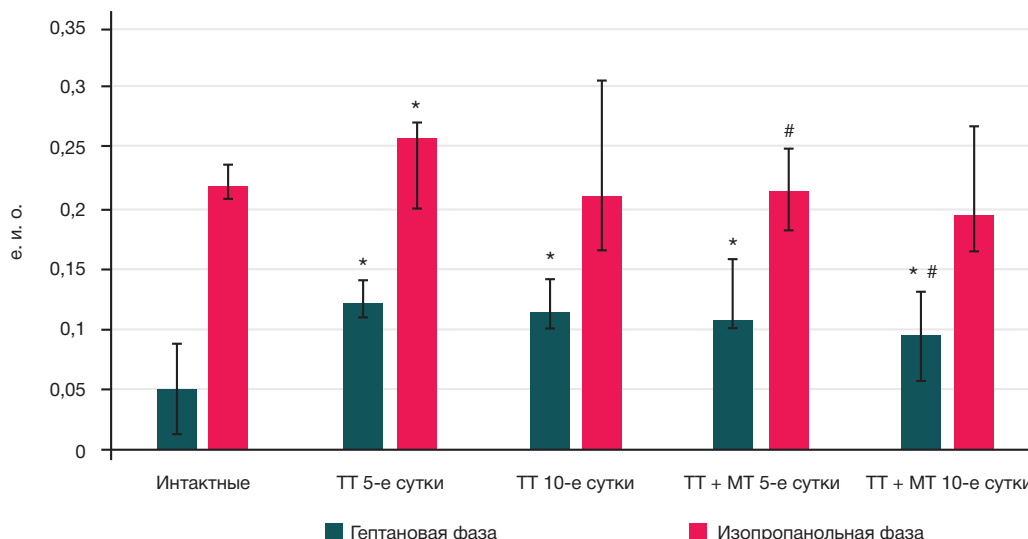


Рис. 1. Влияние МТ в составе ДП на содержание кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой и изопропанольной фазах гомогената кожи при экспериментальной ТТ (Me (Q_{25} ; Q_{75})). * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # — с группой 2

суммарное содержание продуктов ОМБ в УФ и видимой части спектра. Как видно, изменения показателей ОМБ в металлдуцированном режиме по своей направленности соответствуют изменениям показателей ОМБ в спонтанном режиме на 5-е сутки и, за исключением содержания продуктов ОМБ в видимой части спектра, на 10-е сутки ТТ. Общий РАП, оцениваемый по суммарному содержанию продуктов ОМБ, значимо повысился на 5-е сутки и не изменился на 10-е сутки экспериментальной ТТ. Данное изменение РАП на 5-е сутки ТТ обусловлено его повышением в отношении АДНФГ и КДНФГ в области УФ и видимого спектра, но преимущественно — АДНФГ в области видимого спектра и КДНФГ в области УФ и видимого спектра. Общий РАП при ТТ на 10-е сутки значимо ($p < 0,01$) снижался по сравнению с 5-ми сутками эксперимента.

Установлено, что применение ДП с МТ при ТТ приводит к статистически значимому уменьшению площади ожоговой раны в абсолютных величинах на 5-е и 10-е сутки, в относительных величинах — на 10-е сутки (см. табл. 1). На 5-е и 10-е сутки наблюдения увеличились скорость эпителизации раны и относительное

уменьшение площади раны. На 5-е сутки ТТ абсолютная площадь ожоговой поверхности уменьшилась на 11% по медиане, максимальные изменения зафиксированы на 10-е сутки, когда абсолютная площадь раневого дефекта уменьшилась на 12%, а скорость эпителизации возросла на 246% по медиане относительно группы животных с ТТ без применения ДП с МТ. В динамике экспериментальной ТТ на 10-е сутки по сравнению с 5-ми сутками значимо ($p < 0,01$) уменьшилась площадь ожога, увеличились скорость эпителизации раны и относительное уменьшение площади раны. В условиях применения МТ в составе ДП нами зафиксированы изменения содержания продуктов ПОЛ в липидном экстракте гомогената кожи ожоговой раны при ТТ (см. табл. 2). На 5-е сутки наблюдения статистически значимо уменьшилось содержание кетодиенов и сопряженных триенов, а также Шиффовых оснований в изопропанольной фазе липидного экстракта. Содержание диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, а также оснований Шиффа в гептановой фазе, и оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта значимо не отличалось от содержания у группы животных с ТТ без применения ДП с МТ. На

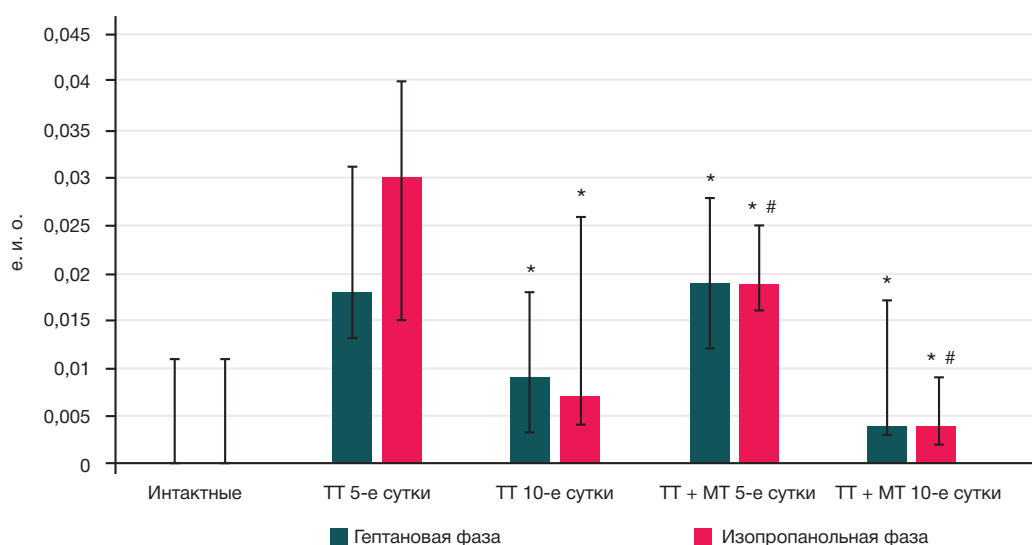


Рис. 2. Влияние МТ в составе ДП на содержание Шиффовых оснований в гептановой и изопропанольной фазах гомогената кожи при экспериментальной ТТ (Me (Q_{25} ; Q_{75})). * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # — с группой 2

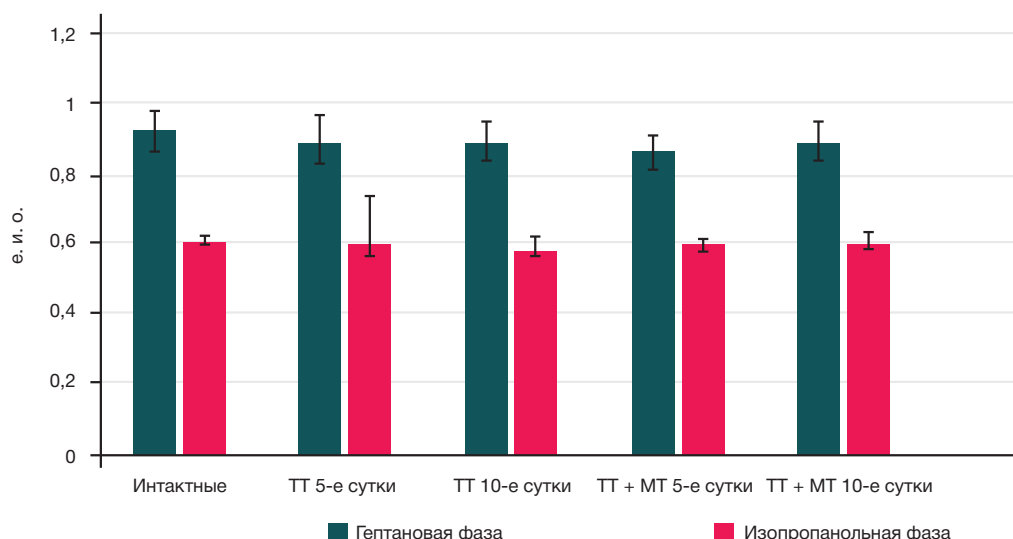


Рис. 3. Влияние МТ в составе ДП на содержание диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазах гомогената кожи при экспериментальной ТТ (Me (Q_{25} ; Q_{75}))

10-е сутки эксперимента выявлено значимое снижение кетодиенов и сопряженных триенов в гептановой фазе, оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта гомогената кожи ожоговой раны. Полученные данные свидетельствуют о максимальном эффекте МТ в составе ДП при ТТ в изопропанольной фазе липидного экстракта гомогената кожи ожоговой раны. В динамике ТТ содержание в гептановой и изопропанольной фазах вторичных и конечных продуктов ПОЛ на 10-е сутки было меньше ($p < 0,01$), чем на 5-е сутки ТТ, что соответствует изменению содержания продуктов ПОЛ в динамике ТТ без применения ДП с МТ.

Применение МТ в составе ДП при ТТ приводит к изменению содержания продуктов ОМБ в ожоговой ране (см. табл. 2). На 5-е сутки эксперимента в спонтанном режиме снизилось содержание АДНФГ в области УФ-спектра, суммарное содержание АДНФГ, суммарное содержание продуктов ОМБ в области УФ-спектра и, как следствие, снизилось суммарное содержание продуктов ОМБ. Следует отметить, что указанные показатели не отличаются от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить об их полном восстановлении. На 10-е сутки ТТ в спонтанном режиме суммарное содержание продуктов ОМБ снизилось и не достигло значений в группе интактных животных, т. е. восстановилось частично. На этом фоне содержание АДНФГ и КДНФГ в области УФ-света, суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, продуктов ОМБ в области УФ-света снизилось и полностью восстановилось в отношении КДНФГ в области УФ-света, продуктов ОМБ в области УФ-света. При оценке РАП выявлено его снижение на 5-е сутки за счет примерно равнозначного вклада исследуемых первичных и вторичных продуктов ОМБ в области видимого и УФ-света. РАП на 10-е сутки ТТ в условиях применения МТ в составе ДП повысился за счет преимущественного увеличения РАП в отношении АДНФГ и КДНФГ в области видимого спектра, КДНФГ в области УФ-спектра.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами установлено, что в очаге термического повреждения кожи увеличивается количество вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта. При ТТ увеличивается

суммарное количество карбонильных производных белков — необратимых продуктов окислительного стресса, формирующихся за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия с продуктами ПОЛ и редуцирующими сахарами. Поскольку в области УФ-спектра накапливаются карбонильные производные нейтрального характера, а в видимой — основного характера, то относительный анализ суммарного содержания карбониллов в области УФ-света и в области видимого света позволяет оценить природу образовавшихся продуктов в динамике ТТ. На 5-е и 10-е сутки ТТ наблюдается преимущественное накопление продуктов ОМБ нейтрального характера, о чем свидетельствует повышение суммарного количества продуктов в области УФ-спектра. Суммарное содержание в коже при экспериментальной ТТ АДНФГ повышается на 5-е и 10-е сутки, содержание КДНФГ — на 10-е сутки. Данный факт позволяет констатировать на 5-е и 10-е сутки ТТ накопление первичных продуктов ОМБ, т. е. ранних маркеров окислительной деструкции белка, а также преимущественно агрегацию белков под влиянием OH^\cdot , а на 10-е сутки — накопление вторичных продуктов ОМБ, т. е. поздних маркеров окислительной деструкции белка, а также преимущественно фрагментацию белков под влиянием совместного действия радикалов OH^\cdot и O_2^\cdot . Белковые фрагменты высокоустойчивы к протеолизу, имеют токсические свойства и могут инициировать апоптоз или некроз клеток, расширяя зону вторичной альтерации. Кожа — самый большой орган с интенсивно протекающими процессами ПОЛ и ОМБ, а образующиеся в ней продукты ПОЛ и ОМБ могут оказывать локальное и дистантное цитотоксическое действие [15]. Окислительный стресс при ожогах фиксируют не только в очаге повреждения, но и в сердце, легких, почках и других органах, где обнаруживают продукты повреждения белков, липидов, ДНК [16]. Основные индукторы окислительного стресса после ТТ — это активированные нейтрофилы, моноциты / макрофаги, эндотелиоциты с известными системами генерации активных форм кислорода (АФК): НАДФН-оксидаза и МПО, ксантиноксидаза, NO-синтаза [17]. В эскалации окислительного стресса при ТТ имеет значение повышение продукции эндогенных глюкокортикоидов [18]. Вклад в патогенез окислительного стресса при ТТ вносит истощение системы антиокислительной защиты —

Таблица 2. Влияние МТ в составе ДП на содержание продуктов ОМБ в гомогенате кожи при экспериментальной ТТ (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатель	Группа 1 Интakтные (n = 20)	Группа 2 ТТ 5-е сутки (n = 16)	Группа 2 ТТ 10-е сутки (n = 20)	Группа 3 ТТ + МТ 5-е сутки (n = 16)	Группа 3 ТТ + МТ 10-е сутки (n = 16)
S _{АДНФГ} uv (сп), у.е./мг	29,85 (24,69; 32,84)	51,49 (48,03; 55,81)*	60,50 (52,95; 93,13)*	32,87 (31,04; 48,35)#	53,71 (45,11; 59,16)*#
S _{АДНФГ} vs (сп), у.е./мг	6,93 (5,32; 8,71)	6,91 (5,72; 9,75)	3,53 (2,09; 5,07)*	7,09 (5,17; 12,27)	5,24 (3,10; 7,17)*#
S _{КДНФГ} uv (сп), у.е./мг	8,19 (7,37; 10,59)	7,79 (7,34; 9,43)	15,19 (9,05; 25,63)*	9,29 (7,56; 16,39)	8,22 (6,48; 12,61)#
S _{КДНФГ} vs (сп), у.е./мг	0,89 (0,69; 1,14)	0,91 (0,69; 1,41)	0,50 (0,35; 0,66)*	0,79 (0,66; 1,42)	0,45 (0,27; 0,77)
S ОМБ (сп), у.е./мг	47,83 (41,94; 55,40)	66,87 (60,56; 76,11)*	79,30 (62,59; 122,34)*	49,97 (41,94; 79,07)#	64,65 (56,91; 76,64)*#
S _{АДНФГ} (сп), у.е./мг	38,54 (30,64; 41,39)	59,19 (52,29; 62,31)*	65,04 (54,51; 96,45)*	40,77 (35,11; 64,89)#	57,90 (48,93; 64,39)*#
S _{КДНФГ} (сп), у.е./мг	10,12 (8,23; 11,31)	8,81 (8,09; 10,67)	15,49 (9,56; 26,11)*	10,28 (8,23; 18,01)	8,97 (6,76; 13,15)#
S uv (сп), у.е./мг	38,47 (34,05; 45,31)	59,10 (53,57; 68,66)*	74,97 (60,81; 118,45)*	40,94 (36,99; 64,74)#	61,28 (52,69; 70,97)*#
S vs (сп), у.е./мг	7,87 (6,02; 9,73)	7,81 (6,41; 11,16)	4,05 (2,35; 5,85)*	7,88 (5,84; 13,69)	5,67 (3,37; 7,89)#
S _{АДНФГ} uv (инд), у.е./мг	90,68 (70,81; 94,67)	386,82 (279,79; 542,03)*	178,71 (128,45; 239,17)*	260,81 (94,29; 50,90)*#	211,60 (140,76; 235,78)*
S _{АДНФГ} vs (инд), у.е./мг	18,81 (16,01; 21,09)	156,21 (90,34; 244,15)*	37,79 (29,25; 60,75)*	91,49 (19,62; 264,02)*#	68,35 (45,15; 100,18)*#
S _{КДНФГ} uv (инд), у.е./мг	28,73 (24,72; 37,55)	208,12 (128,85; 320,23)*	76,51 (45,82; 94,77)*	125,89 (29,35; 333,99)*#	93,56 (60,57; 127,56)*#
S _{КДНФГ} vs (инд), у.е./мг	2,07 (1,62; 2,32)	14,53 (8,45; 22,58)*	3,84 (2,93; 6,02)*	8,84 (2,32; 26,09)*#	6,61 (4,68; 9,76)*#
S ОМБ (инд), у.е./мг	140,38 (113,93; 155,46)	771,61 (507,38; 1128,99)*	312,84 (207,79; 393,90)*	487,04 (145,58; 1175,01)*#	378,89 (262,70; 476,87)*#
S _{АДНФГ} (инд), у.е./мг	109,49 (87,20; 115,77)	548,02 (370,12; 786,18)*	230,51 (157,87; 301,83)*	352,30 (113,90; 814,93)*#	277,53 (197,90; 338,84)*
S _{КДНФГ} (инд), у.е./мг	30,82 (26,73; 39,69)	223,59 (137,26; 342,81)*	80,12 (48,56; 101,26)*	134,74 (31,67; 360,08)*	99,88 (64,40; 138,03)*#
S uv (инд), у.е./мг	119,47 (95,53; 132,23)	594,94 (408,64; 862,26)*	252,79 (175,39; 344,84)*	386,71 (123,64; 884,89)*#	304,79 (218,89; 363,53)*#
S vs (инд), у.е./мг	20,91 (17,63; 23,23)	170,73 (98,74; 266,73)*	41,63 (32,13; 66,99)*	100,33 (21,94; 290,12)*#	74,96 (49,83; 109,94)*#
РАП, %	61,81 (53,98; 72,55)	91,66 (86,44; 94,78)*	69,22 (62,76; 74,76)	83,77 (71,19; 96,33)*	81,15 (74,35; 86,09)*#

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # — с группой 2.

снижается содержание восстановленного глутатиона, активность СОД, каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО) [19]. Показано снижение уровня в организме цинка и меди, входящих в состав СОД, за счет их потери с мочой и экссудатом в ожоговой ране, а также дефицит компонента ГПО селена из-за снижения поступления через ЖКТ после ожогов [20]. Показана роль железа в активации оксидативного метаболизма при ТТ. АФК в ожоговой ране ассоциированы не только с деструкцией тканей и негативными последствиями, но также участвуют в активации проматричной металлопротеиназа, репарации кожи после ТТ [21]. АФК играют важную роль в модификации компонентов экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани — гликозаминогликанов, коллагенов и неколлагиновых гликопротеинов. Важна роль АФК в репарации ран за счет активации сигнальных путей в стволовых клетках [22]. АФК, генерируемые в фазу воспаления при ТТ, индуцируют локальный синтез про- и противовоспалительных цитокинов.

По результатам проведенного исследования, применение МТ в составе ДП при ТТ ускоряет заживление ожоговой раны, уменьшает ее площадь и снижает содержание метаболитов окислительного стресса — продуктов ПОЛ и ОМБ. На 5-е сутки ТТ снижается содержание вторичных и конечных продуктов ПОЛ в липидной фракции фосфолипидов, на 10-е сутки снижается содержание вторичных продуктов ПОЛ в липидной фракции триглицеридов и конечных продуктов ПОЛ в фракции фосфолипидов. МТ ограничивает ОМБ: на 5-е сутки за счет аминокислотных остатков нейтрального характера первичных продуктов ОМБ и снижения фрагментации белков, на 10-е сутки — за счет аминокислотных остатков нейтрального характера первичных и вторичных продуктов ОМБ и снижения фрагментации и агрегации белков. Полагаем, что снижение содержания продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в ожоговой ране при экспериментальной ТТ в условиях применения ДП с МТ обусловлено несколькими механизмами. МТ способен

Таблица 3. Корреляция между площадью ожога (см²) и показателями СРО в гомогенате кожи при экспериментальной ТТ в условиях применения ДП с МТ

Показатели	5-е сутки	10-е сутки
ДК (гептановая фаза), е.и.о.	R = 0,21	R = 0,18
КД и СТ (гептановая фаза), е.и.о.	R = 0,34	R = 0,52
ШО (гептановая фаза), е.и.о.	R = 0,17	R = 0,27
ДК (изопропанольная фаза), е.и.о.	R = 0,17	R = 0,15
КД и СТ (изопропанольная фаза), е.и.о.	R = 0,68	R = 0,21
ШО (изопропанольная фаза), е.и.о.	R = 0,53	R = 0,51
S ОМБ (спонт. режим), у.е./мг	R = 0,74	R = 0,67
S ОМБ (инд. режим), у.е./мг	R = 0,53	R = -0,25
S АДНФГ (спонт. режим), у.е./мг белка	R = 0,51	R = 0,39
S КДНФГ (спонт. режим), у.е./мг белка	R = 0,07	R = 0,47
S uv (спонт. режим), у.е./мг белка	R = 0,57	R = 0,37
S vs (спонт. режим), у.е./мг белка	R = 0,18	R = 0,51

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

быстро распределяться внутри клетки и в межклеточной жидкости посредством пассивной диффузии, а также с использованием транспортеров глюкозы (GLUT1) и олигопептидов (PEPT1/2) [23, 24]. Рецептор МТ1 обнаружен в кератиноцитах и фибробластах кожи, клетках волосяного фолликула, рецептор МТ2 — преимущественно в эккринных железах и кровеносных сосудах кожи, меланоцитах, ядерный рецептор ROR α для МТ идентифицирован в кератиноцитах, фибробластах, меланоцитах [25–27]. МТ в коже способен напрямую поглощать АФК (ОН, H₂O₂), одна молекула МТ способна связывать до четырех и более АФК, а антиоксидантный эффект МТ более выражен, чем у витаминов С и Е в эквивалентной дозе [28]. Опосредованный антиоксидантный эффект связан с увеличением синтеза глутатиона, активацией глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, СОД, каталазы, гемоксидазы-1, снижением активности хинонредуктазы-2, NOS-1 [29]. Антиоксидантный эффект МТ реализуется также путем поддержания потенциала митохондриальной мембраны и увеличения окислительного фосфорилирования, продукции АТФ, а не АФК [30]. По всей видимости, антиоксидантный эффект МТ в очаге ТТ, уменьшение повреждения белков и липидов, входящих в состав цитоплазматических мембран и клеточных органелл, приводят к ограничению вторичной альтерации, сокращению сроков сосудистых и экссудативных реакций, способствуют более раннему включению репаративных реакций и сокращению сроков заживления ожоговой раны. Корреляционный анализ площади ожоговой поверхности и содержания продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в очаге при ТТ в условиях применения ДП с МТ (табл. 3) показал, что на 5-е сутки ТТ между абсолютной площадью ожога установлено наличие прямой средней силы связи с содержанием в ожоговой ране вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта, слабой связи с содержанием вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, прямой средней силы связи с суммарным содержанием продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах, суммарным содержанием первичных продуктов ОМБ и суммарным

содержанием продуктов ОМБ нейтрального характера. На 10-е сутки ТТ выявлена прямая связь средней силы с содержанием вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта, суммарным содержанием продуктов ОМБ, продуктов ОМБ основного характера в спонтанном режиме, прямая связь слабой силы с суммарным содержанием первичных и вторичных продуктов ОМБ, продуктов ОМБ нейтрального характера в спонтанном режиме.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило достичь поставленной цели и установить, что в динамике экспериментальной ТТ в ожоговой ране увеличивается содержание вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, увеличивается содержание первичных и вторичных продуктов ОМБ преимущественно нейтрального характера. Продемонстрировано, что применение ДП с МТ оригинального состава при ТТ уменьшает абсолютную и относительную площадь ожога, увеличивает скорость эпителизации раны, снижает содержание продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в ожоговой ране. При ТТ в условиях применения ДП с МТ площадь ожога ассоциирована с содержанием в ожоговой ране продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли изменений редокс-статуса в патогенезе ТТ, служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению СРО в коже в клинических условиях у больных с ожогами для обозначения продуктов ПОЛ и ОМБ в качестве диагностических маркеров и предикторов осложнений, а также показателей эффективности проводимой терапии. Продемонстрированный нами при ТТ на доклиническом этапе антиоксидантный и стимулирующий репарацию ожоговой раны эффект МТ в составе ДП является предпосылкой для дальнейшего изучения механизма действия и эффективности применения МТ в клинических условиях.

Литература

1. Статистический сборник 2018 год. Социально-значимые заболевания населения России в 2018 году. 2019; 11: 69. Доступно по ссылке: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>.
2. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep*. 2017; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
3. Abdullahi A, Jeschke MG. Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. *Endocrine Reviews*. 2017; 38 (6): 538–49.
4. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019; 221: 46–52. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011.
5. Valacchi G, Virgili F, Cervellati C, Pecorelli A. OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front Physiol*. 2018; 9: 858. DOI: 10.3389/fphys.2018.00858.
6. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*. 2019; 294 (51): 19683–708.
7. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma*. 2019; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.
8. Осиков М. В. Влияние эритропоэтина на процессы свободнорадикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157 (1): 30–33.
9. Осиков М. В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 3: 326–9.
10. Осиков М. В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 7: 27–30.
11. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 202–4.
12. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, Intra C, Iriti M. The Impact of Melatonin in Research. *Molecules*. 2016; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
13. Волчегорский И. А., Налимов А. Г., Яровинский В. Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 35 (1): 127–31.
14. Фомина М. А., Абаленихина Ю. В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава. Рязань: РИО РязГМУ, 2014.
15. Mitran MI, Nicolae I, Tampa M, Mitran CI, Caruntu C, Sarbu MI, et al. Reactive Carbonyl Species as Potential Pro-Oxidant Factors Involved in Lichen Planus Pathogenesis. *Metabolites*. 2019; 9 (10): E213. DOI: 10.3390/metabo9100213.
16. Wei C, Ding X, Liu C, Pei Y, Zhong Y, Sun W. Mechanism of taurine in alleviating myocardial oxidative stress in rats after burn through p38 MAPK signaling pathway. *Minerva Med*. 2019; 110 (5): 472–75.
17. Jacob S, Herndon DN, Hawkins HK, Enkhbaatar P, Cox RA. Xanthine oxidase contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *International journal of burns and trauma*. 2017; 7 (6): 98–106.
18. Klein GL. The role of the musculoskeletal system in post-burn hypermetabolism. *Metabolism*. 2019; 97: 81–86.
19. ErginTuncay M, Erkilic A, Gunes A, Nural C, Erel O. A remarkable point for evaluating the severity of burns: Thiol-disulfide profile. *Burns*. 2019; 46 (4): 0305-4179(19)30638-2. DOI: 10.1016/j.burns.2019.10.013.
20. Lee YH, Bang ES, Lee JH, Lee JD, Kang DR, Hong J, Lee JM. Serum Concentrations of Trace Elements Zinc, Copper, Selenium, and Manganese in Critically Ill Patients. *Biological Trace Element Research*. 2019; 188 (2): 316–25.
21. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016; 138 (3): 18–28.
22. Lee HJ, Jang YJ. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (3): 711. DOI: 10.3390/ijms19030711.
23. Yu H, Dickson EJ, Jung SR, Koh DS, Hille B. High membrane permeability for melatonin. *The Journal of General Physiology*. 2016; 147: 63–76.
24. Mayo JC, Aguado A, Cernuda-Cernuda R, Alvarez-Artme A, Cepas V, Quiros-Gonzalez I, et al. Melatonin uptake by cells: an answer to its relationship with glucose? *Molecules*. 2018; 23: e1999. DOI: 10.3390/molecules23081999.
25. Janjetovic Z, Jarrett SG, Lee EF, Duprey C, Reiter RJ, Slominski AT. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1274. DOI: 10.1038/s41598-017-01305-2.
26. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido Ja, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
27. Dai J, Choo MK, Park JM, Fisher DE. Topical ROR inverse agonists suppress inflammation in mouse models of atopic dermatitis and acute irritant dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017; 137: 2523–31.
28. Slominski AT, Semak I, Fischer TW, Kim TK, Kleszczyski K, Hardeland R, et al. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Experimental Dermatology*. 2017; 26: 563–8.
29. Janjetovic Z, Jarrett SG, Lee EF, Duprey C, Reiter RJ, Slominski AT. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1274. DOI: 10.1038/s41598-017-01305-2.
30. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017; 74 (21): 3863–81.

References

1. Statisticheskij sbornik 2018 god. Social'no-znachimye zabojevanija naselenija Rossii v 2018 godu. 2019; 11: 69. Dostupno po ssylke: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>. Russian.
2. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep*. 2017; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
3. Abdullahi A, Jeschke MG. Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. *Endocrine Reviews*. 2017; 38 (6): 538–49.
4. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019; 221: 46–52. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011.
5. Valacchi G, Virgili F, Cervellati C, Pecorelli A. OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front*

- Physiol. 2018; 9: 858. DOI: 10.3389/fphys.2018.00858.
6. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*. 2019; 294 (51): 19683–708.
 7. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma*. 2019; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.
 8. Osikov MV. Vliyanie jeritropojetina na processy svobodno-radikal'nogo okisleniya i jekspressiju glikoproteinov v trombocitah pri hronicheskoj pochechnoj nedostatochnosti. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2014; 157 (1): 30–33. Russian.
 9. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev Yul. Vliyanie jeritropojetina na apoptoz limfocitov pri jeksperimental'noj hronicheskoj pochechnoj nedostatochnosti. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015; 3: 326–9. Russian.
 10. Osikov MV. Rol' orozomukoida v reguljacii aktivnosti sistem plazmennogo proteoliza pri jeksperimental'noj pochechnoj nedostatochnosti. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2009; 7: 27–30. Russian.
 11. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 202–4.
 12. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, Intra C, Iriti M. The Impact of Melatonin in Research. *Molecules*. 2016; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
 13. Volchegorskij IA, Nalimov AG, Yarovinskij VG. Sopostavlenie razlichnyh podhodov k opredeleniju produktov POL v heptan-izopropanol'nyh jekstraktah krovi. *Voprosy medicinskoj himii*. 1989; 35 (1): 127–31. Russian.
 14. Fomina MA, Abalenihina YuV. Sposob kompleksnoj ocenki sodержaniya produktov okislitel'noj modifikacii belkov v tkanjah i biologicheskikh zhidkostyah: metodicheskie rekomendacii. GBOU VPO RjazGMU Minzdrava. Rjazan': RIO RjazGMU, 2014. Russian.
 15. Mitran MI, Nicolae I, Tampa M, Mitran CI, Caruntu C, Sarbu MI, et al. Reactive Carbonyl Species as Potential Pro-Oxidant Factors Involved in Lichen Planus Pathogenesis. *Metabolites*. 2019; 9 (10): E213. DOI: 10.3390/metabo9100213.
 16. Wei C, Ding X, Liu C, Pei Y, Zhong Y, Sun W. Mechanism of taurine in alleviating myocardial oxidative stress in rats after burn through p38 MAPK signaling pathway. *Minerva Med*. 2019; 110 (5): 472–75.
 17. Jacob S, Herndon DN, Hawkins HK, Enkhbaatar P, Cox RA. Xanthine oxidase contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *International journal of burns and trauma*. 2017; 7 (6): 98–106.
 18. Klein GL. The role of the musculoskeletal system in post-burn hypermetabolism. *Metabolism*. 2019; 97: 81–86.
 19. ErginTuncay M, Erkilic A, Gunes A, Nural C, Erel O. A remarkable point for evaluating the severity of burns: Thiol-disulfide profile. *Burns*. 2019; 46 (4): 0305–4179(19)30638-2. DOI: 10.1016/j.burns.2019.10.013.
 20. Lee YH, Bang ES, Lee JH, Lee JD, Kang DR, Hong J, Lee JM. Serum Concentrations of Trace Elements Zinc, Copper, Selenium, and Manganese in Critically Ill Patients. *Biological Trace Element Research*. 2019; 188 (2): 316–25.
 21. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016; 138 (3): 18–28.
 22. Lee HJ, Jang YJ. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (3): 711. DOI: 10.3390/ijms19030711.
 23. Yu H, Dickson EJ, Jung SR, Koh DS, Hille B. High membrane permeability for melatonin. *The Journal of General Physiology*. 2016; 147: 63–76.
 24. Mayo JC, Aguado A, Cernuda-Cernuda R, Alvarez-Artime A, Cepas V, Quiros-Gonzalez I, et al. Melatonin uptake by cells: an answer to its relationship with glucose? *Molecules*. 2018; 23: e1999. DOI: 10.3390/molecules23081999.
 25. Janjetovic Z, Jarrett SG, Lee EF, Duprey C, Reiter RJ, Slominski AT. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1274. DOI: 10.1038/s41598-017-01305-2.
 26. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido Ja, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
 27. Dai J, Choo MK, Park JM, Fisher DE. Topical ROR inverse agonists suppress inflammation in mouse models of atopic dermatitis and acute irritant dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017; 137: 2523–31.
 28. Slominski AT, Semak I, Fischer TW, Kim TK, Kleszczyski K, Hardeland R, et al. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Experimental Dermatology*. 2017; 26: 563–8.
 29. Janjetovic Z, Jarrett SG, Lee EF, Duprey C, Reiter RJ, Slominski AT. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1274. DOI: 10.1038/s41598-017-01305-2.
 30. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017; 74 (21): 3863–81.

БУККАЛЬНАЯ УРЕТЕРОПЛАСТИКА ПРИ РЕЦИДИВНЫХ ПРОТЯЖЕННЫХ СТРИКТУРАХ И ОБЛИТЕРАЦИЯХ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА МОЧЕТОЧНИКА

А. А. Волков¹ ✉, Н. В. Будник¹, О. Н. Зубань², М. А. Абдулаев¹, Д. В. Плоткин², М. Н. Решетников²

¹ Госпиталь для ветеранов войн, Ростов-на-Дону, Россия

² Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом, Москва, Россия

Выбор метода хирургического лечения тяжелых обструктивных заболеваний верхних мочевых путей является сложной проблемой и на современном этапе развития урологии. Целью исследования было изучить результаты применения буккального графта (БГ) при протяженных рецидивных стриктурах и облитерациях дистального отдела мочеточника. Прооперировано семь пациенток с данными заболеваниями: у шести пациенток была выполнена полная заместительная уретеропластика БГ, у одной — заместительная onlay уретеропластика. Лапароскопическим доступом оперировали в одном случае, в остальных использовали открытый. Протяженность замещенного дефекта мочеточника составила 5–8 см. Лоскут дополнительно васкуляризировали подвздошной мышцей в пяти случаях, в одном — тканью сальника, и у одной пациентки использовали подвздошную мышцу и сальник. Тяжелые осложнения по классификации Clavien–Dindo, а также летальные исходы отсутствовали. Период наблюдения за пациентами составил 4–18 месяцев, рецидива заболевания у оперированных на сегодняшний день нет. Контрольные исследования показали полную проходимость неоуретера и хорошую васкуляризацию БГ. Таким образом, данный способ может служить одной из дополнительных методик при невозможности восстановления дистального отдела мочеточника с использованием тканей собственных мочевых путей или сегментов желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: буккальный графт, обструкция мочеточника, облитерация мочеточника, стриктура мочеточника, дистальный отдел мочеточника

Вклад авторов: А. А. Волков, Н. В. Будник — разработка концепции и дизайна исследования, общая ответственность, подготовка текста; М. А. Абдулаев — сбор материала; А. А. Волков, М. Н. Решетников, Д. В. Плоткин — статистическая обработка данных; А. А. Волков, О. Н. Зубань — анализ полученных данных; А. А. Волков, О. Н. Зубань, М. Н. Решетников — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ГБУ «Госпиталь для ветеранов войн» (протокол № 1 от 6 февраля 2018 г.). От всех участников получено информированное согласие на включение в исследование.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Александрович Волков
пер. Запрудный, д. 17, г. Ростов-на-Дону, 344020; Volkov73a@bk.ru

Статья получена: 25.10.2020 **Статья принята к печати:** 05.12.2020 **Опубликована онлайн:** 17.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.079

BUCCAL URETEROPLASTY FOR RECURRENT EXTENDED STRICTURES AND OBLITERATIONS OF DISTAL URETER

Volkov AA¹ ✉, Budnik NV¹, Zuban ON², Abdulaev MA¹, Plotkin DV², Reshetnikov MN²

¹ Hospital for War Veterans, Rostov-on-Don, Russia

² Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control, Moscow, Russia

At the current stage of development of urology, selection of the surgical method for cases of severe obstructive diseases of the upper urinary system remains a challenge. This study aimed to explore the results of application of a buccal graft (BG) to remedy extended recurrent strictures and obliterations of the distal ureter. Seven patients with the mentioned diseases had undergone surgery: for six of them, the method of choice was complete BG ureteroplasty, one had onlay ureteroplasty. One intervention was laparoscopic, the remaining surgeries were open. The length of the replaced ureteral defect was 5–8 cm. In five cases, the flap was additionally vascularized with the iliac muscle, in one we used omentum tissue, in another — both the iliac muscle and the omentum. There were no fatalities registered, nor severe complications as per the Clavien–Dindo classification. The patients were followed-up for 4–18 months; as of today, no recurrence cases were identified. Control examinations showed complete patency of the neoureter and good vascularization of the BG. Thus, this method can be an option in cases disallowing distal ureter restoration with tissues of the patient's own urinary tract or segments of the gastrointestinal tract.

Keywords: buccal mucosa graft, ureteral obstruction, ureteral obliteration, ureteral stricture, distal ureter

Author contribution: Volkov AA, Budnik NV — study conceptualization and design development, shared responsibility, text preparation; Abdulaev MA — material collection; Volkov AA, Reshetnikov MN, Plotkin DV — statistical data processing; Volkov AA, Zuban ON — obtained data analysis; Volkov AA, Zuban ON, Reshetnikov MN — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the Hospital for War Veterans (Minutes #1 of February 6, 2018). All participants submitted the signed informed consent forms confirming their consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey A. Volkov
pereulok Zaprudny, 17, Rostov-on-Don, 344020; Volkov73a@bk.ru

Received: 25.10.2020 **Accepted:** 05.12.2020 **Published online:** 17.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.079

Протяженные стриктуры и облитерации мочеточников формируются вследствие ятрогенных повреждений, возникающих при операциях на органах малого таза и брюшной полости, после применения радиотерапии, а также в исходе таких заболеваний, как туберкулез, мочекаменная болезнь, болезнь Ормонда, опухоли мочеточников и др. [1]. По происхождению стриктуры мочеточника можно разделить на три основные группы: посттравматические, поствоспалительные и постлучевые [2]. В свою очередь,

у 13% пациентов, у которых диагностирована ятрогенная травма мочеточника во время урологической операции, возникла посттравматическая стриктура [3].

Обструкция нижней трети мочеточника, обусловленная его стриктурами и облитерациями, чаще всего возникает как результат эндоурологических вмешательств при мочекаменной болезни [3–5], а также как отдаленное осложнение лучевой терапии органов малого таза [6]. Основную часть таких пациентов составляют

лица, которым проводили облучение по поводу рака мочевого пузыря, шейки или тела матки. Ведь поражение мочевых путей у пациенток с раком шейки матки после лучевой терапии может достигать 28% [7]. Само по себе воздействие лучевой энергии ухудшает васкуляризацию облучаемых тканей и их способность к регенерации, что делает бесперспективным консервативное лечение данного заболевания [8]. В настоящее время не существует стандартных методик хирургического лечения постлучевой обструкции дистальных отделов мочеточника. Такая обструкция трудно поддается лечению, так как на фоне ишемизации стенки уретера использование собственных тканей в его реконструкции зачастую невозможно. Уретеропластики с использованием различных сегментов желудочно-кишечного тракта имеют значительное число осложнений и считаются эффективными не более чем в 80% случаев [9, 10]. В этом свете по-прежнему актуальна разработка новых методов восстановления проходимости дистального отдела мочеточника. Буккальный графт (БГ) — трансплантат слизистой оболочки ротовой полости, по мнению большинства авторов, является наиболее перспективным материалом в данном случае, его используют для этой реконструктивной операции более 20 лет при стриктурах и облитерациях проксимального и среднего отделов мочеточника [11].

Целью исследования было изучить эффективность применения БГ при протяженных рецидивных стриктурах и облитерациях дистального отдела мочеточника.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Семерым пациенткам с протяженными стриктурами/облитерациями нижней трети мочеточника в период с 2018 по 2020 г. на базе хирургического центра Госпиталя для ветеранов войн Ростовской области выполнена заместительная уретеропластика буккальным лоскутом. Средний возраст больных составил 52,5 ± 9,0 года (36–67 лет). У одной (14,3%) пациентки установлен диагноз рецидивной стриктуры мочеточника на фоне длительно существующей мочекаменной болезни после нескольких корректирующих оперативных вмешательств, еще у одной (14,3%) — рецидивная стриктура мочеточника постлучевого генеза после лечения опухоли кишечника. В одном случае (14,3%) диагностирована облитерация нижней трети мочеточника как следствие нескольких оперативных вмешательств на мочеточнике, в трех (42,9%) — выявлена постлучевая облитерация

мочеточника после комплексного лечения рака шейки матки, и наконец в одном наблюдении (14,3%) имела место рецидивная стриктура как последствие туберкулезного воспалительного процесса.

У всех больных данной группы был выраженный коморбидный фон — в анамнезе отмечены различные опухолевые и тяжелые системные заболевания (табл. 1). Пациентки анализируемой группы в прошлом перенесли обширные оперативные пособия: троим (42,9%) выполнена расширенная экстирпация матки с придатками по поводу злокачественной опухоли шейки матки с последующей лучевой терапией, еще у троих (42,9%) произведены оперативные вмешательства на брюшной полости: в одном случае (14,3%) — гемиколэктомия по поводу злокачественной опухоли с дальнейшей лучевой терапией, а двоим (28,6 %) — традиционная аппендэктомия по поводу деструктивных форм острого аппендицита. Кроме того, в одном случае (14,3%) ранее была выполнена тораколумбофренотомия, резекция позвонков по поводу туберкулеза позвоночника, и еще у одной больной (14,3%) — надвлагалищная ампутация матки (см. табл. 1).

Данной группе женщин до выполнения буккальной уретеропластики выполнена 21 различная операция на верхних мочевых путях (ВМП), включая реконструктивные, эндоскопические и дренирующие вмешательства. Расценивая результаты операций, можно отметить, что практически у всех пациенток (85,3%) они закончились постоянным дренированием почки, что свидетельствует о необходимости применения альтернативных методик хирургического лечения. Двоим (28,6%) пациенткам была предложена нефрэктомия, от которой они отказались, еще двое (28,6%) имели нефростомы более двух лет.

У двоих (28,6%) пациенток на момент операции уже имелось поражение контрлатеральной почки, приведшее к развитию хронической болезни почек (ХБП) (табл. 2). В одном случае мочевины крови составила 13,1 ммоль/л, креатинин крови — 259,2 мкмоль/л, СКФ по формуле CKD-EPI — 18 мл/мин/1,73 м². Во втором случае — мочевины крови 11,6 ммоль/л, креатинин крови 174,4 мкмоль/л, СКФ по формуле CKD-EPI — 27 мл/мин/1,73 м².

Всем пациенткам на момент поступления и в различные сроки после операции выполняли комплексное урологическое обследование, включающее: сбор жалоб и анамнеза, лабораторную диагностику, УЗИ почек с триплексным сканированием почечных артерий, ретроградную уретеропиелографию, цистоскопию и уретероскопию, компьютерную томографию с контрастированием,

Таблица 1. Характеристика группы пациентов

№	Диагноз	Этиология	Сопутствующие заболевания	Перенесенные операции на других органах
1	Рецидивная стриктура нижней трети мочеточника	Лучевая терапия	Опухоль сигмовидной кишки. Сахарный диабет 2-го типа. Ожирение 3-й ст.	Открытая гемиколэктомия
2	Облитерация нижней трети мочеточника	Эндоурологические операции	Опухоль мочевого пузыря. МКБ. Гипертоническая болезнь III ст., III ст. риск 4	Аппендэктомия
3	Облитерация нижней трети мочеточника	Лучевая терапия	Рак шейки матки	Экстирпация матки
4	Облитерация нижней трети мочеточника	Лучевая терапия	Рак шейки матки Ожирение 3-й ст. ИБС	Экстирпация матки
5	Рецидивная стриктура нижней трети мочеточника	Посттуберкулезный уретерит	Туберкулез позвоночника. Туберкулез мочевой системы. Сахарный диабет 2-го типа. Ожирение 3-й ст.	Тораколумбофренотомия, резекция позвонков
6	Облитерация нижней трети мочеточника	Лучевая терапия	Рак шейки матки	Экстирпация матки. Аппендэктомия
7	Рецидивная стриктура нижней трети мочеточника	Эндоурологические операции	МКБ. Сахарный диабет 2-го типа. Ожирение 3-й ст.	Надвлагалищная ампутация матки

Таблица 2. Виды предшествующих оперативных вмешательств

№	Предшествующие операции на ВМП	Контрлатеральная почка	ХБП	Постоянный дренаж
1	Операция Боари (ОБ)	Норма	Нет	Нет
2	Трансуретральная резекция мочевого пузыря; эндотомия устья мочеточника + уретерореноскопия с контактной уретеролитотрипсией и уретеролитозэкстракцией (УРС) + стентирование мочеточника (СМ); УРС + СМ; эндотомия устья мочеточника + СМ; УРС + СМ; УРС + СМ; чрескожная нефростомия (ЧН)	МКБ. Хронический пиелонефрит	Есть	Нефростома
3	ОБ, ЧН	Норма	Нет	Нефростома
4	ЧН	Норма	Нет	Нефростома
5	ЧН; УРС + СМ; ЧН; УРС + СМ; ОБ; установка постоянного стента мочеточника	МКБ. Хронический пиелонефрит	есть	Мочеточниковый стент
6	ЧН	Норма	нет	Нефростома
7	УРС + СМ; УРС + СМ; установка постоянного стента мочеточника	Норма	нет	Мочеточниковый стент

внутривенную урографию, радионуклидные методы исследования (по показаниям), морфологические исследования.

Уретероскопию выполняли с помощью ригидного уретероскопа 8 Ch (Karl Storz; Германия), цистоскопию — ригидных цистоскопов 19–22 Ch (Karl Storz; Германия). Использовали эндоскопическую стойку с оборудованием и принадлежностями для эндовидеохирургии (Karl Storz; Германия), модель Image 1 SCONNECT, IMAGE 1S H3-LINK, IMAGE 1S H3-Z, PowerLED 175 SCB, Radiance 32, ENDOFLATOR 40, HAMOUEndomat, VIO 300 D. Ультразвуковое исследование (УЗИ) почек и их сосудов проводили с использованием ультразвуковой системы экспертного класса «Philips EPIQ 5 Elite» (Philips; Нидерланды), внутривенную урографию выполняли на рентгеновском диагностическом телеуправляемом комплексе «ТелеКоРД-МТ» («МТЛ»; Россия). Спиральную компьютерную томографию (СКТ) забрюшинного пространства выполняли на томографе Philips Brilliance 64 (Philips; Нидерланды) в режиме аксиального сканирования с толщиной срезов 2 мм и последующей реконструкцией по 0,75 мм с болюсным усилением раствором Омнипак-300 (100 мл).

Шестерым (83,3%) пациенткам выполнили полную заместительную буккальную пластику нижней трети мочеточника и его устья, одной (14,3%) — частичную (onlay) пластику нижней трети мочеточника. Из семи женщин у одной (14,3%) операция выполнена лапароскопическим способом, в остальных случаях (83,7%) использовали открытый доступ. Протяженность дефекта мочеточника, требующая замещения, установленная интраоперационно, составила 5–8 см (медиана — 6,5 см) (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика уретеропластики БГ у группы пациентов

№	Вид операции с использованием БГ	Метод	Длина БГ, см	Дополнительная васкуляризация БГ	Кровопотеря, мл
1	Onlay-пластика нижней трети мочеточника	Открытый	5	ППМ	200
2	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника и его устья	Открытый	6	ППМ	150
3	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника	Открытый	7	ППМ	170
4	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника	Открытый	7	ППМ	250
5	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника	Открытый	8	ППМ + прядь сальника	200
6	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника и его устья	Лапароскопический	6	Прядь сальника с фиксацией	300
7	Полная заместительная пластика нижней трети мочеточника и его устья	Открытый	7	ППМ	200

В предоперационный период у пациентов проводили подготовку ротовой полости, включающей в себя консультацию стоматолога и санацию ротовой полости при необходимости, отказ от курения в течение месяца и полоскание растворами антисептиков начиная за неделю до операции.

Наличие постоянных дренажей и хронического воспалительного процесса в мочевых путях делало бесперспективным проведение антибиотикопрофилактики у данных пациентов. В послеоперационном периоде была назначена длительная антибактериальная терапия согласно результатам бактериологического исследования мочи.

БГ во всех случаях уретеропластики дополнительно васкуляризировался. Так, в пяти (71,4%) случаях оперативного лечения БГ фиксировали к подвздошно-поясничной мышце (ППМ). У пациентки с лапароскопической уретеропластикой (14,3%) лоскут был обернут прядью сальника с фиксацией последнего непосредственно к БГ в нескольких точках, в одном случае (14,3%) выполнена комбинированная васкуляризация с использованием ППМ и пряди фиксированного сальника.

Из шести пациенток с тубуляризованным БГ троим (50%) был выполнен неоуретероцистоанастомоз по антирефлюксной методике (формирование подслизистого тоннеля), еще троим (50%) — прямой анастомоз между тубуляризованным БГ и мочевым пузырем.

Интраоперационная кровопотеря во всех случаях была минимальна, не превышала 300 мл (см. табл. 3). Время операции составило 220–350 мин (медиана — 280 мин).

Эффективность оперативных вмешательств оценивали по отсутствию рецидива заболевания в течение 4–18 месяцев и отсутствию необходимости повторно

Таблица 4. Результаты хирургического лечения

№	Осложнения по Clavien–Dindo, степень/вид	Наблюдение, месяцы	Остаточный гидронефроз	Рецидив стриктуры/облитерации
1	Нет	18	Нет	Нет
2	Нет	14	Нет	Нет
3	Нет	10	Нет	Нет
4	II/гемотрансфузия	12	Нет	Нет
5	IIIb/ущемление петли кишки	11	Есть	Нет
6	Нет	4	Нет	Нет
7	Нет	5	Нет	Нет

использовать стентирование мочеточника (СМ) или чрескожную нефростомию (ЧН).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все пациентки продолжают находиться под нашим наблюдением. Мочеточниковый стент удаляли стандартно через шесть недель после операции. Срок наблюдения больных составляет 4–18 месяцев. Во всех семи случаях рецидива заболевания и осложнений оперативного пособия до настоящего времени не выявлено. Только у одной (14,3%) пациентки с ХБП в течение 11 месяцев сохраняется остаточный гидронефроз (табл. 4).

Интраоперационных осложнений в анализируемой группе не зафиксировано, а ближайшие послеоперационные осложнения оценивали по шкале Clavien–Dindo. Следует признать, что в данной когорте больных мы не наблюдали послеоперационных осложнений тяжелой степени. Одной пациентке с хронической анемией для коррекции газотранспортной функции крови потребовалась трансфузия одной дозы эритроцитарной массы. Еще у одной больной на четвертые сутки после операции диагностировано ущемление ранее существовавшей послеоперационной вентральной грыжи, которое так же потребовало оперативной коррекции под общей анестезией, прошедшей без осложнений (см. табл. 4).

Во всех случаях контрольное исследование подтвердило приживление БГ — выполненные цистоскопия и уретероскопия показали розовую слизистую неоуретера и состоятельность устья неоуретера. Контрольные ретроградные уретеропиелографии установили полную проходимость анастомоза у всех пациенток. Лабораторные показатели у пациенток с ХБП составили в первом случае: мочевины крови — 7,8 ммоль/л, креатинин крови — 181,4 мкмоль/л, СКФ по формуле СКД-EPI — 26 мл/мин/1,73 м². Во втором случае: мочевины крови — 8,9 ммоль/л, креатинин крови — 141,6 мкмоль/л, СКФ по формуле СКД-EPI — 34 мл/мин/1,73 м². Данные демонстрируют умеренную положительную динамику.

На сегодняшний день никто из этих пациенток не нуждается в дренировании почки.

Эффективность буккальной уретеропластики можно продемонстрировать следующим клиническим наблюдением.

Больная Т., 54 года, была госпитализирована 05.07.2019 в хирургический центр Госпиталя для ветеранов войн Ростовской области с жалобами на наличие нефростомы.

В июне 2014 г. в одной из клиник по месту жительства пациентке была выполнена цистоскопия по поводу гематурии, обнаружено ворсинчатое образование устья правого мочеточника. Выполнена трансуретральная резекция образования. При гистологическом исследовании выявлена доброкачественная опухоль мочевого пузыря. В январе 2015 г. у пациентки появились боли

в пояснице справа, при обследовании диагностирован гидроуретеронефроз справа, конкременты нижней трети правого мочеточника. При цистоскопии устье правого мочеточника достоверно не обнаружено, на его месте визуализирован рубец. Выполнено бужирование устья правого мочеточника, эндоуретеротомия холодным ножом, уретерореноскопию (УРС) с уретролитотрипсией справа, установка мочеточникового стента. В мае 2015 г. повторно выполнены УРС и СМ. В декабре 2015 г. диагностирован рецидив заболевания, вновь осуществлена широкая эндотомия устья правого мочеточника холодным ножом, установка мочеточникового стента. В 2016 и 2017 г. пациентка снова оперирована в объеме УРС, стентирования правого мочеточника. В апреле 2019 г. у больной развился острый пиелонефрит справа, диагностирован гидроуретеронефроз справа (рис. 1), при выполнении цистоскопии устье правого мочеточника достоверно не определяется, непроходимо для мочеточникового катетера (рис. 2). Пациентке была выполнена чрескожная нефростомию. Поступила в хирургический центр для оперативного лечения.

Диагноз: облитерация нижней трети правого мочеточника.

Выполнена операция 06.07.2019: полная заместительная пластика нижней трети мочеточника буккальным трансплантатом.

Интраоперационно определена граница пораженной и здоровой ткани мочеточника. Мочеточник находился в конгломерате рубцово-измененной клетчатки, резецирован в пределах здоровых тканей, удален вместе с клетчаткой с последующей перевязкой культи мочеточника в месте его вхождения в мочевой пузырь.

Протяженность удаленного участка мочеточника составила 8 см. Рассчитана необходимая длина трансплантата для выполнения анастомоза без натяжения — 6,5 см. Второй бригадой хирургов выполнен забор БГ размерами 2,2 × 7,0 см. начиная со слизистой правой щеки (4,5 см) с переходом на слизистую нижней губы по общепринятым правилам. Лоскут тубуляризирован на стенке с дополнительной фиксацией к подвздошно-поясничной мышце (ППМ) и стенке мочевого пузыря, используя шовный материал монокрil 4/0, смоделировано новое устье неоуретера по антирефлюксной методике с формированием подслизистого тоннеля на верхнебоковой стенке мочевого пузыря.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Страховой дренаж удален на 4-е сутки, подтекания мочи мы не наблюдали. Нефростома удалена на 5-е сутки. Больная выписана на 7-е сутки в удовлетворительном состоянии.

Стент удален через 6 недель. При контрольном УЗИ почки через 1, 3, 6, 9 месяцев и экскреторной урографии через 3 и 6 месяцев — определяется регресс гидронефроза справа.

Контрольное обследование проведено через 12 месяцев: УЗИ почек и СКТ почек показали, что гидронефроз справа

отсутствует, определена полная проходимость неоуретера (рис. 3). Выполнено эндоурологическое обследование: при цистоскопии выявлено вновь сформированное устье щелевидной формы, из него периодически выделяется моча (рис. 4); по результатам ретроградной уретерографии, замещенный участок мочеточника полностью проходим, умеренно дилатирован после нагнетания контрастного вещества (рис. 5), при цистографии данных, подтверждающих пузырно-мочеточниковый рефлюкс, нет; по результатам уретероскопии, слизистая неоуретера розовая, определяется хорошая васкуляризация БГ, просвет свободный (рис. 6).

Таким образом, в представленном клиническом наблюдении реконструкция дистального отдела мочеточника с использованием БГ привела к полному восстановлению функции почки и отсутствию необходимости в дальнейшем постоянном дренировании почки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растет число публикаций, описывающих применение слизистой оболочки щеки в реконструкции мочеточника при его стриктурах и облитерациях, с тех пор, как J. H. Naude впервые применил этот метод в 1999 г. Основная часть работ посвящена буккальным уретеропластикам, выполняющимся в верхней трети мочеточника и лоханочно-мочеточникового сегмента, т. е. в его проксимальных отделах [12–14].

Сообщения о реконструкциях нижней трети мочеточника с использованием БГ носят единичный характер [15–17]. Как считают некоторые авторы, восстановление дистального отдела мочеточника при его обструкции достаточно стандартизировано на сегодняшний день и применение БГ в этой области нецелесообразно [18]. Действительно, ткани собственных ВМП считают идеальным материалом для восстановления их проходимости. Однако возможности реконструктивных вмешательств значительно ограничены ввиду дефицита здоровых тканей, особенно после предыдущих воспалительных процессов и оперативных вмешательств на мочеточниках [19].

Так, наложение прямого уретероцистоанастомоза доступно только при облитерациях или стриктурах мочеточника небольшой протяженности (до 5 см) [20]. Операция *psoas-hitch*, включающая мобилизацию мочевого пузыря и его фиксацию к поясничной мышце, позволяет заместить до 10 см дефекта ВМП, требует значительного выделения мышцы и практически всей боковой стенки мочевого пузыря, что может приводить к ряду осложнений и является технически трудной задачей [21]. Хотя операция Боари предполагает возможность восстановить длину мочеточника до 15 см, сама оперативная техника ведет к значительному снижению объема мочевого пузыря и достаточно травматична, особенно после предыдущих операций на органах малого таза. Выполнение такой операции не всегда технически возможно при постлучевых изменениях в малом тазу, так как в этом случае проблематичным моментом может стать выделение хорошо кровоснабжаемого лоскута мочевого пузыря [22, 23].

Кишечная пластика при протяженных стриктурах/облитерациях дистальных отделов мочеточника — оптимальный метод лечения для соматически сохраненных пациентов, но имеет значительное число ранних и отдаленных послеоперационных и тяжелых метаболических осложнений, риск развития которых напрямую

связан с наличием ХБП, сахарного диабета и прочими системными заболеваниями. Вмешательства по поводу энтеропластики обладают значительной интраоперационной травматичностью и относятся к урологическим операциям высокой сложности, имеют массу противопоказаний, в том числе и сопутствующий лучевой энтерит [24–26]. Слизистая оболочка щеки особенно хорошо подходит для трансплантации в мочевыводящие пути, поскольку она легко доступна для пересадки, не имеет волос, совместима

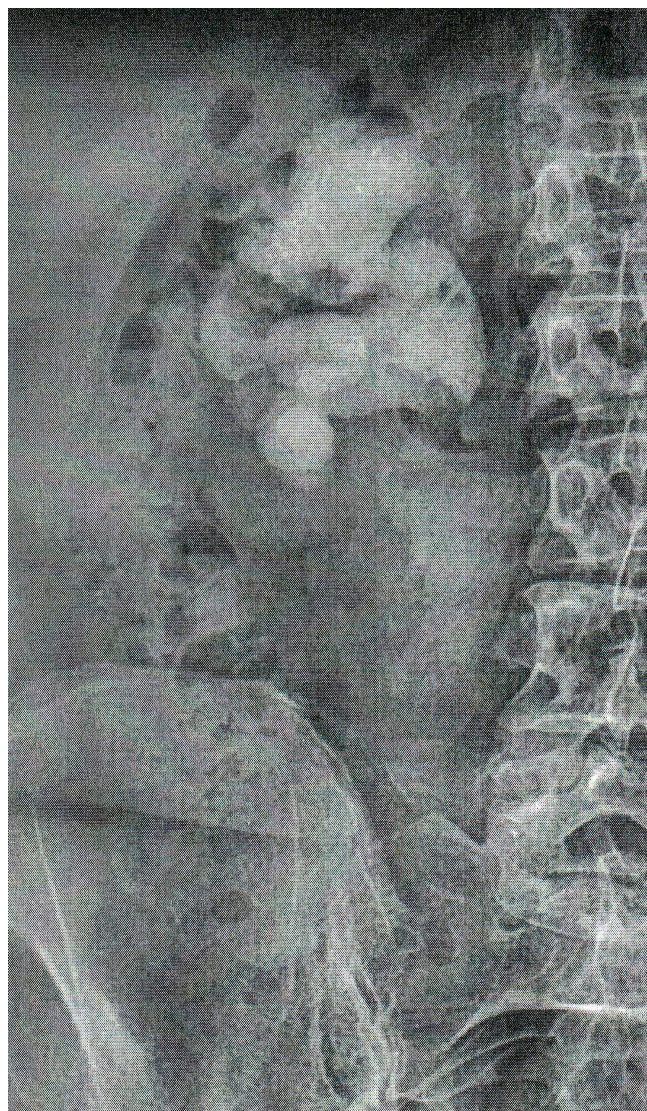


Рис. 1. Экскреторная урография. На 60-й минуте исследования определяется гидронефроз справа

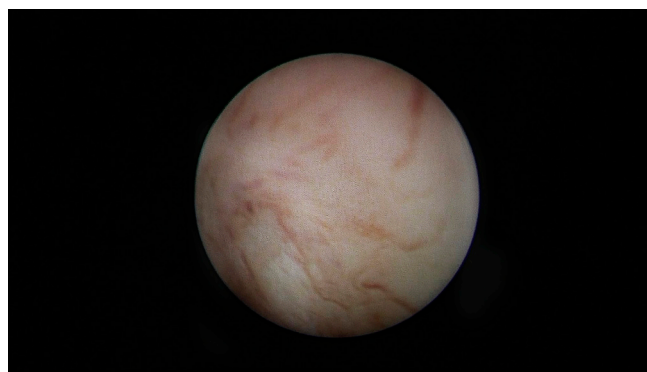


Рис. 2. Цистоскопия до операции. Устье правого мочеточника не определяется

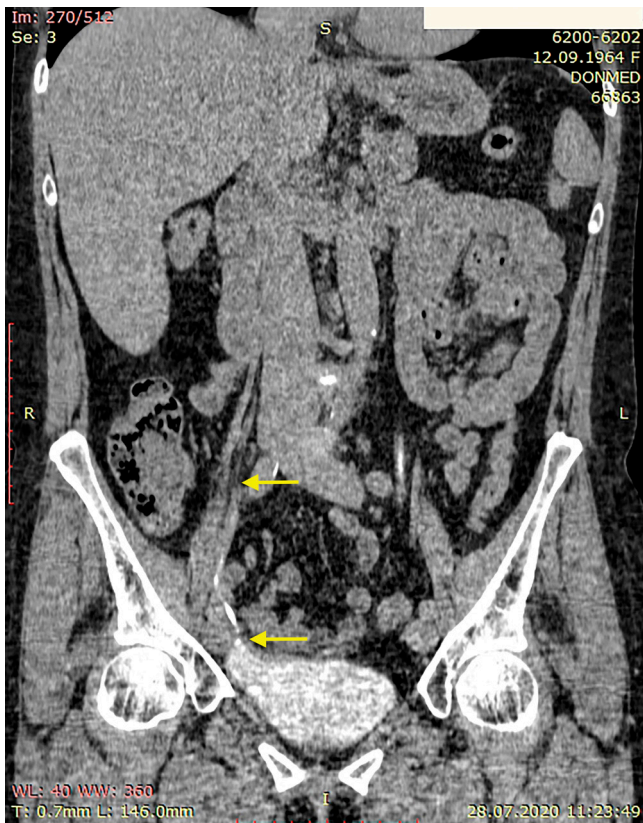


Рис. 3. Компьютерная томография с контрастным усилением после операции. Стрелками обозначены границы замещенного участка мочеточника

с влажной средой и имеет собственную субэпителиальную сосудистую сеть, которая облегчает реваскуляризацию трансплантата. Кроме того, забор трансплантата слизистой оболочки щеки для урологической реконструкции связан с низким числом описанных осложнений [27].

Использование БГ позволяет обеспечить минимальное выделение стенки мочевого пузыря, исключить травматичную мобилизацию соседних органов из постлучевых конгломератов, избежать излишней мобилизации мочеточника, почки, снизить объем оперативного вмешательства, его продолжительность и интраоперационную кровопотерю. Хотя на сегодняшний день считается, что результаты заместительной уретеропластики методом onlay в перспективе лучше, чем уретеропластики тубуляризованным БГ [28], небольшое число наблюдений пока не дает материала для сравнительных исследований.

В обсуждаемой группе пациентки имели или протяженную облитерацию дистального отдела мочеточника, или протяженную рецидивную стриктуру с минимальным просветом. Данные ткани представляли собой рубцовые тяжи без признаков какого-либо кровообращения в них. Фиксация БГ с использованием методики onlay к фиброзной ткани, образовавшейся по причине длительного специфического или неспецифического воспаления, неоднократных хирургических вмешательств или многократного воздействия лучевой энергии, чревата, по нашему мнению, возможным некрозом БГ и рецидивом заболевания. При этом нет необходимости в выделении всей пораженной части мочеточника, достаточно подготовить участок мочевого пузыря для формирования нового устья.

Основными материалами для неоваскуляризации БГ, по данным литературы, является лоскут сальника и паранефральный жир [29, 30]. У большинства пациенток в нашей серии наблюдений мы использовали в качестве

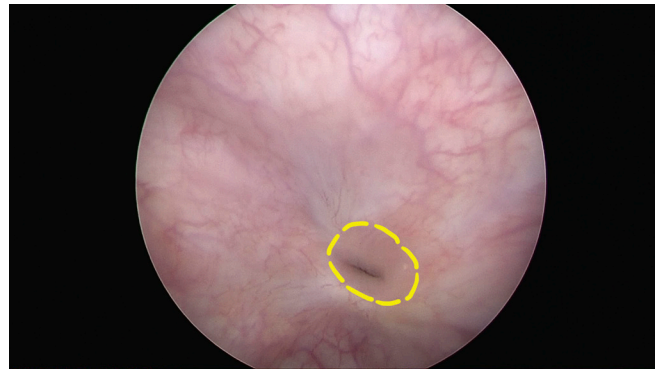


Рис. 4. Цистоскопия после операции. Пунктиром обозначена граница БГ и слизистой мочевого пузыря

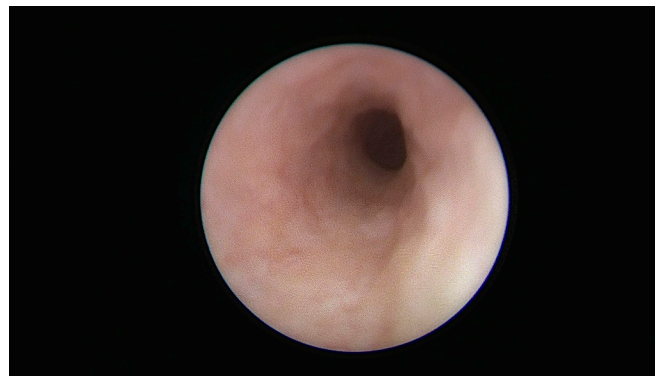


Рис. 5. Уретероскопия после операции. Определяется приживление БГ, видна хорошо васкуляризированная розовая слизистая

дополнительного источника васкуляризации ПГМ, которая также играла роль своеобразного каркаса и питающего ложа для неоуретера. Простое окутывание тубуляризованного БГ лоскутом сальника может быть недостаточным для неоангиогенеза, приводит в дальнейшем к значительному расширению замещенного участка мочеточника, а также может служить причиной циркулярного стеноза места имплантации за счет рубцевания сальника [31].

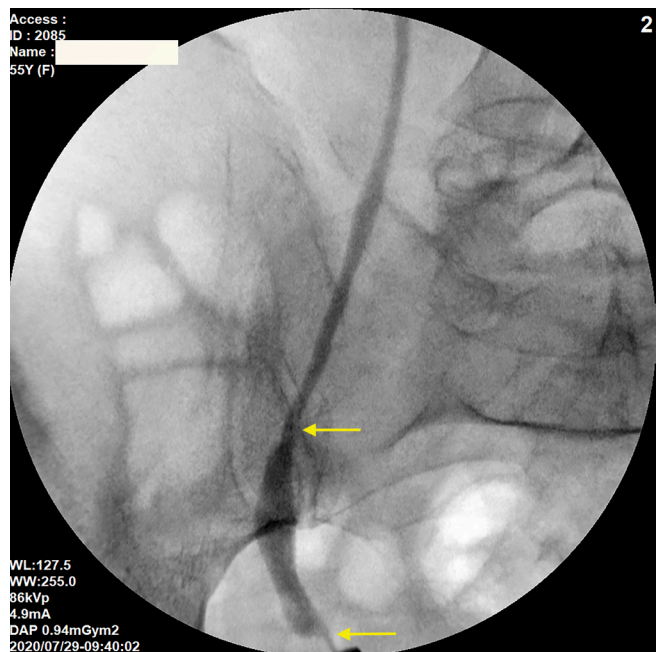


Рис. 6. Уретероскопия после операции. Определяется приживление БГ, видна хорошо васкуляризированная розовая слизистая

ВЫВОДЫ

Наш небольшой опыт применения БГ в реконструкциях дистального отдела мочеточника у пациентов с его протяженными стриктурами и облитерациями свидетельствует об успешности этой методики. Необходимость данной операции, по нашему мнению, возникает при невозможности

выполнения или высоком риске операций с использованием тканей собственных мочевых путей или кишечных сегментов, особенно у пациентов с постлучевыми повреждениями органов малого таза. Надеемся, что дальнейшая модификация хирургической техники и анализ отдаленных результатов у значительного числа пациентов приведет к стандартизации методики данных операций.

Литература

1. Комяков Б. Г. Кишечная и аппендикулярная пластика мочеточников. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015; 416 с.
2. Поляков Н. В., Кешишев Н. Г., Медведев П. Е., Гурбанов Ш. Ш., Серебряный С. А., Меринов Д. С. Малоинвазивные методы лечения повреждений мочеточников. Экспериментальная и клиническая урология. 2020; 3: 132–40. DOI: 10.29188/2222-8543-2020-12-3-132-140.
3. Gild P, Kluth LA, Vetterlein MW, Engel O, Chun FKH, Fisch M. Adult iatrogenic ureteral injury and stricture-incidence and treatment strategies. Asian J Urol. 2018; 5 (2): 101–6. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.02.003.
4. Somani BK, Giusti G, Sun Y, Osther, PJ, Frank M, De Sio M, et al. Complications associated with ureterorenoscopy (URS) related to treatment of urolithiasis: the Clinical Research Office of Endourological Society URS Global study. World J Urol. 2017; 35 (4): 675–81. DOI: 10.1007/s00345-016-1909-0.
5. D'Addessi A, Bassi P. Ureterorenoscopy: avoiding and managing the complications. Urol Int. 2011; 87 (3): 251–9. DOI: 10.1159/000329286.
6. Комяков Б. К., Новиков А. И., Очеленко В. А., Гулиев Б. Г., Ал-Аттар Т. Х., Оношко М. В. Технические особенности кишечной пластики мочеточников. Часть 6: одновременная пластика мочеточников и мочевого пузыря. Урология. 2017; 1: 12–15. DOI: 10.18565/uro.2017.1.12-15.
7. Elliott SP, Malaeb BS. Long-term urinary adverse effects of pelvic radiotherapy. World J Urol. 2011; 29 (1): 35–41. DOI: 10.1007/s00345-010-0603-x.
8. Orchard J, Tward JD, Lenherr S, Hotaling JM, Brant WO, Myers JB. Surgical Management of Ureteral Strictures Arising From Radiotherapy for Prostate Cancer. Urol Case Rep. 2016; 6: 47–49. DOI: 10.1016/j.eurc.2016.03.003.
9. Поляков Н. В., Кешишев Н. Г., Качмазов А. А., Григорьева М. В., Гурбанов Ш. Ш., Ковченко Г. А. и др. Оперативное лечение стриктур нижней трети мочеточника после лучевой терапии органов малого таза. Онкоурология. 2016; 12 (3): 68–73. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-68-73.
10. Катибов М. И., Поляков Н. В., Кешишев Н. Г., Аполихин О. И., Каприн А. Д. Использование буккального графта при стриктурах мочеточника. Урология. 2018; 1: 138–142. DOI: 10.18565/urology. 2018.1.138-142.
11. Kranz J, Brandt AS, Anheuser P, Reisch B, Steffens J, Roth S. Radiogene Harnleiterstrikturen: Mögliche Therapieoptionen [Ureteral stricture as a late complication of radiotherapy: Possible treatment options]. Urologe A. 2017; 56 (3): 322–28. DOI: 10.1007/s00120-016-0294-z.
12. Ganpule AP, Singh AG, Islam MR, Sonawane P, Sabnis RB, Desai MR. Robotic buccal mucosa graft ureteroplasty (inlay and onlay) for upper ureteric stricture: Point of technique. J Minim Access Surg. 2018; 14 (4): 357–61. DOI: 10.4103/jmas.JMAS_188_17.
13. Lee Z, Keehn AY, Sterling ME, Metro MJ, Eun DD. A Review of Buccal Mucosa Graft Ureteroplasty. Curr Urol Rep. 2018; 19 (4): 23. DOI: 10.1007/s11934-018-0772-5.
14. Волков А. А., Зубань О. Н., Будник Н. В., Саенко Г. И. Использование комбинированного буккально-лабиального лоскута в хирургическом лечении протяженных стриктур и облитераций верхней трети и лоханочно-мочеточникового сегмента. Хирург. 2019; 10: 58–67. DOI: 10.33920/med-15-1910-05.
15. Kroepfl D, Loewen H, Klevecka V, Musch M. Treatment of long ureteric strictures with buccal mucosal grafts. BJU Int. 2010; 105(10): 1452–1455. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08994.x.
16. Синельников Л. М., Протошак В. В., Карпущенко Е. Г., Бабкин П. А., Паронников М. В., Кислицын П. О., авторы; Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (ВМедА), патентообладатель. Способ лечения протяженных стриктур тазового отдела мочеточника с использованием аутоотрансплантата из слизистой щеки. Патент РФ № 2712863. 01.07.2019.
17. Волков А. А., Зубань О. Н., Будник Н. В., авторы. Волков А. А., патентообладатель. Способ хирургического лечения рецидивных и постлучевых протяженных стриктур и облитераций нижней трети мочеточника. Патент РФ № 2709167. 11.04.2019.
18. Hefermehl LJ, Tritschler S, Kretschmer A, Beck V, Stief CG, Schlenker B, et al. Open ureteroplasty with buccal mucosa graft for long proximal strictures: A good option for a rare problem. Investig Clin Urol. 2020; 61 (3): 316–22. DOI: 10.4111/icu.2020.61.3.316.
19. Nishimura Y, Moriya K, Nakamura M, Kitta T, Kanno Y, Chiba H, et al. Laparoscopic ureterocalicostomy for ureteropelvic junction obstruction in a 10-year-old female patient: a case report. BMC Res Notes. 2017; 10 (1): 247. DOI: 10.1186/s13104-017-2569-x.
20. Gong H, Lu Y, Yan Y, Wu Z, Gao W, Cheng H, et al. Laparoscopic Extravesical Submucosal Tunneling Ureteroneocystostomy Combined with Psoas Hitch for Medium-Length Distal Ureteral Defects in Adults. Urol Int. 2017; 98 (3): 343–49. DOI: 10.1159/000454735.
21. Manassero F, Mogorovich A, Fiorini G, Di Paola G, De Maria M, Selli C. Ureteral reimplantation with psoas bladder hitch in adults: a contemporary series with long-term followup. Scientific World Journal. 2012; 2012: 379316. DOI: 10.1100/2012/379316.
22. Castilló-Vela I, Del Pozo Jiménez G, Turo Antona J, Vázquez Alba D, Sáenz Medina J, Carballido Rodríguez J. Reimplante ureteral laparoscópico con Flap de Boari [Laparoscopic Boari Flap ureteral reimplantation.]. Arch Esp Urol. 2017; 70 (4): 436–44.
23. Комяков Б. К., Гулиев Б. Г. Хирургия протяженных сужений мочеточников. СПб.: Невский диалект, 2005; 257 с.
24. Schott F, Becker B, Gross AJ, Netsch C. Symptomatic Distal Ureteral Stone in an Ileal Ureter: Treatment by Combined Supine Ureteroscopy and Mini Percutaneous Nephrolithotomy. J Endourol Case Rep. 2017; 3 (1): 90–92. DOI: 10.1089/cren.2017.0049.
25. Kocot A, Kalogirou C, Verghe D, Riedmiller H. Long-term results of ileal ureteric replacement: a 25-year single-centre experience. BJU Int. 2017; 120 (2): 273–279. DOI: 10.1111/bju.13825.
26. Fallon B., Gaynor-Drupnick DM. Adult ureteral reconstruction. Urol Board Rev Manual. 2004; 12 (30): 2–11.
27. Tran H, Arsovska O, Paterson RF, Chew BH. Evaluation of risk factors and treatment options in patients with ureteral stricture disease at a single institution. Can Urol Assoc J. 2015; 9 (11–12): E921–E924. DOI: 10.5489/cuaj.3057.
28. Xiong S, Wang J, Zhu W, Yang K, Ding G, Li X, et al. Onlay Repair Technique for the Management of Ureteral Strictures: A Comprehensive Review. Biomed Res Int. 2020; 2020: 6178286. DOI: 10.1155/2020/6178286.
29. Del Pozo Jiménez G, Castillón-Vela I, Carballido Rodríguez J. Uso de injerto de mucosa oral en el tratamiento de estenosis ureterales extensas: revisión de conjunto [Buccal mucosa graft for

the treatment of long ureteral stenosis: Bibliographic review.]. Arch Esp Urol. 2017; 70 (4): 445–53.

30. Fahmy O, Schubert T, Khairul-Asri MG, Stenzl A, Gakis G. Total proximal ureter substitution using buccal mucosa. Int J Urol. 2017; 24 (4): 320–23. DOI: 10.1111/iju.13307.
31. Паронников М. В., Шестаев А. Ю., Карпушенко Е. Г., Синельников Л. М., Протошак В. В., Янцев А. А. авторы;

References

1. Komyakov BG. Kischechnaya i appendikuljarnaja plastika mochetochnikov. M.: GJEOTAR-Media, 2015; 416 s. Russian.
2. Polyakov NV, Keshishev NG, Medvedev PE, Gurbanov ShSh, Serebryany SA, Merinov DS. Maloinvazivnye metody lechenija povrezhdenij mochetochnikov. Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija. 2020; 3: 132–40. DOI: 10.29188/2222-8543-2020-12-3-132-140. Russian.
3. Gild P, Kluth LA, Vetterlein MW, Engel O, Chun FKH, Fisch M. Adult iatrogenic ureteral injury and stricture—incidence and treatment strategies. Asian J Urol. 2018; 5 (2): 101–6. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.02.003.
4. Somani BK, Giusti G, Sun Y, Osther, PJ, Frank M, De Sio M, et al. Complications associated with ureterorenoscopy (URS) related to treatment of urolithiasis: the Clinical Research Office of Endourological Society URS Global study. World J Urol. 2017; 35 (4): 675–81. DOI: 10.1007/s00345-016-1909-0.
5. D'Addessi A, Bassi P. Ureterorenoscopy: avoiding and managing the complications. Urol Int. 2011; 87 (3): 251–9. DOI: 10.1159/000329286.
6. Komyakov BK, Novikov AI, Ochelenko VA, Guliev BG, Al-Attar TKh, Onoshko MV. Tehnicheskie osobennosti kischechnoj plastiki mochetochnikov. Chast' 6: odnovremennaja plastika mochetochnikov i mochevogo puzyrja. Urologija. 2017; 1: 12–15. DOI: 10.18565/urol.2017.1.12-15. Russian.
7. Elliott SP, Malaeb BS. Long-term urinary adverse effects of pelvic radiotherapy. World J Urol. 2011; 29 (1): 35–41. DOI: 10.1007/s00345-010-0603-x.
8. Orchard J, Tward JD, Lenherr S, Hotaling JM, Brant WO, Myers JB. Surgical Management of Ureteral Strictures Arising From Radiotherapy for Prostate Cancer. Urol Case Rep. 2016; 6: 47–49. DOI: 10.1016/j.eucr.2016.03.003.
9. Polyakov NV, Keshishev NG, Kachmazov AA, Grigorjeva MV, Gurbanov SS, Kovchenko GA, i dr. Operativnoe lechenie striktur nizhnjej treti mochetochnika posle luchevoj terapii organov malogo taza. Onkourologija. 2016; 12 (3): 68–73. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-68-73. Russian.
10. Katibov MI, Polyakov NV, Keshishev NG, Apolikhin OI, Kaprin AD. Ispol'zovanie bukkal'nogo grafta pri strikturah mochetochnika. Urologija. 2018; 1: 138–142. DOI: 10.18565/urology. 2018.1.138-142. Russian.
11. Kranz J, Brandt AS, Anheuser P, Reisch B, Steffens J, Roth S. Radiogene Harnleiterstrikturen: Mögliche Therapieoptionen [Ureteral stricture as a late complication of radiotherapy: Possible treatment options]. Urologe A. 2017; 56 (3): 322–28. DOI: 10.1007/s00120-016-0294-z.
12. Ganpule AP, Singh AG, Islam MR, Sonawane P, Sabnis RB, Desai MR. Robotic buccal mucosa graft ureteroplasty (inlay and onlay) for upper ureteric stricture: Point of technique. J Minim Access Surg. 2018; 14 (4): 357–61. DOI: 10.4103/jmas.JMAS_188_17.
13. Lee Z, Keehn AY, Sterling ME, Metro MJ, Eun DD. A Review of Buccal Mucosa Graft Ureteroplasty. Curr Urol Rep. 2018; 19 (4): 23. DOI: 10.1007/s11934-018-0772-5.
14. Volkov AA, Zuban ON, Budnik NV, Saenko GI. Ispol'zovanie kombinirovannogo bukkal'no-labial'nogo loskuta v hirurgicheskom lechenii protjazhennyh striktur i oblitteracij verhnjej treti i lohanочно-mochetochnikovogo segmenta. Hirurg. 2019; 10: 58–67. DOI: 10.33920/med-15-1910-05. Russian.
15. Kroepfl D, Loewen H, Klevecka V, Musch M. Treatment of long ureteric strictures with buccal mucosal grafts. BJU Int. 2010; 105(10): 1452–1455. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08994.x.
16. Sinelnikov LM, Protoshchak VV, Karpushenko EG, Babkin PA, Barannikov MV, Kislitsyn PO, avtory; Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe voennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «Voenno-meditsinskaja akademija imeni S.M. Kirova» Ministerstva oborony Rossijskoj Federacii (VMedA), patentoobladatel'. Sposob lechenija protjazhennyh striktur tazovogo otdela mochetochnika s ispol'zovaniem autotransplantata iz slizistoj shheki. Patent RF # 2712863. 01.07.2019. Russian.
17. Volkov AA, Zuban ON, Budnik NV, avtory. Volkov AA, patentoobladatel'. Sposob hirurgicheskogo lechenija recidivnyh i postluchevykh protjazhennyh striktur i oblitteracij nizhnjej treti mochetochnika. Patent RF # 2709167. 11.04.2019. Russian.
18. Hefermehl LJ, Tritschler S, Kretschmer A, Beck V, Stief CG, Schlenker B, et al. Open ureteroplasty with buccal mucosa graft for long proximal strictures: A good option for a rare problem. Investig Clin Urol. 2020; 61 (3): 316–22. DOI: 10.4111/icu.2020.61.3.316.
19. Nishimura Y, Moriya K, Nakamura M, Kitta T, Kanno Y, Chiba H, et al. Laparoscopic ureterocalicostomy for ureteropelvic junction obstruction in a 10-year-old female patient: a case report. BMC Res Notes. 2017; 10 (1): 247. DOI: 10.1186/s13104-017-2569-x.
20. Gong H, Lu Y, Yan Y, Wu Z, Gao W, Cheng H, et al. Laparoscopic Extravesical Submucosal Tunneling Ureteroneocystostomy Combined with Psoas Hitch for Medium-Length Distal Ureteral Defects in Adults. Urol Int. 2017; 98 (3): 343–49. DOI: 10.1159/000454735.
21. Manassero F, Mogorovich A, Fiorini G, Di Paola G, De Maria M, Sellì C. Ureteral reimplantation with psoas bladder hitch in adults: a contemporary series with long-term followup. Scientific World Journal. 2012; 2012: 379316. DOI: 10.1100/2012/379316.
22. Castilló-Vela I, Del Pozo Jiménez G, Turo Antona J, Vázquez Alba D, Sáenz Medina J, Carballido Rodríguez J. Reimplante ureteral laparoscópico con Flap de Boari [Laparoscopic Boari Flap ureteral reimplantation.]. Arch Esp Urol. 2017; 70 (4): 436–44.
23. Komyakov BK, Guliev BG. Hirurgija protjazhennyh suzhenij mochetochnikov. SPb.: Nevskij dialekt, 2005. 257 s. Russian.
24. Schott F, Becker B, Gross AJ, Netsch C. Symptomatic Distal Ureteral Stone in an Ileal Ureter: Treatment by Combined Supine Ureteroscopy and Mini Percutaneous Nephrolithotomy. J Endourol Case Rep. 2017; 3 (1): 90–92. DOI: 10.1089/cren.2017.0049.
25. Kocot A, Kalogirou C, Vergho D, Riedmiller H. Long-term results of ileal ureteric replacement: a 25-year single-centre experience. BJU Int. 2017; 120 (2): 273–279. DOI: 10.1111/bju.13825.
26. Fallon B., Gaynor-Drupnick DM. Adult ureteral reconstruction. Urol Board Rev Manual. 2004; 12 (30): 2–11.
27. Tran H, Arsovska O, Paterson RF, Chew BH. Evaluation of risk factors and treatment options in patients with ureteral stricture disease at a single institution. Can Urol Assoc J. 2015; 9 (11–12): E921–E924. DOI: 10.5489/cuaj.3057.
28. Xiong S, Wang J, Zhu W, Yang K, Ding G, Li X, et al. Onlay Repair Technique for the Management of Ureteral Strictures: A Comprehensive Review. Biomed Res Int. 2020; 2020: 6178286. DOI: 10.1155/2020/6178286.
29. Del Pozo Jiménez G, Castillón-Vela I, Carballido Rodríguez J. Uso de injerto de mucosa oral en el tratamiento de estenosis uretrales extensas: revisión de conjunto [Buccal mucosa graft for the treatment of long ureteral stenosis: Bibliographic review.]. Arch Esp Urol. 2017; 70 (4): 445–53.
30. Fahmy O, Schubert T, Khairul-Asri MG, Stenzl A, Gakis G. Total proximal ureter substitution using buccal mucosa. Int J Urol. 2017; 24 (4): 320–23. DOI: 10.1111/iju.13307.
31. Paronnikov MV, Shestaev AYU, Karpushchenko EG, Sinelnikov LM, Protoshchak VV, Yantsev AA, avtory; Federal'noe gosudarstvennoe

bjudzhethnoe voennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovanija «Voenno-medicinskaja akademija imeni S.M. Kirova» Ministerstva oborony Rossijskoj Federacii (VMedA),

patentoobladatel'. Sposob hirurgicheskogo lechenija protjazhennyh striktur mochetohnika. Patent RF # 2625782. 14.06.2016. Russian.

ДИССОМНИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА ПРИ ЮВЕНИЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ: ВЛИЯНИЕ НА КАЧЕСТВО ЖИЗНИ

А. А. Елезаров, А. С. Кучерявый, Л. Н. Гуменюк, Л. Е. Сорокина [✉], С. Р. Арифджанова, О. Ю. Гербали

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

Диссомнические расстройства (ДР) при ювенильном ревматоидном артрите (ЮРА) — одно из наиболее распространенных, тяжело переносимых и дезадаптирующих состояний. Цель исследования — оценить распространенность и структуру ДР, их взаимосвязь с клиническими особенностями, вклад в снижение качества жизни у больных ЮРА. На I этапе оценивали распространенность ДР в сплошной выборке больных ЮРА и здоровых детей 8–16 лет. На II этапе у больных ЮРА с верифицированными ДР оценивали их структуру, гендерно-возрастные особенности, взаимосвязь с основными клиническими характеристиками ЮРА, качеством жизни больных. Применяли шкалу для оценки качества сна SDSC, опросник качества жизни — PedsQL 4.0, индекс Ричи. У больных ЮРА ДР встречаются в 3,3 раза чаще, чем у здоровых детей (у 178 (72,3%) и у 93 (22,2%) соответственно). Спектр ДР был представлен расстройствами инициации и поддержания сна — 54 (22,0%), расстройствами дыхания — 32 (13,0%), расстройствами перехода сна в бодрствование — 31 (12,6%), расстройствами чрезмерной сонливости — 38 (15,4%) и их сочетаниями — 23 (9,3%). У девочек больше выражены расстройства инициации и поддержания сна ($p = 0,003$), у мальчиков — расстройства чрезмерной сонливости ($p = 0,008$). Тяжесть ДР нарастает по мере увеличения возраста больных ($r = 0,69$; $p = 0,001$) и возраста дебюта ЮРА ($r = 0,71$; $p = 0,001$), при полиартикулярном варианте ($r = 0,32$; $p = 0,048$). Уточнена связь ДР с показателями воспалительного ($r = 0,56$; $p = 0,001$), суставного индексов ($r = 0,44$; $p = 0,005$) и продолжительностью утренней скованности ($r = 0,49$; $p = 0,029$). Наличие взаимосвязи ДР и ЮРА диктует необходимость проведения рутинной диагностики ДР у данной категории больных, при этом для ведения ДР необходимо применять скорее персонализированный лечебно-диагностический подход, чем расценивать его в качестве одного из синдромов ЮРА.

Ключевые слова: ювенильный ревматоидный артрит, диссомнические расстройства, качество жизни

Вклад авторов: А. А. Елезаров, А. С. Кучерявый — сбор, анализ и интерпретация данных; Л. Н. Гуменюк — замысел и дизайн исследования; Л. Е. Сорокина, С. Р. Арифджанова, О. Ю. Гербали — подготовка статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» (протокол № 9 от 14 октября 2019 г.), спланировано и проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской организации; родители всех больных ЮРА и здоровых детей, включенных в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Лея Евгеньевна Сорокина
бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, Республика Крым, 295006; leya.sorokina@mail.ru

Статья получена: 05.10.2020 **Статья принята к печати:** 24.10.2020 **Опубликована онлайн:** 14.11.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.071

DISSOMIC DISORDERS ASSOCIATED WITH JUVENILE RHEUMATOID ARTHRITIS: IMPACT ON QUALITY OF LIFE

Elezarov AA, Kucheryavyy AS, Gumenyuk LN, Sorokina LE [✉], Arifdzhanova SR, Gerbali OYu

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

Dyssomnic disorders (DD) associated with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) are some of the most common conditions that are difficult to endure and that lead to deconditioning. This study aimed to assess prevalence and structure of DD, their relationship with clinical picture peculiarities and contribution to deterioration of the quality of lives of JRA patients. At the 1st stage, we assessed prevalence of DD in a continuous sample of JRA patients and healthy children aged 8–16 years. At the 2nd stage, we assessed DD structure, features associated with gender and age, connections to the key clinical characteristics of JRA and quality of life of the patients. In the context of the study, we used the SDSC sleep quality scale, the PedsQL 4.0 quality of life model, and the Ritchie index. DD develop in JRA patients 3.3 times more often than in healthy children (in 178 (72.3%) and 93 (22.2%) children, respectively). The DD registered were sleep initiation and maintenance disorders (54 cases, 22.0%), respiratory disorders (32 cases, 13.0%), sleep-to-wakefulness transition disorders (31 cases, 12.6%), excessive sleepiness disorders (38 cases, 15.4%), combinations thereof (23, 9.3%). Girls had sleep initiation and maintenance disorders more pronounced ($p = 0.003$), boys were more prone to excessive sleepiness ($p = 0.008$). The severity of DD increases with patients' age ($r = 0.69$; $p = 0.001$) and JRA onset age ($r = 0.71$; $p = 0.001$); they are also more severe in polyarticular JRA patients ($r = 0.32$; $p = 0.048$). We have clarified the relationship between DD and indicators of inflammatory ($r = 0.56$; $p = 0.001$) and Ritchie indices ($r = 0.44$; $p = 0.005$), duration of morning stiffness ($r = 0.49$; $p = 0.029$). The proven connection between DD and JRA entails the need for routine checks for DD in such patients, and, when discovered, DD should call for personalized therapeutic and diagnostic approach rather than be regarded as one of the JRA syndromes.

Keywords: juvenile rheumatoid arthritis, dyssomnic disturbances, quality of life

Author contribution: AA Elezarov, AS Kucheryavyy — data collection, analysis and interpretation; LN Gumenyuk — research concept and design; LE Sorokina, SR Arifdzhanova, OYu Gerbali — article preparation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethical committee of the S.I. Georgievsky Medical Academy of Vernadsky Crimean Federal University (Federal State Autonomous Educational Institution), minutes protocol #9 of October 14, 2019; it was planned and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, with parents of all JRA patients and healthy children included in the study signing a voluntary informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Leia E. Sorokina
Lenina bulvar, 5/7, Simferopol, Republic of Crimea, 295006; leya.sorokina@mail.ru

Received: 05.10.2020 **Accepted:** 24.10.2020 **Published online:** 14.11.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.071

Диссомнические расстройства (ДР) при ювенильном ревматоидном артрите (ЮРА) являются одними из наиболее распространенных, тяжело субъективно переносимых и дезадаптирующих состояний [1], что определяет их медицинскую и социальную значимость. Важный аспект последствий ДР — значительное отягощение течения основного заболевания, модификация клинического ответа на лечение и снижение эффективности реабилитации [2]. Кроме того, ДР ухудшают качество жизни ребенка днем, способствуют проявлению или усилению дневной сонливости, агрессивности, хронической усталости, дефицита внимания, снижению школьной успеваемости [3]. Как следствие, происходит ухудшение качества жизни больных, снижение приверженности терапии, увеличение финансовых затрат. Наряду с этим, связь имеющихся ДР с проявлениями ЮРА и их влияние на качество жизни больных в клинической практике нередко недооценивают.

Несмотря на то что факт имеющихся ДР у больных ЮРА доказан, данные об их распространенности противоречивы. В ряде публикаций показано, что частота ДР при ЮРА в 2,8 раза выше по сравнению с аналогичной возрастной популяцией здоровых детей [4, 5]. По другим данным, встречаемость ДР у больных ЮРА сопоставима с популяционными показателями [6].

Литературные данные свидетельствуют о преобладании в структуре ДР случаев ночного бодрствования и беспокойства, парасомнии, периодических движений конечностей, остановки дыхания, ранних утренних пробуждений и дневной сонливости [5]. Однако необходимо отметить, что большинство исследований посвящены лишь сравнению спектра ДР среди больных ЮРА и здоровых детей [7], в то время как гендерные и возрастные различия структуры ДР у данного контингента остаются практически неисследованными.

Патофизиология ДР при ЮРА многофакторна, их механизмы продолжают изучать. В доступной литературе преимущественно обсуждают вопросы, касающиеся причинно-следственных связей ДР и болевого синдрома [7]. В единичных работах рассмотрена взаимосвязь ДР с длительностью и клиническими характеристиками заболевания [1]. Однако результаты фрагментарны и недостаточны для однозначных выводов, что, вероятно, обусловлено различием выборов и методических подходов к организации исследований.

Отсутствуют сведения о вкладе возрастного фактора дебюта ЮРА в структуру и выраженность ДР. Актуален вопрос о связи ДР с основными характеристиками суставного синдрома. Несмотря на наличие результатов исследований, свидетельствующих о влиянии ДР на качество жизни больных ЮРА [2, 8], имеются единичные противоречивые данные.

Проблема ДР у больных ЮРА не имеет должного освещения в современной отечественной литературе.

Целью исследования было оценить распространенность и структуру диссомнических расстройств, характер их взаимосвязи с клиническими особенностями, вклад в снижение качества жизни у больных ЮРА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало два этапа. На первом проводили оценку распространенности ДР в сплошной выборке больных ЮРА и здоровых детей. Второй этап представлял собой одномоментное проспективное исследование больных ЮРА с коморбидными диссомническими

расстройствами, с целью оценки структуры, гендерных и возрастных особенностей пациентов с ДР, их взаимосвязи с основными анамнестическими данными и клиническими характеристиками ЮРА, качеством жизни больных.

Методом сплошной выборки в исследование было включено 246 больных с диагнозом ЮРА (средний возраст — $12,6 \pm 2,4$ (10,2; 15,0) лет), среди них 140 девочек (56,9%), 106 мальчиков (43,1%), и 420 здоровых детей (средний возраст — $12,6 \pm 2,4$ (10,2; 15,0) лет), среди них 252 девочки (60,0%) и 168 мальчиков (40,0%), соответствующих критериям включения в исследование и исключения. Группы были сопоставимы по полу ($p = 0,95$; χ^2) и возрасту ($p = 0,91$; χ^2).

Критерии включения пациентов в исследование: верифицированный диагноз ЮРА; возраст детей от 8 до 16 лет; длительность основного заболевания не менее года; информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: сопутствующие хронические воспалительные заболевания; психические расстройства; системный прием или внутрисуставное введение глюкокортикоидов за четыре недели до начала исследования; отказ от участия в клиническом исследовании.

Критерии включения здоровых детей: возраст от 7 до 16 лет; отсутствие хронических заболеваний и аллергических реакций; отсутствие инфекционных и острых заболеваний в течение двух месяцев перед исследованием.

Для проведения второго этапа исследования из общей выборки больных ЮРА были отобраны 178 пациентов с верифицированными ДР на первом этапе работы (по шкале нарушений сна для детей «Sleep disturbance scale for children», SDSC). Формирование групп больных осуществляли в зависимости от типа ДР: расстройства инициации и поддержания сна ($n = 54$), расстройства дыхания ($n = 41$), расстройства перехода сна в бодрствование ($n = 36$), расстройства чрезмерной сонливости ($n = 47$). Группы больных анализировали отдельно в зависимости от типа выявленных ДР. С целью нивелирования влияния сочетанных типов ДР на изучаемые параметры, в анализ не включали пациентов, набравших значения выше пороговых по двум и более подшкалам опросника SDSC.

Диагноз, характер течения и степень активности ЮРА устанавливали согласно классификационным критериям МКБ-10 (класс 8) [9] и рекомендаций ARA [10] и EULAR [11]. Для оценки суставного синдрома использовали индекс Ричи. Расстройства сна оценивали с помощью шкалы SDSC [12]; качество жизни (КЖ) больных определяли по опроснику «Pediatric quality of life inventory» (PedsQL 4.0; форма для детей) [13].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc.; USA). Проверку соответствия распределения значений признака характеристикам нормального распределения проводили с использованием метода Колмогорова–Смирнова. Поскольку большинство количественных признаков не отвечало законам нормального распределения, их описывали посредством медианы (Me) и квартилей (Me (25%; 75%)). Сравнение независимых групп по количественным признакам осуществляли с использованием U -критерия Манна–Уитни, по качественным — посредством анализа таблиц сопряженности с применением критерия χ^2 (хи-квадрат) и точного критерия Фишера. Сравнение зависимых групп по количественным признакам осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия считали достоверными

при $p < 0,05$. Оценку взаимосвязи между признаками проводили методом ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Жалобы на проблемы со сном у больных ЮРА были зарегистрированы в 211 (85,7%) случаях, у здоровых детей — в 140 (33,4%) случаях. Родители больных ЮРА статистически значимо чаще по сравнению с родителями здоровых детей сообщали о частых ночных пробуждениях ($p = 0,009$), укорочении общей продолжительности сна ($p < 0,001$), эпизодах остановки дыхания ($p = 0,001$), периодических движениях конечностей ($p = 0,006$), бруксизма ($p = 0,009$) и дневной сонливости ($p < 0,001$). По результатам шкалы SDSC, ДР установлены у 178 (72,3%) больных ЮРА и у 93 (22,2%) здоровых детей ($p < 0,001$). Спектр ДР у больных ЮРА был представлен расстройствами инициации и поддержания сна, расстройствами дыхания, расстройствами перехода сна в бодрствование, расстройствами чрезмерной сонливости и их сочетаниями (рис.).

Больные с расстройствами инициации и поддержания сна (РИ и ПС) (средний балл по субшкале РИ и ПС — 25,7 (23,0; 28,0)) по сравнению с больными без РИ и ПС (средний балл — 20,2 (16,0; 22,0)) отличались значительно старшим возрастом, более поздним дебютом ЮРА, статистически значимо большей длительностью заболевания, более высокой представленностью полиартикулярного варианта, большим числом пораженных суставов, более выраженным сокращением продолжительности сна, более высокой частотой и выраженностью эпизодов бруксизма, постсомнической усталости, большей тяжестью ночных пробуждений и расстройств возбуждения (РВ), большей выраженностью болевого индекса, более низкой оценкой эмоционального компонента (ЭК) КЖ и интегральной оценки (ИО) КЖ (табл. 1).

Больные с расстройствами дыхания (РД) (средний балл по субшкале РД — 10,6 (9,0; 12,5)) по сравнению

с больными без РД (средний балл — 4,9 (3,0; 6,7)) статистически значимо отличались более младшим возрастом, меньшей продолжительностью заболевания, большей длительностью засыпания, выраженностью ночного беспокойства и храпа, более высокой частотой и выраженностью дневной сонливости, большей тяжестью расстройств чрезмерной сонливости (РЧС), более низкой оценкой физического компонента (ФК) КЖ (табл. 2).

Больные с расстройствами перехода сна в бодрствование (РП С-Б) (средний балл по субшкале РП С-Б — 26,5 (25,0; 27,0)) по сравнению с больными без РП С-Б (средний балл — 18,2 (16,0; 20,0)) характеризовались более старшим возрастом, более высокой статистически значимой представленностью олигоартикулярного варианта, более высокой частотой и выраженностью трудностей с укладыванием, представленностью проблем с засыпанием, более высокой частотой и выраженностью бруксизма, кошмарных сновидений, чрезмерной потливости, трудностей пробуждения, большей выраженностью периодических движений конечностей и частой смены позы (ПДК и ЧСП), тяжестью расстройств возбуждения и чрезмерной сонливости, большей выраженностью болевого индекса, более низкой оценкой социального компонента (СК) КЖ (табл. 3).

Больные с РЧС (средний балл по субшкале РЧС — 23,1 (21,0; 25,0)) по сравнению с больными без РЧС (средний балл — 14,4 (12,0; 18,0)) статистически значимо отличались преобладанием лиц мужского пола, более старшим возрастом, большей длительностью и более ранним дебютом ЮРА, более высокой активностью воспалительного процесса, более выраженным сокращением продолжительности сна, более высокими частотой и числом ночных пробуждений, увеличением продолжительности бодрствования после засыпания, частотой остановки дыхания, распространенностью и частотой эпизодов храпа, большей выраженностью постсомнической астении, более низкой оценкой качества сна, большей выраженностью воспалительного индекса,

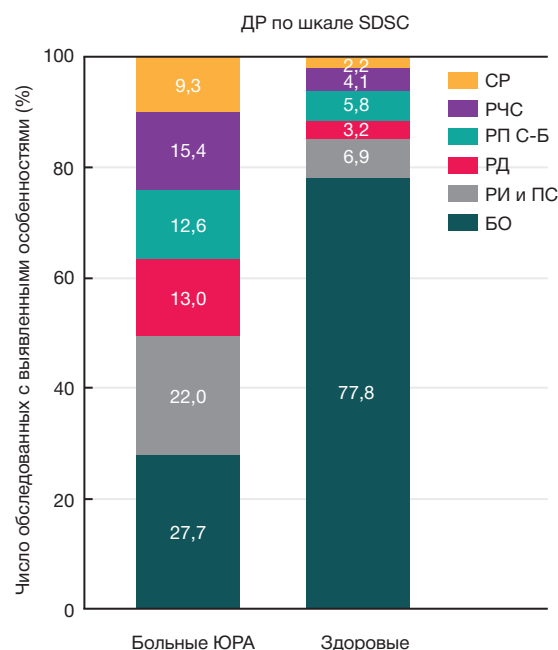
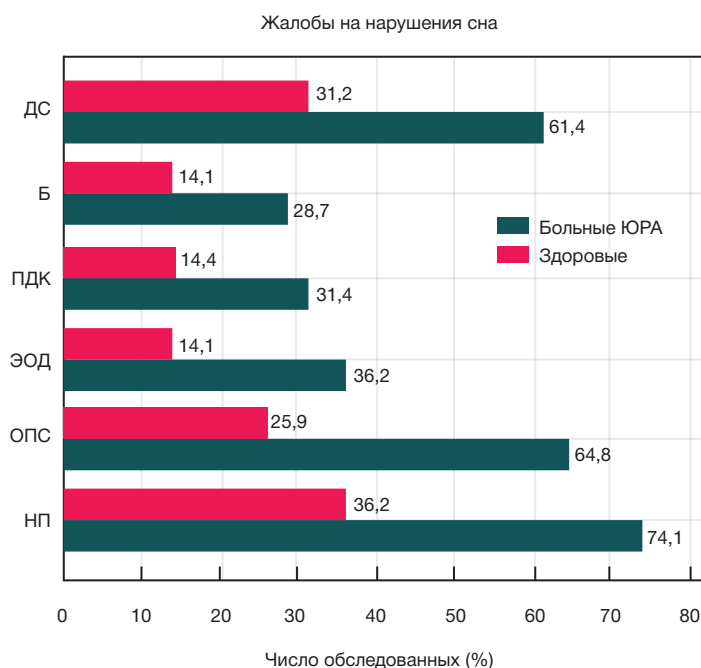


Рис. Структура нарушений сна у больных ЮРА и здоровых детей. ДР — диссомнические расстройства; НП — ночные пробуждения; УОПС — укорочение общей продолжительности сна; ЭОД — эпизоды остановки дыхания; ПДК — периодические движения конечностей; Б — бруксизм; ДС — дневная сонливость; БО — без особенностей; РИ и ПС — расстройства инициации и поддержания сна; РД — расстройства дыхания; РП С-Б — расстройства перехода сна в бодрствование; РЧС — расстройства чрезмерной сонливости; СР — сочетанные расстройства

Таблица 1. Сравнительный анализ больных с наличием и отсутствием расстройств инициации и поддержания сна

	С РИ и ПС n = 44	Без РИ и ПС n = 96	p
Возраст	14,2 (13,3; 16,0)	8,1 (7,0; 13,2)	p = 0,063*
Дебют ЮРА (лет)	11,4 (6,0; 15,0)	3,4 (1,0; 5,0)	p < 0,001***
Длительность ЮРА (лет)	6,2 (5,8; 7,1)	3,3 (1,0; 4,6)	p = 0,006**
Полиартикулярный вариант (%)	62,4	33,2	p = 0,008**
Число пораженных суставов ≥ 4 (%)	71,4	42,6	p = 0,044*
SDSC 1 Продолжительность сна (ч)	5,4 (5,0; 7,3)	7,1 (6,5; 8,2)	p = 0,001**
SDSC 10 Ночные пробуждения (баллы)	4,1 (4,0; 5,0)	3,4 (2,0; 4,0)	p = 0,002**
Ночные пробуждения (число за ночь)	6,1 (4,8; 7,4)	4,2 (3,2; 5,2)	p = 0,003**
SDSC 11 Бодрствование после засыпания (баллы)	4,2 (3,0; 5,0)	3,1 (2,0; 4,0)	p = 0,011*
SDSC 19 Бруксизм (баллы)	3,5 (2,0; 5,0)	2,9 (1,0; 4,0)	p = 0,007**
SDSC 23 Постсомническая усталость (баллы)	4,1 (3,0; 5,0)	2,8 (2,0; 4,0)	p = 0,013**
Постсомническая усталость (есть/нет, %)	78,9/21,1	61,4/38,6	p = 0,006**
SDSC 24 Двигательные ограничения во время пробуждения (баллы)	3,6 (3,0; 4,0)	1,8 (1,0; 2,0)	p = 0,012*
Двигательные ограничения во время пробуждения (есть/нет, %)	42,2/57,8	12,1/87,9	p < 0,001***
SDSC подшкала РВ (баллы)	7,8 (6,0; 9,0)	4,2 (1,0; 6,0)	p = 0,001**
SDSC Интегративный показатель (баллы)	54,4 (52,0; 61,0)	45,4 (41,0; 50,0)	p = 0,009**
Болевой индекс (баллы)	3,1 (2,0; 4,2)	1,5 (1,2; 1,8)	p = 0,034*
ЭК КЖ (баллы)	55,6 (50,9; 61,0)	66,8 (60,0; 72,5)	p = 0,004**
ИО КЖ (баллы)	59,8 (54,8; 64,7)	67,1 (62,1; 71,4)	p = 0,003**

Примечание: представлены значения при $p < 0,05$; * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); ** — $p < 0,01$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); *** — $p < 0,001$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); ** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); *** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); n — число наблюдений.

продолжительностью утренней скованности, более низкой оценкой школьного функционирования (ШФ) и интегральной оценки КЖ (табл. 4).

В связи с вариабельностью течения многих заболеваний в зависимости от пола, были проанализированы особенности структуры и выраженности ДР у больных ЮРА с учетом полового диморфизма. Полученные данные свидетельствуют о более высокой статистически значимой представленности у девочек укорочения продолжительности сна — в 73,7 (66,4%) случаев, кошмарных сновидений — в 44 (39,9%) и постсомнической астении — в 79,0 (71,2%) по сравнению с мальчиками — в 29 (42,8%) случаев при $p = 0,029$, в 16 (23,6%) при $p = 0,048$ и в 30 (44,9%) случаев при $p = 0,001$ соответственно. У девочек выявлено также статистически

значимое увеличение числа эпизодов пробуждения за ночь — 7,0 (5,2; 7,8) против 5,0 (3,1; 6,4) у мальчиков ($p = 0,002$) и частоты бруксизма — 4,5 (3,0; 5,0) против 3,3 (2,0; 4,0) соответственно ($p = 0,019$). Значимой оказалась большая выраженность РИ и ПС у девочек, а именно 25,1 (23; 28) против 23,0 (21; 24) у мальчиков ($p = 0,003$), и РЧС у мальчиков, а именно 24,2 (22; 26) против 21,6 (20; 23) у девочек ($p = 0,008$).

В ходе уточнения возрастной специфики ДР установлена статистически значимая более высокая частота сочетания симптомов РИ и ПС и РП С-Б у больных в возрасте 15,7 (14,1; 16,0) лет по сравнению с больными 10,9 (7,0; 14,0) лет, она составила 37 (36,1%) баллов против 12 (16,4%) соответственно ($p = 0,007$). Показатель интегративной оценки качества сна (ИОКС) был статистически значимо

Таблица 2. Сравнительный анализ больных с наличием и отсутствием расстройств дыхания

Параметры	С РД n = 32	Без РД n = 135	p
Возраст (лет)	9,4 (7,0; 11,6)	15,8 (11,7; 16,0)	p = 0,008**
Длительность ЮРА (лет)	3,1 (1,0; 4,2)	5,7 (3,0; 6,6)	p = 0,034*
SDSC 2 Длительность засыпания (минуты)	38,1 (30,0; 42,4)	51,4 (47,2; 55,5)	p = 0,004**
SDSC 5 Ночное беспокойство/страхи (баллы)	4,3 (3,0; 5,0)	3,4 (2,0; 5,0)	p = 0,011*
SDSC 14 Остановка дыхания (баллы)	4,2 (4,0; 5,0)	2,2 (2,0; 3,0)	p = 0,003**
SDSC 15 Храп (баллы)	3,5 (3,0; 5,0)	2,1 (1,0; 3,0)	p = 0,008**
SDSC 25 Дневная сонливость (баллы)	4,2 (3,0; 5,0)	2,8 (2,0; 4,0)	p = 0,003**
Дневная сонливость (есть/нет, %)	62,5/37,5	44,6/55,4	p = 0,046*
SDSC Подшкала РЧС (баллы)	16,4 (13,0; 18,0)	11,6 (10,0; 14,0)	p = 0,009**
ФК КЖ (баллы)	58,4 (55,7; 60,0)	63,1 (61,1; 66,7)	p = 0,007**

Примечание: в таблице представлены значения при $p < 0,05$; * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); ** — $p < 0,01$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); *** — $p < 0,001$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); ** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); n — число наблюдений (здесь и в табл. 2–4).

ниже у больных в возрасте 8,6 (6,0; 10,4) лет по сравнению с больными 13,7 (10,1; 16,0) лет — 26,7 (22,4; 28,0) против 32,2 (29,6; 35,8) баллов соответственно ($p < 0,001$). Получены статистически значимые корреляции значений возраста с частотой ночных симптомов ($r = 0,55$; $p = 0,001$) и выраженностью ДР ($r = 0,69$; $p = 0,001$).

Установлена сопряженность возраста дебюта ЮРА и выраженности ДР: значения РИ и ПС, РЧС, ИОКС были статистически значимо выше у больных с началом заболевания в старшем возрасте (11,2 (10,0; 15,0) лет) по сравнению с больными с возрастом дебюта 5,6 (1,0; 10,0) лет — 31,2 (26,2; 33,0), 25,1 (23,0; 27,4) и 49,7 (45,0; 52,1) баллов против 24,6 (22,1; 26,0) ($p = 0,008$), 18,9 (16,0; 20,2) ($p = 0,006$) и 35,9 (32,0; 38,1) баллов ($p = 0,001$) соответственно. Нарастание тяжести ДР по мере увеличения возраста начала заболевания подтверждено наличием статистически значимой корреляционной связи между возрастом дебюта ЮРА и ИОКС по шкале SDSC ($r = 0,71$; $p = 0,001$).

Увеличение длительности ЮРА было сопряжено с нарастанием тяжести расстройств инициации и поддержания сна, чрезмерной сонливости: показатель РИ и ПС у больных с продолжительностью заболевания 8,3 (6,1; 9,7) года составил 32,2 (29,0; 34,1) балла и статистически значимо превышал значения у больных с продолжительностью заболевания 2,2 (1,0; 3,0) года — 24,8 (23,0; 26,1) балла ($p = 0,001$) и с продолжительностью 4,5 (3,1; 6,0) года — 28,4 (24,0; 30,0) баллов ($p = 0,008$); показатель РЧС — 22,9 (20,0; 23,4) балла, 19,2 (15,0; 20,9) ($p = 0,048$) и 16,5 (14,4; 20,1) ($p = 0,005$) соответственно. У больных с длительностью ЮРА 8,3 (6,1; 9,7) года независимо от структуры и выраженности ДР выявлено также статистически значимое сокращение продолжительности сна по сравнению с больными с продолжительностью

болезни 2,2 (1,0; 3,0) года — 6,6 (5,0; 7,0) ч против 8,6 (8,0; 9,0) ч соответственно ($p = 0,001$). Однако взаимосвязь между интегративной оценкой качества сна и длительностью ЮРА не подтверждена: ИПКС у больных с продолжительностью заболевания 2,2 (1,0; 3,0) года составил 33,9 (31,2; 36,8), с продолжительностью 4,5 (3,1; 6,0) года — 32,4 (30,0; 35,8) и с продолжительностью 8,3 (6,1; 9,7) года — 35,1 (32,4; 36,9) балла.

При оценке зависимости между вариантом ЮРА и особенностями ДР отмечена тенденция к учащению ночных пробуждений и нарастанию выраженности РИ и ПС при полиартикулярном варианте ЮРА по сравнению с олигоартикулярным: 6,5 (3,8; 7,3) раз за ночь, 38,4 (35,2; 40,1) баллов против 5,7 (3,4; 6,6) раз за ночь, 37,6 (33,9; 39,2) баллов, однако не достигающая степени статистической значимости. Индекс дневной сонливости у больных с четырьмя и более пораженными суставами статистически значимо превышал показатель больных, у которых поражены от одного до трех суставов — 4,4 (3,0; 5,0) балла против 3,1 (2,2; 4,0) балла соответственно ($p = 0,004$). Проведение корреляционного анализа выявило взаимосвязь между выраженностью дневной сонливости и увеличением числа пораженных суставов ($r = 0,32$; $p = 0,048$).

Увеличение степени активности ЮРА было сопряжено с нарастанием выраженности ДР, однако статистически значимых различий ИОКС в зависимости от степени активности ЮРА не выявлено: у детей в стадии ремиссии данный показатель составил 32,2 (30,0; 34,1) балла, при I степени — 33,1 (30,9; 34,8) балла, при II степени — 34,2 (30,0; 35,2) балла, при III степени активности — 34,4 (31,6; 36,0) балла. Результаты корреляционного анализа подтвердили отсутствие связи между степенью активности ЮРА и выраженностью ДР.

Таблица 3. Сравнительный анализ больных с наличием и отсутствием расстройств перехода сна в бодрствование

Параметры	С РП С-Б $n = 26$	Без РП С-Б $n = 114$	p
Возраст (лет)	15,2 (14,0; 16,0)	11,6 (7,4; 13,9)	$p = 0,048^*$
Олигоартикулярный вариант (n , %)	64,2/35,8	32,1/67,9	$p = 0,006^{**}$
SDSC 3 Трудности с укладыванием в постель (баллы)	3,8 (3,0; 5,0)	1,9 (1,0; 3,0)	$p = 0,004^{**}$
Трудности с укладыванием в постель (есть/нет, %)	64,4/35,6	22,9/77,1	$p = 0,001^{**}$
Трудности с засыпанием (есть/нет, %)	72,8/27,2	42,5/57,5	$p = 0,001^*$
SDSC 12 ПДК и ЧСП (баллы)	4,1 (2,0; 5,0)	2,2 (1,0; 4,0)	$p = 0,007^{**}$
SDSC 16 Чрезмерная потливость (баллы)	3,4 (2,0; 4,0)	2,5 (1,0; 3,0)	$p = 0,011^*$
SDSC 16 Чрезмерная потливость (есть/нет, %)	46,6/53,4	14,2/85,8	$p < 0,001^{***}$
SDSC 19 Бруксизм (баллы)	4,3 (3,0; 5,0)	2,9 (1,0; 3,0)	$p = 0,003^{**}$
SDSC 19 Бруксизм (есть/нет, %)	88,6/11,4	14,2/85,8	$p < 0,001^{***}$
SDSC 21 Кошмарные сновидения (баллы)	4,2 (3,0; 4,0)	2,8 (2,0; 3,0)	$p = 0,015^*$
Кошмарные сновидения (есть/нет, %)	51,1/48,9	33,4/66,6	$p = 0,019^*$
SDSC 22 Трудности пробуждения (баллы)	4,5 (4,0; 5,0)	2,4 (1,0; 3,0)	$p = 0,005^{**}$
Трудности пробуждения (есть/нет, %)	81,7/18,3	35,4/64,6	$p = 0,006^{**}$
SDSC Подшкала РВ (баллы)	10,1 (6,0; 12,0)	8,1 (4,0; 10,0)	$p = 0,009^{**}$
SDSC Подшкала РЧС (баллы)	19,2 (16,0; 20,0)	14,4 (12,0; 18,0)	$p = 0,006^{**}$
Болевой индекс (баллы)	3,4 (2,0; 4,5)	2,5 (2,2; 3,6)	$p = 0,021^*$
ЭК КЖ (баллы)	55,6 (50,9; 61,0)	66,8 (60,0; 72,5)	$p = 0,005^{**}$
СФ КЖ	54,4 (51,2; 57,8)	66,4 (61,1; 70,7)	$p = 0,001^{**}$

Примечание: в таблице представлены значения при $p < 0,05$; * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию U Манна-Уитни); ** — $p < 0,01$ (уровень значимости различий по критерию U Манна-Уитни); *** — $p < 0,001$ (уровень значимости различий по критерию U Манна-Уитни); • — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); ** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); *** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); n — число наблюдений.

В ходе изучения влияния ДР на КЖ больных ЮРА установлены следующие особенности: снижение оценки по шкале физического функционирования коррелировало с сокращением продолжительности сна ($r = 0,56$; $p = 0,001$), нарастанием постсомнической усталости ($r = -0,49$; $p = 0,028$), РД ($r = -0,46$; $p = 0,001$) и РЧС ($r = -0,73$; $p = 0,0001$), снижением ИОКС ($r = -0,56$; $p = 0,001$). Снижение оценки по шкале эмоционального функционирования зависело от продолжительности сна ($r = 0,71$; $p = 0,008$), частоты ночных пробуждений ($r = -0,74$; $p = 0,001$), выраженности бруксизма ($r = -0,81$; $p = 0,0001$), РИ и ПС ($r = -0,77$; $p < 10^{-6}$) и ИОКС ($r = -0,71$; $p = 0,0001$). Снижение оценки социального функционирования коррелировало с частотой эпизодов остановки дыхания ($r = -0,44$; $p = 0,012$), постсомнической усталостью ($r = -0,55$; $p = 0,001$), дневной сонливостью ($r = -0,79$; $p = 0,028$), РИ и ПС ($r = -0,44$; $p = 0,006$), РП С-Б ($r = -0,68$; $p = 0,012$). Снижение баллов по шкале ШФ зависело от частоты эпизодов остановки дыхания ($r = -0,67$; $p = 0,001$), выраженности дневной сонливости ($r = -0,88$; $p = 0,006$) и РЧС ($r = -0,92$; $p = 0,008$). Снижение ИПКЖ коррелировало с нарастанием РИ и ПС ($r = -0,91$; $p = 0,001$), ИПКС ($r = -0,91$; $p < 10^{-6}$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что факт имеющих ДР у больных ЮРА доказан, данные об их частоте и структуре единичны и фрагментарны, а предположения о связи с заболеванием являются дискуссионными. Ряд исследований свидетельствует о более высокой распространенности ночного бодрствования, беспокойного сна, нарушений дыхания, периодических движений конечностей во сне и дневной сонливости у больных ЮРА по сравнению со здоровыми сверстниками [5–7, 14]. Но в то же время приводятся

показатели встречаемости ДР при ЮРА, сопоставимые с популяционными [6]. В настоящем исследовании показано, что у больных ЮРА ДР встречаются в 3,3 раза чаще, чем у здоровых сверстников (72,3 против 22,2%). Полученные нами результаты согласуются с данными более ранних работ, установивших высокую распространенность ДР среди больных ЮРА (от 40 до 71,4%) [4, 5] по сравнению с соответствующей возрастной популяцией без ЮРА (25%) [4].

По нашим данным, у больных ЮРА встречаемость периодических движений конечностей во сне, ночных пробуждений и дневной сонливости превышает показатели здоровых сверстников и подтверждает точку зрения ряда других исследователей [5]. Отмеченная в литературе высокая частота встречаемости пресомнических расстройств в виде нарушений засыпания у больных ЮРА [15] в нашем исследовании не подтвердилась. По полученным нами данным, распространенность частых ночных пробуждений и их ассоциация с более выраженной дневной сонливостью близки к результатам, полученным в двух других работах [5, 16]. В отличие от уже опубликованных результатов [1, 6, 14], согласно которым парасомнии и нарушение дыхания во сне рассматривают как наиболее частые проявления ДР у больных ЮРА, по нашим данным, для этой категории пациентов также характерна более высокая представленность укорочения общей продолжительности сна. Дети с ЮРА и их родители сообщают о значительно большем числе случаев парасомний в виде кошмарных сновидений и снохождения по сравнению со здоровыми сверстниками [7]. Нами установлено преобладание у больных ЮРА парасомний в виде бруксизма.

В настоящем исследовании показана связь ДР с полом больных. У девочек наблюдается более высокая представленность укорочения продолжительности сна, кошмарных сновидений и постсомнической астении, увеличение числа эпизодов пробуждений и бруксизма,

Таблица 4. Сравнительный анализ больных с наличием и отсутствием расстройств чрезмерной сонливости

Параметры	С РЧС $n = 38$	Без РЧС $n = 129$	p
Пол (муж./жен., %)	56,8/21,2	33,2/66,8	$p = 0,021^*$
Возраст (лет)	13,9 (12,0; 16,0)	9,2 (7,0; 11,9)	$p = 0,018^*$
Длительность ЮРА (лет)	5,8 (3,5; 7,6)	3,1 (1,0; 4,4)	$p = 0,016^*$
Дебют ЮРА	3,9 (1,0; 8,1)	9,1 (6,6; 16,0)	$p = 0,002^{**}$
Степень активности I (л, %)	34,6	55,2	$p = 0,027^*$
Степень активности III (л, %)	62,5	39,5	$p = 0,009^{**}$
SDSC 1 Продолжительность сна (часы)	6,9 (6,0; 7,5)	8,4 (8,0; 9,8)	$p = 0,004^{**}$
SDSC 10 Ночные пробуждения (баллы)	4,6 (4,0; 5,0)	3,1 (2,0; 4,0)	$p = 0,003^{**}$
Ночные пробуждения (число за ночь)	7,3 (5,2; 9,4)	4,2 (2,8; 5,6)	$p = 0,003^{**}$
Бодрствование после засыпания (минуты)	$22,4 \pm 3,4$	$10,2 \pm 1,8$	$p < 0,001^{***}$
SDSC 14 Остановка дыхания (есть/нет, %)	68,6/31,4	39,5/60,5	$p < 0,001^{***}$
SDSC 15 Храп (баллы)	3,6 (3,0; 5,0)	2,2 (1,0; 3,0)	$p = 0,005^{**}$
Храп (есть/нет, %)	56,7/43,3	32,6/67,4	$p = 0,006^{**}$
SDSC 23 Постсомническая усталость (баллы)	4,6 (4,0; 5,0)	3,3 (2,0; 4,0)	$p = 0,012^*$
SDSC Интегративный показатель (баллы)	63,1 (60,0; 66,0)	53,2 (50,0; 60,0)	$p = 0,001^{**}$
Воспалительный индекс (баллы)	0,8 (0,5; 0,9)	0,6 (0,3; 0,7)	$p = 0,018^*$
Утренняя скованность (минуты)	48,6 (44,2; 52,0)	39,1 (36,3; 40,2)	$p = 0,001^{**}$
ШФ КЖ	54,9 (52,0; 58,5)	62,2 (58,4; 65,0)	$p = 0,015^*$
ИО КЖ (баллы)	58,0 (56,8; 60,7)	66,1 (64,0; 68,9)	$p = 0,006^{**}$

Примечание: в таблице представлены значения при $p < 0,05$; * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); ** — $p < 0,01$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); *** — $p < 0,001$ (уровень значимости различий по критерию U Манна–Уитни); * — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); ** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); *** — $p < 0,05$ (уровень значимости различий по критерию χ^2); n — число наблюдений.

большая выраженность РИ и ПС, у мальчиков — большая выраженность РЧС. Данные различия, возможно, обусловлены влиянием как биологических, так и психосоциальных факторов. Принимая во внимание полученные результаты и современные тенденции к персонализации терапии, вопрос о специфичности межполовых различий в проявлении и патофизиологической основе ДР при ЮРА нуждается в дальнейшем изучении. Прослежена возрастная специфика ДР: с увеличением возраста больных наблюдается нарастание полиморфизма и тяжести диссомнических проявлений. Полученные данные не согласуются с результатами одного из исследований, согласно которому возраст больных обратно коррелирует с нарушениями сна [17].

В качестве потенциальных предпосылок, определяющих особенности нарушений сна у больных ЮРА, рассматривают длительность заболевания и клинико-анатомические особенности (вариант, число пораженных суставов, степень активности процесса) [1]. Однако данные о роли этих факторов в изменении структуры сна неоднозначны.

Установлено, что больные с РЧС отличаются наиболее высокими показателями воспалительного индекса и продолжительности утренней скованности. Большая тяжесть РИ и ПС, РЧС отмечается у больных с началом заболевания в старшем возрасте (11–15 лет). Нарастание тяжести ДР по мере увеличения возраста начала заболевания подтверждено наличием статистически значимой сильной корреляционной связи между возрастом дебюта ЮРА и ИОКС по шкале SDSC. Данный факт не обнаружен нами в какой-либо аналогичной работе и нуждается в дополнительном изучении.

В настоящем исследовании установлено сокращение продолжительности сна, нарастание выраженности РИ и ПС, РЧС по мере увеличения длительности ЮРА. Однако взаимосвязь между ИОКС и длительностью ЮРА не подтверждена. Полученные данные близки к результатам, свидетельствующим об отсутствии или слабой взаимосвязи интегративной оценки качества сна и длительности заболевания [18].

Отмеченное отсутствие различий выраженности ДР при различных вариантах ЮРА [1] подтвердилось и в нашей работе. Установлена тенденция к учащению ночных пробуждений и нарастанию выраженности расстройств инициации и поддержания сна при полиартрикулярном варианте заболевания, однако не достигающая степени статистической значимости. Несмотря на наличие результатов исследований, свидетельствующих о взаимосвязи структуры ДР и числа пораженных суставов, результаты противоречивы [18]. У больных ЮРА выявлена четкая зависимость: выраженность дневной сонливости повышается с увеличением числа пораженных суставов. Полученные данные согласуются с результатами исследования, согласно которому больные с полиартритом имели более высокие баллы по педиатрической шкале дневной сонливости [19]. Отсутствие связи между выраженностью ДР и активностью ЮРА в нашей работе согласуется с данными исследования [1], в котором не было выявлено корреляции между активностью заболевания и тяжестью нарушений сна по данным шкалы CSHQ.

Нами показана мультифакторность ДР у больных ЮРА и уточнена взаимосвязь их проявлений с

основными параметрами суставного синдрома. В ряде исследований боль у больных ЮРА рассматривается в качестве предиктора нарушений сна [7, 8], однако доказательства непосредственно прямой связи болевого синдрома с диссомническими расстройствами отсутствуют. Большинство авторов указывает, что концептуальные модели нарушений сна и боли предполагают сложные, двунаправленные отношения [14]. При этом показано, что у больных ЮРА нарушение качества сна в отношении боли обладает более высоким уровнем прогностической значимости в отличие от двусторонней направленности [20]. Наше исследование продемонстрировало, что у больных с РИ и ПС отмечается наиболее выраженное усиление укорочения общей продолжительности сна и усиления болевого синдрома. Данная связь ожидаема, так как уменьшение длительности сна усиливает центральную сенсibilизацию, составляющую основу снижения порога чувствительности. Полученные результаты подтверждают данные ранее выполненных исследований, согласно которым самооценка тяжести и частота боли значительно связаны с нарушением структуры и качества сна [1, 6, 7]. Однако отмеченная значительная корреляция дневной сонливости и выраженности болевого синдрома [19] в нашем исследовании не подтвердилась. Показано, что больные с РЧС отличаются наиболее высокими показателями воспалительного индекса и продолжительности утренней скованности. Данный факт не обнаружен нами в какой-либо аналогичной работе и необходимо дополнительное изучение.

Значимым аспектом представленной работы является уточнение влияния проявлений ДР на параметры качества жизни больных ЮРА. Необходимо отметить, что в работах, посвященных оценке интерференции различных проявлений ЮРА на качество жизни, роль ДР варьирует от статуса одного из ведущих факторов его ухудшения [2] до низкого уровня значимости [8].

Противоречивость данных, вероятно, обусловлена разнородностью популяции обследованных пациентов и различием методических подходов к организации исследований. В результате нашего исследования было показано, что больные ЮРА с РИ и ПС отличаются худшей оценкой эмоционального функционирования, больные с РД — физического, больные с РП С-Б — социального и больные с РЧС — школьного функционирования. Подтверждена взаимосвязь выраженности ДР и интегративной оценки КЖ. Значимое негативное влияние ДР на показатели КЖ больных ЮРА является основанием для разработки адекватных методов их коррекции.

ВЫВОДЫ

Таким образом, наличие взаимосвязи между ДР и ЮРА диктует необходимость проведения рутинной диагностики ДР у данной категории больных, при этом для лечения ДР необходима скорее персонифицированная лечебно-диагностическая тактика, их не следует расценивать в качестве одного из синдромов ЮРА. Дальнейшее изучение взаимосвязи ДР и ЮРА должно включать не только регистрацию эпидемиологических данных, но и изучение механизмов патогенеза указанных коморбидных состояний.

Литература

- Butbul AY, Stremmler R, Benseler SM, et al. Sleep and fatigue and the relationship to pain, disease activity and quality of life in juvenile idiopathic arthritis and juvenile dermatomyositis. *Rheumatology*. 2011; 50 (11): 2051–60. DOI: 10.1093/rheumatology/ker256.
- Stinson JN, Hayden JA, AholaKohut S, Soobiah C, et al. Sleep problems and associated factors in children with juvenile idiopathic arthritis: a systematic review. *Pediatric Rheumatology*. 2014; 12 (1): 19. DOI: 10.1186/1546-0096-12-19.
- Meltzer LJ, Mindell JA. Sleep and sleep disorders in children and adolescents. *Psychiatr Clin North Am*. 2006; 29 (4): 1059–76. DOI: 10.1016/j.psc.2006.08.004.
- Tarakci E, Arman N, Barut K, et al. Fatigue and sleep in children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Turk J Med Sci*. 2019; 49: 58–65. DOI: 10.3906/sag-1711-167.
- Ward TM, Sonney J, Ringold S, et al. Sleep Disturbances and Behavior Problems in Children with and without Arthritis. *J Pediatr Nurs*. 2014; 29 (4): 321–8. DOI: 10.1016/j.pedn.2014.03.022.
- Bromberg MH, Gil KM, Schanberg LE. Daily sleep quality and mood as predictors of pain in children with juvenile polyarticular arthritis. *Health Psychol*. 2012; 31 (2): 202–9. DOI: 10.1037/a0025075.
- Bloom BJ, Owens JA, McGuinn M, et al. Sleep and its relationship to pain, dysfunction, and disease activity in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002; 29 (1): 169–73. DOI: 10.1007/s10067-013-2409-x.
- Chen X, Sekine M, Hamanishi S, et al. Associations of lifestyle factors with quality of life (QOL) in Japanese children: a 3-year follow-up of the Toyama Birth Cohort Study. *Child Care Health Dev*. 2005; 31: 4339. DOI: 10.1111/j.1365-2214.2005.00529.x.
- Овчаров В. К., Максимов М. В. Справочник Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра (МКБ-10). Российская академия медицинских наук, НИИ социальной гигиены, экономики и управления здравоохранением им. Н. А. Семашко. 2011, 593 с.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315–24. DOI: 10.1002/art.1780310302.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology. European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 569–81. DOI: 10.1002/art.27584.
- Bruni O, Ottaviano S, Guidetti V, et al. The Sleep Disturbance Scale for Children (SDSC). Construction and validation of an instrument to evaluate sleep disturbances in childhood and adolescence. *J Sleep Res*. 1996; 5: 251–61.
- Varni J, Seid M, Kurtin P. The PedsQL 4.0: Reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Version 4.0 Generic Core Scales in healthy and patient populations. *Medical Care*. 2001; 39: 800–12. DOI: 10.1097/00005650-200108000-00006.
- Ward TM, Ringold S, Metz J, et al. Sleep disturbances and neurobehavioral functioning in children with and without juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res*. 2011; 63 (7): 1006–12. DOI: 10.1002/acr.20469.
- Biggs SN, LushingtonK, Cameron J, et al. Inconsistent sleep schedules and daytime behavioral difficulties in school-aged children. *Sleep Medicine*. 2011; 12 (8): 780–6. DOI: 10.1016/j.sleep.2011.03.017.
- Ringold S, Ward TM, Wallace CA. Disease activity and fatigue in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res*. 2013; 65 (3): 391–7. DOI: 10.1002/acr.21801.
- Long AC, Krishnamurthy V, Palermo TM. Sleep disturbances in school-age children with chronic pain. *J Pediatr Psychol*. 2008; 33 (3): 258–68. DOI: 10.1093/jpepsy/jsm129.
- Zamir G, Press J, Tal A, Tarasiuk A. Sleep fragmentation in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1998; 25 (6): 1191–7.
- Amos CE, Curry MR, Drutz IE, Frost JD, Warren RW. Sleep disruption in school-aged children with JRA [abstract]. *Arthritis Rheum*. 1997; 40 Suppl: S244.
- Valrie CR, Bromberg MH, Palermo T, Schanberg LE. A systematic review of sleep in pediatric pain populations. *J Dev Behav Pediatr*. 2013; 34 (2): 120–8. DOI: 10.1097/DBP.0b013e31827d5848.

References

- Butbul AY, Stremmler R, Benseler SM, et al. Sleep and fatigue and the relationship to pain, disease activity and quality of life in juvenile idiopathic arthritis and juvenile dermatomyositis. *Rheumatology*. 2011; 50 (11): 2051–60. DOI: 10.1093/rheumatology/ker256.
- Stinson JN, Hayden JA, AholaKohut S, Soobiah C, et al. Sleep problems and associated factors in children with juvenile idiopathic arthritis: a systematic review. *Pediatric Rheumatology*. 2014; 12 (1): 19. DOI: 10.1186/1546-0096-12-19.
- Meltzer LJ, Mindell JA. Sleep and sleep disorders in children and adolescents. *Psychiatr Clin North Am*. 2006; 29 (4): 1059–76. DOI: 10.1016/j.psc.2006.08.004.
- Tarakci E, Arman N, Barut K, et al. Fatigue and sleep in children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Turk J Med Sci*. 2019; 49: 58–65. DOI: 10.3906/sag-1711-167.
- Ward TM, Sonney J, Ringold S, et al. Sleep Disturbances and Behavior Problems in Children with and without Arthritis. *J Pediatr Nurs*. 2014; 29 (4): 321–8. DOI: 10.1016/j.pedn.2014.03.022.
- Bromberg MH, Gil KM, Schanberg LE. Daily sleep quality and mood as predictors of pain in children with juvenile polyarticular arthritis. *Health Psychol*. 2012; 31 (2): 202–9. DOI: 10.1037/a0025075.
- Bloom BJ, Owens JA, McGuinn M, et al. Sleep and its relationship to pain, dysfunction, and disease activity in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002; 29 (1): 169–73. DOI: 10.1007/s10067-013-2409-x.
- Chen X, Sekine M, Hamanishi S, et al. Associations of lifestyle factors with quality of life (QOL) in Japanese children: a 3-year follow-up of the Toyama Birth Cohort Study. *Child Care Health Dev*. 2005; 31: 4339. DOI: 10.1111/j.1365-2214.2005.00529.x.
- Овчаров В. К., Максимов М. В. Справочник Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра (МКБ-10). Российская академия медицинских наук, НИИ социальной гигиены, экономики и управления здравоохранением им. Н. А. Семашко. 2011, 593 с. Russian.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315–24. DOI: 10.1002/art.1780310302.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology. European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 569–81. DOI: 10.1002/art.27584.
- Bruni O, Ottaviano S, Guidetti V, et al. The Sleep Disturbance Scale for Children (SDSC). Construction and validation of an instrument to evaluate sleep disturbances in childhood and adolescence. *J Sleep Res*. 1996; 5: 251–61.
- Varni J, Seid M, Kurtin P. The PedsQL 4.0: Reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Version 4.0 Generic Core Scales in healthy and patient populations. *Medical Care*. 2001; 39: 800–12. DOI: 10.1097/00005650-200108000-00006.
- Ward TM, Ringold S, Metz J, et al. Sleep disturbances and neurobehavioral functioning in children with and without juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res*. 2011; 63 (7): 1006–12. DOI: 10.1002/acr.20469.
- Biggs SN, LushingtonK, Cameron J, et al. Inconsistent sleep schedules and daytime behavioral difficulties in school-aged children. *Sleep Medicine*. 2011; 12 (8): 780–6. DOI: 10.1016/j.sleep.2011.03.017.

16. Ringold S, Ward TM, Wallace CA. Disease activity and fatigue in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* 2013; 65 (3): 391–7. DOI: 10.1002/acr.21801.
17. Long AC, Krishnamurthy V, Palermo TM: Sleep disturbances in school-age children with chronic pain. *J Pediatr Psychol.* 2008; 33 (3): 258–68. DOI: 10.1093/jpepsy/jsm129.
18. Zamir G, Press J, Tal A, Tarasiuk A. Sleep fragmentation in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1998; 25 (6): 1191–7.
19. Amos CE, Curry MR, Drutz IE, Frost JD, Warren RW. Sleep disruption in school-aged children with JRA [abstract]. *Arthritis Rheum.* 1997; 40 Suppl: S244.
20. Valrie CR, Bromberg MH, Palermo T, Schanberg LE. A systematic review of sleep in pediatric pain populations. *J Dev Behav Pediatr.* 2013; 34 (2): 120–8. DOI: 10.1097/DBP.0b013e31827d5848.

КАЧЕСТВО ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ В РЕЗИДУАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА И ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЕГО ФАКТОРЫ

Е. Е. Молчанова¹ ✉, В. В. Полунина², Б. А. Поляев², В. П. Плотников², А. Н. Лобов², С. А. Парастаев²¹ Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Инсульт остается одной из основных причин серьезной инвалидизации, поэтому изучение факторов, влияющих на качество жизни постинсультных больных, и совершенствование реабилитационных технологий, способных улучшить его, сохраняет актуальность. Целью исследования было изучить возможные факторы, определяющие качество жизни больных, перенесших ишемический инсульт, в резидуальном периоде. Анкетирование проводили с помощью опросника MOS SF-36 у 210 пациентов, проходивших курс ранней реабилитации в условиях первичного сосудистого отделения. Исследование показало достоверное ухудшение ряда показателей качества жизни с увеличением возраста пациентов и тяжести инсульта (с коэффициентом корреляции -0.5 ; $p < 0.01$). У женщин оказались более низкими как физический ($p < 0.01$), так и психический ($p < 0.001$) компоненты качества жизни. Более высокие значения большинства субшкал качества жизни ($p < 0.05$) получены в группе пациентов, перенесших вертебробазилярный инсульт, по сравнению с пациентами, у которых была каротидная локализация очага. Оптимизация ранней реабилитации включением методов рефлексотерапии в остром периоде инсульта и продолжение реабилитационного процесса в условиях «Больницы восстановительного лечения» способствовали повышению ($p < 0.05$) качества жизни пациентов в периоде отдаленных последствий.

Ключевые слова: качество жизни, ишемический инсульт, реабилитация, рефлексотерапия, акупунктура

Вклад авторов: Е. Е. Молчанова — дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; В. В. Полунина, Б. А. Поляев, В. П. Плотников, А. Н. Лобов, С. А. Парастаев — концепция и редактирование текста; все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии (протокол № 10 от 20 ноября 2019 г.), выполнено с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека; всеми участниками подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Евгеньевна Молчанова
ул. Горького, д. 95, г. Благовещенск, 675000; helendok@mail.ru

Статья получена: 20.10.2020 **Статья принята к печати:** 19.11.2020 **Опубликована онлайн:** 05.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.073

QUALITY OF LIFE IN STROKE PATIENTS IN RESIDUAL STROKE PERIOD AND ITS DETERMINANTS

Molchanova EE¹ ✉, Polunina VV², Polyayev BA², Plotnikov VP², Lobov AN², Parastaev SA²¹ Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Stroke remains one of the leading causes of disability; therefore, it is important to investigate factors that might affect the quality of life of stroke patients and refine rehabilitation technologies for better functional gains. The aim of this paper was to study possible factors that determine the quality of life in the residual ischemic stroke period. The MOS SF-36 health survey was completed by 210 patients undergoing early rehabilitation at a stroke care unit. The study revealed a significant decline in some quality of life indicators correlated with advancing age and severity of the condition (correlation coefficient -0.5 ; $p < 0.01$). Both physical and mental component summary scores were lower in women than in men ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). High scores on the majority of the applied subscales were observed in the patients with a vertebrobasilar stroke, as compared with those who had suffered a carotid stroke ($p < 0.05$). The early rehabilitation regimen complemented with acupuncture in the acute stroke period and the subsequent rehabilitation program at the Rehabilitation Hospital significantly contributed ($p < 0.05$) to improving the quality of life of stroke patients in the residual stroke period.

Keywords: quality of life, ischemic stroke, rehabilitation, acupuncture

Author contribution: Molchanova EE — study design; data acquisition and analysis; manuscript preparation; Polunina VV, Polyayev BA, Plotnikov VP, Lobov AN, Parastaev SA — study concept and manuscript preparation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Amur State Medical Academy (Protocol № 10 dated November 20, 2019); the study conformed with the guidelines for the medical research involving human subjects. Voluntary informed consent was obtained from all the participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena E. Molchanova
Gorkogo, 95, Blagoveshchensk, 675000; helendok@mail.ru

Received: 20.10.2020 **Accepted:** 19.11.2020 **Published online:** 05.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.073

Стойкая утрата трудоспособности после перенесенного церебрального инсульта становится все более распространенным явлением [1]. Демографическое старение населения, и, как следствие, рост частоты острых сердечно-сосудистых катастроф [2], на фоне успехов в лечении инсульта и сохранении жизни пациентам с выраженными неврологическими нарушениями, выводят эту проблему в число наиболее важных в научном, практическом, организационном и экономическом

отношениях [3]. Расширение спектра фармакологических средств и реабилитационных технологий постинсультных больных привело к росту их выживаемости и, соответственно, увеличению численности проживающих с последствиями инсульта, число которых только в России превышает 2 млн человек [4]. Подавляющее большинство пациентов, перенесших инсульт, вынуждены приспосабливаться к приобретенному дефекту как в семейной, так и профессиональной и социальной

областях жизни и деятельности [5]. Следовательно, только показатели выживаемости не могут характеризовать эффективность реабилитации и качество жизни (КЖ) больного [4]. Актуальность проблемы стимулирует проведение исследований по оценке КЖ постинсультных больных и факторов, оказывающих на него влияние, поскольку показатели КЖ являются одним из самых важных критериев, позволяющих проводить анализ эффективности новых диагностических, лечебных и профилактических технологий в практической медицине [6–8].

Из факторов, которые, возможно, способны оказывать влияние на КЖ, изучались такие, как пол [9, 10], возраст [11], тяжесть инсульта [12], семейное положение, профессиональный статус, характер и продолжительность реабилитационных мероприятий [13]. В ранее проведенных исследованиях обсуждалось также влияние локализации очага ишемии на КЖ, хотя их малочисленность однозначного вывода сделать не позволяет. В частности, некоторые авторы отмечали большую выраженность психоэмоциональных нарушений при локализации очага (как ишемического, так и геморрагического характера) в правом полушарии головного мозга, что делало правополушарную локализацию инсульта независимым неблагоприятным прогностическим фактором [14–16]. В то же время в другом исследовании уровень тревожно-депрессивных расстройств оказался выше на 20–30% у пациентов с левополушарным ишемическим инсультом (ИИ) [12]. Левосторонняя локализация очага сопровождалась лучшим ($p < 0,05$) уровнем физического компонента здоровья и субшкалы общего состояния здоровья (GH) КЖ у пациентов в остром и раннем восстановительном периодах [10]. У пациентов с локализацией поражения в вертебробазиллярном бассейне (ВББ) отмечен более высокий (на 20–50%; $p < 0,05$) уровень физических функций, чем у пациентов с полушарным ИИ, причем без влияния на показатели КЖ в остром периоде стороны поражения [12]. Отмечено также более выраженное снижение физического благополучия в сравнении с уровнем психического вне зависимости от локализации очага [17].

Исследования показали явное преимущество, способствующее значительному улучшению КЖ (более чем в два раза), комплексных программ реабилитации с включением немедикаментозных методов в раннем восстановительном периоде инсульта, о чем свидетельствует высокий процент (72,7%) возвращения пациентов к труду в течение полугода [18, 19]. Обсуждалось также преимущество продолжения лечения в санатории по сравнению с реабилитацией в условиях поликлиники [20, 21].

Таким образом, работы по изучению факторов, определяющих КЖ постинсультных больных, отличаются противоречивостью. Имеется также недостаточно информации о влиянии перенесенного инсульта на КЖ в отдаленном периоде, тогда как выявление факторов, позволяющих прогнозировать степень восстановления утраченных функций, дает возможность скорректировать программу не только реабилитационных, но и профилактических мероприятий, что затруднительно при недостаточности сведений о больном и его заболевании [14, 16]. Следовательно, изучение факторов, влияющих на КЖ больных, наряду с совершенствованием реабилитационных программ, призванных улучшить его показатели, сохраняет свою актуальность.

Целью работы было изучение возможных факторов, определяющих уровень основных показателей КЖ в период отдаленных последствий (через три года) у перенесших ИИ пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании, длившемся с 2013 по 2017 г., приняли участие 210 пациентов (110 женщин и 100 мужчин) в возрасте 40–78 лет (средний возраст составил $64,4 \pm 1,05$ года), проходившие нейрореабилитацию в отделении для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения Благоевской городской клинической больницы. Диагноз ИИ у всех пациентов был подтвержден с помощью КТ (и/или МРТ). У большинства (140 человек; 66,7%) ИИ диагностирован в бассейне средней мозговой артерии (справа — у 79 (37,6%) больных и слева — у 63 (30 %)), у 68 (32,4%) больных — в ВББ. Согласно патогенетической классификации ишемического инсульта (TOAST, 1993), у 120 больных (57,1%) преобладал атеротромботический тип развития инсульта, у 53 пациентов (25,2%) — кардиоэмболический, у 12 (5,7%) — лакунарный и у 25 (11,9%) — неустановленной этиологии.

Всем пациентам в остром периоде ИИ проводили стандартную лекарственную терапию и немедикаментозную комплексную реабилитацию, которая у 140 пациентов была дополнена включением различных методов рефлексотерапии (РТ); 70 человек получали физиотерапевтическое лечение и лечебную гимнастику без включения РТ в реабилитационные схемы. Распределение участников исследования по группам «РТ» и «отсутствие РТ» осуществляли методом рандомизации. После выписки из стационара 63 пациента продолжили реабилитацию в «Больнице восстановительного лечения» (БВЛ), остальные — в условиях поликлиники.

Критериями включения в исследование были: подписанное информированное согласие пациентов; наличие подтвержденного при КТ- и/или МРТ-исследовании диагноза ИИ; возраст 35–80 лет; отсутствие противопоказаний для проведения процедур физио-, рефлексотерапии и лечебной физкультуры. Критерии исключения: наличие грубых когнитивных и психических нарушений, выраженных афазических и моторных расстройств, которые могли бы затруднить проведение тестирования.

С целью оценки КЖ пациентам было предложено самостоятельно дважды заполнить опросник MOS SF-36 [22] (в остром периоде инсульта перед выпиской из стационара и через три года), состоящий из 8 субшкал. Результаты ответов оценивались от 0 до 100 баллов, более высокая оценка КЖ соответствовала большему числу баллов. При этом первые четыре шкалы позволяют оценить «физический компонент здоровья», вторые четыре — «психологический компонент здоровья». Показатели КЖ сравнивали в сопоставимых группах в зависимости от гендерных показателей, возраста пациентов, локализации поражения, а также от особенностей применяемых реабилитационных технологий в остром периоде. Для изучения влияния особенностей реабилитационного процесса на КЖ в резидуальном периоде проанализированы его показатели в сопоставимых (по полу, возрасту, тяжести, локализации и патогенетическому варианту инсульта) группах больных, которые получали лечение с включением методов РТ и без них, а также продолживших курс реабилитации в условиях

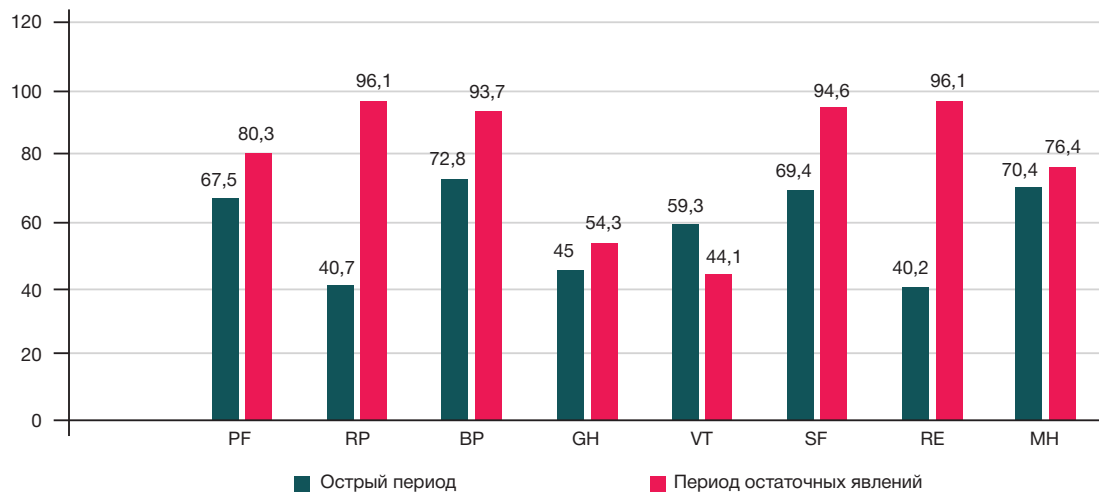


Рис. 1. Динамика показателей качества жизни пациентов в остром периоде ишемического инсульта (в конце курса ранней реабилитации) и через три года

БВЛ, в сравнении с группой пациентов, наблюдавшихся в амбулаторных условиях. Для статистического анализа последние две группы больных подбирали по методу «случай–контроль» и были полностью идентичны по полу, возрасту, тяжести состояния при поступлении в стационар, локализации и патогенетическому варианту инсульта, а также реабилитационным мероприятиям в остром периоде.

Параллельно проводили изучение психоэмоционального состояния пациентов путем тестирования по шкалам депрессии Бека и тревоги Спилбергера–Ханина.

При статистической обработке при подчинении данных нормальному распределению признака они были представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($M \pm m$) или «среднее \pm стандартное отклонение» ($M \pm SD$). Для определения достоверности различий между показателями использовали параметрический t -критерий Стьюдента. Для определения наличия, силы и направления взаимосвязи между переменными вычисляли коэффициент корреляции r Пирсона. Критический уровень значимости в исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В остром периоде ИИ накануне выписки из стационара у пациентов было выявлено снижение как физического (в среднем до $56,5 \pm 2,8$ балла), так и психологического

(в среднем до $59,8 \pm 2,7$ балла) компонентов здоровья по опроснику MOS SF 36. Аналогичные показатели в резидуальном периоде (через три года) оказались достоверно ($p < 0,001$) выше (в среднем $81,1 \pm 2,1$ балла и $77,8 \pm 1,9$ балла соответственно). Исключением в периоде отдаленных последствий оказались более низкие данные субшкалы жизнеспособности (VT) ($p < 0,001$) (рис. 1).

Результаты корреляционного анализа между возрастом пациентов и показателями КЖ демонстрировали наличие в остром периоде инсульта отрицательной корреляционной связи с субшкалами RP (ролевое функционирование) ($-0,44$; $p < 0,05$) и VT (жизнеспособность) ($-0,5$; $p < 0,01$). В периоде отдаленных последствий наблюдалось возрастание уровня значимости корреляционной зависимости, и повышение возраста пациентов статистически значимо коррелировало с субшкалами PF (физическое функционирование) ($-0,5$; $p < 0,01$), GH (общее состояние здоровья) ($-0,5$; $p < 0,01$) и VT (жизнеспособность) ($-0,6$; $p < 0,001$). Наиболее прогностически благоприятным в отношении КЖ оказался возрастной период 44–60 лет, а самые низкие показатели получены в возрастной группе старше 75 лет (рис. 2). Влияния возраста на развитие тревожно-депрессивного синдрома в нашем исследовании выявлено не было.

У женщин были отмечены более низкие показатели по большинству субшкал опросника MOS SF 36, достигающие статистически значимых различий по субшкалам RP (ролевое физическое функционирование; $p < 0,05$) и RE

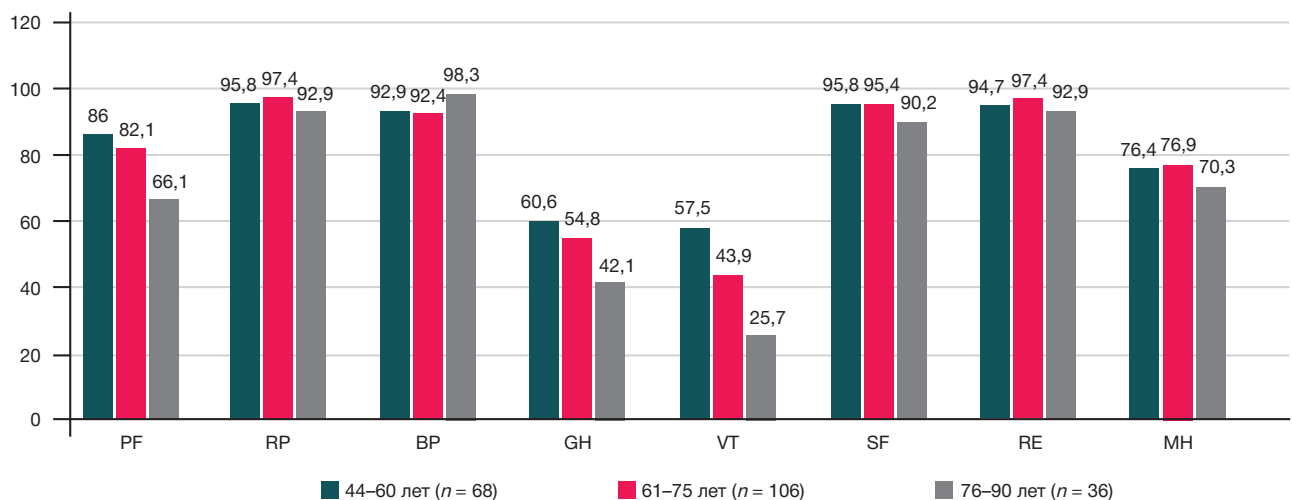


Рис. 2. Показатели качества жизни больных, перенесших ишемический инсульт, в периоде отдаленных последствий в зависимости от возраста

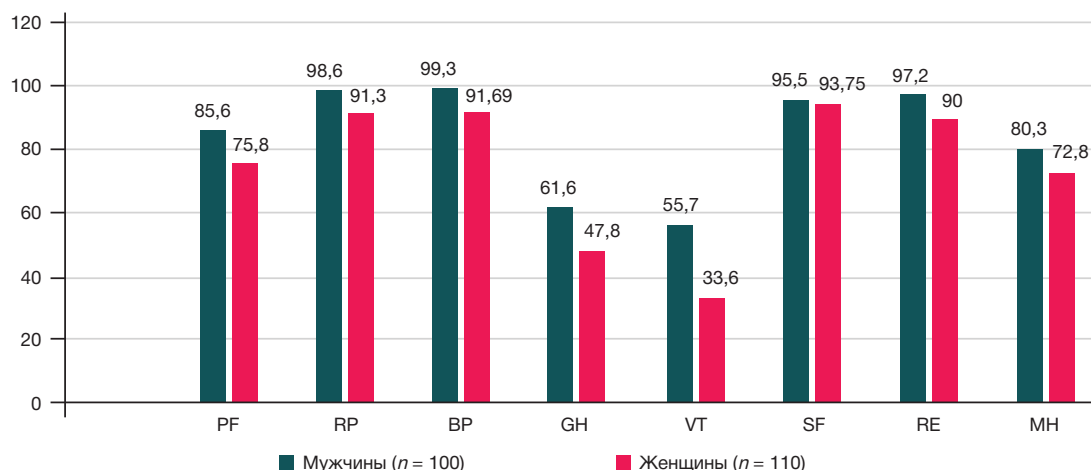


Рис. 3. Гендерные особенности показателей качества жизни больных, перенесших ишемический инсульт, в периоде отдаленных последствий

(ролевое эмоциональное функционирование; $p < 0,001$) в остром периоде ИИ и по субшкалам PF (физическое функционирование; $p < 0,01$), RP (ролевое физическое функционирование; $p < 0,05$), BP (интенсивность боли; $p < 0,05$), GH (общее состояние здоровья; $p < 0,001$), VT (жизнеспособность; $p < 0,001$) и MH (психическое здоровье; $p < 0,01$) в отдаленном периоде (рис. 3). Анализ психоэмоционального состояния выявил у женщин и более высокий уровень депрессии ($13,4 \pm 1,1$ балла), по сравнению с аналогичными показателями у мужчин ($9,6 \pm 1,1$ балла; $p < 0,05$).

В нашем исследовании получена отрицательная корреляционная связь показателей КЖ в периоде отдаленных последствий с тяжестью инсульта по шкале NIHSS, оцененной при поступлении в стационар, по субшкалам PF (физическое функционирование) ($-0,6$; $p < 0,001$), GH (общее состояние здоровья) ($-0,4$; $p < 0,05$), VT (жизнеспособность) ($-0,5$; $p < 0,01$), SF (социальное функционирование) ($-0,5$; $p < 0,01$) и MH (психическое здоровье) ($-0,5$; $p < 0,01$).

В остром периоде ИИ у пациентов, перенесших инсульт в бассейне правой СМА, выявлены самые низкие показатели только по субшкале PF (физического функционирования) ($p < 0,05$), тогда как в отдаленном периоде получены достоверные различия по субшкалам PF (физическое функционирование; $p < 0,05$), RP (ролевое физическое функционирование; $p < 0,05$) и RE (ролевое эмоциональное функционирование; $p < 0,05$) при сравнении с группой пациентов, перенесших инсульт в бассейне

вертебробазилярных артерий (ВБА), у которых оказались самые высокие показатели по большинству субшкал. Показатели субшкал GH (общее состояние здоровья) и VT (жизнеспособность) оказались самыми низкими у пациентов, перенесших инсульт в бассейне левой СМА, статистически достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от аналогичных значений пациентов с инсультом в ВББ (рис. 4). Полушарная локализация очага инфаркта при каротидном инсульте сопровождалась более высоким уровнем депрессии ($14,2 \pm 1,5$ и $13,7 \pm 1,3$ балла при локализации инсульта в левом и правом полушариях соответственно) при сравнении этих показателей с группой больных с локализацией очага в бассейне ВБА ($8,3 \pm 1,1$ балла; $p < 0,01$). Каротидный и вертебробазилярный инсульты различались также и по тяжести неврологической симптоматики как при поступлении в стационар ($6,1 \pm 0,3$ и $4,7 \pm 0,3$ балла соответственно; $p < 0,01$), так и на момент выписки ($2,3 \pm 0,2$ и $1,5 \pm 0,2$ балла соответственно; $p < 0,01$).

Включение методов РТ в программу ранней нейрореабилитации постинсультных больных приводило к более высоким показателям по большинству субшкал КЖ как в остром (по субшкалам RP (ролевое физическое функционирование; $p < 0,05$), GH (общее состояние здоровья; $p < 0,05$), VT (жизнеспособность; $p < 0,05$), SF (социальное функционирование; $p < 0,05$), RE (ролевое эмоциональное функционирование; $p < 0,05$), MH (психическое здоровье; $p < 0,05$), так и в резидуальном (по субшкалам PF (физическое функционирование; $p < 0,05$), GH (общее состояние здоровья; $p < 0,05$), VT

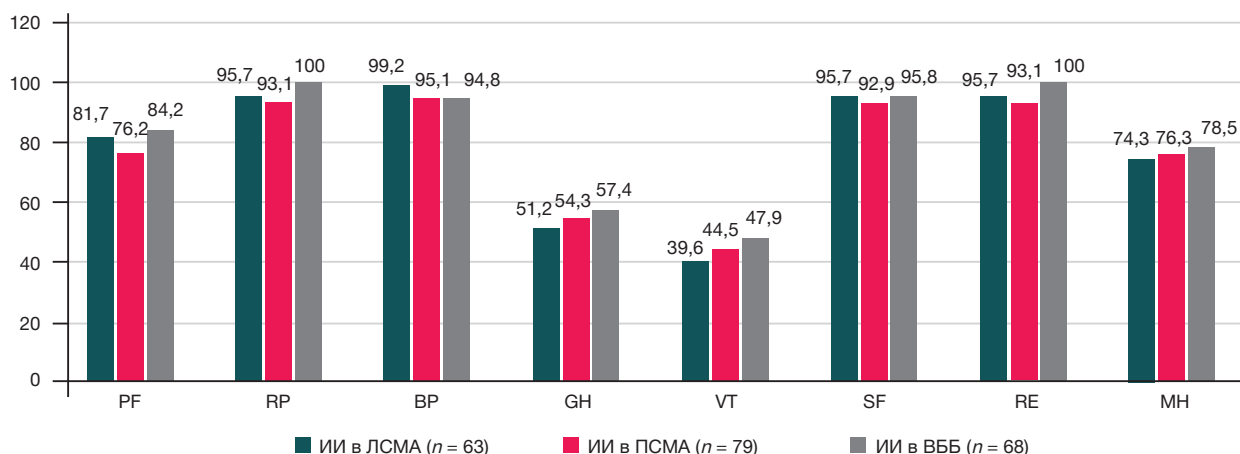


Рис. 4. Особенности показателей качества жизни больных, перенесших ишемический инсульт, в периоде отдаленных последствий в зависимости от локализации очага поражения

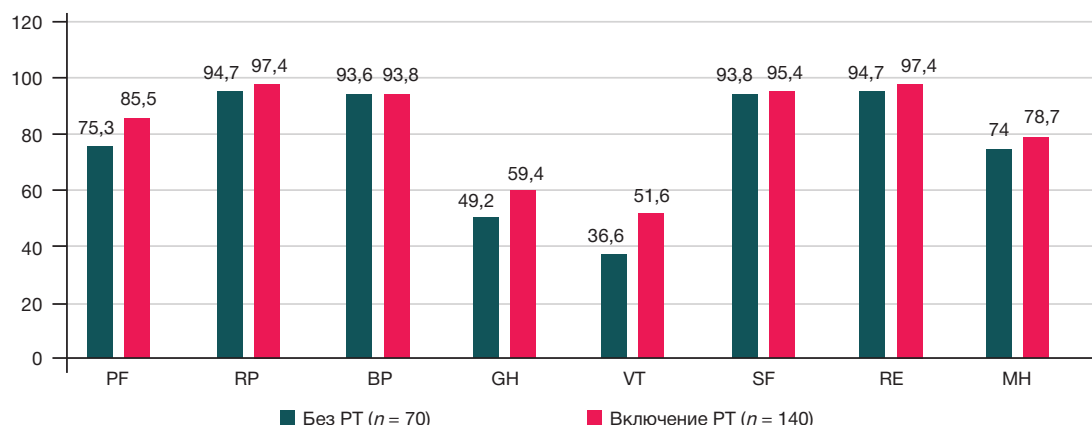


Рис. 5. Показатели качества жизни пациентов через три года после перенесенного ишемического инсульта в зависимости от методов реабилитации в остром периоде

(жизнеспособность; $p < 0,01$) и МН (психическое здоровье; $p < 0,05$) периодах (рис. 5). Применение РТ способствовало также снижению выраженности реактивной тревожности в среднем на 8,5 балла (22%; $p < 0,001$) и уровня депрессии в среднем на 4,9 балла (30%; $p < 0,001$) к моменту выписки из стационара, тогда как достоверных различий показателей в группе больных, не получавших процедуры РТ, выявлено не было.

КЖ через три года оказалось выше у пациентов, продолживших реабилитацию в БВЛ, при этом статистически достоверные данные получены по субшкалам PF (физическое функционирование; $p < 0,05$), BP (интенсивность боли; $p < 0,05$), GH (общее состояние здоровья; $p < 0,05$), VT (жизнеспособность; $p < 0,05$) и МН (психическое здоровье; $p < 0,001$) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование выявило снижение ряда показателей КЖ с увеличением возраста пациентов, при этом самые низкие значения получены в возрастной группе старше 75 лет, что отмечали и другие авторы [23]. Лучшие показатели по субшкалам MOS SF 36 получены у пациентов среднего возраста (44–60 лет). В то же время в аналогичном исследовании в этой возрастной группе (45–64 года) обнаружено наибольшее снижение КЖ, возможно ввиду внезапности и значимого влияния инсульта на весь образ жизни, а также отсутствия готовности преодолевать

возникающую вследствие этого стрессовую ситуацию [11], а в другой работе связи с возрастом пациентов отмечено не было [10].

Выявленное выраженное снижение всех показателей КЖ через три года после перенесенного инсульта у женщин отмечено и другими авторами, в частности имеются указания на более высокие показатели физического компонента КЖ у мужчин на 10-е и 180-е сутки заболевания [10]. Некоторые гендерные различия как в остром периоде, так и на стадии санаторной реабилитации отмечены и другими авторами [9]. Возможно, полученные результаты можно объяснить более высоким депрессивным фоном, выявленным в исследовании у женщин по сравнению с мужчинами.

Низкие показатели общего состояния здоровья (GH) и жизнеспособности (VT) у пациентов с левополушарным каротидным инсультом возможно связаны с имеющимся у них правосторонним двигательным дефицитом. Так, у больных с ИИ в ВББ в сравнении с полушарной локализацией был выявлен более высокий уровень мотивации к восстановлению (на 20%) по результатам психологического тестирования [15], что часто имеет решающее значение для эффективного проведения реабилитационных мероприятий и было подтверждено и в нашем исследовании, показавшем самые высокие значения по большинству субшкал в группе пациентов, перенесших инсульт в ВББ. Низкие показатели по субшкалам PF (физическое функционирование), RP (ролевое физическое функционирование) и RE (ролевое

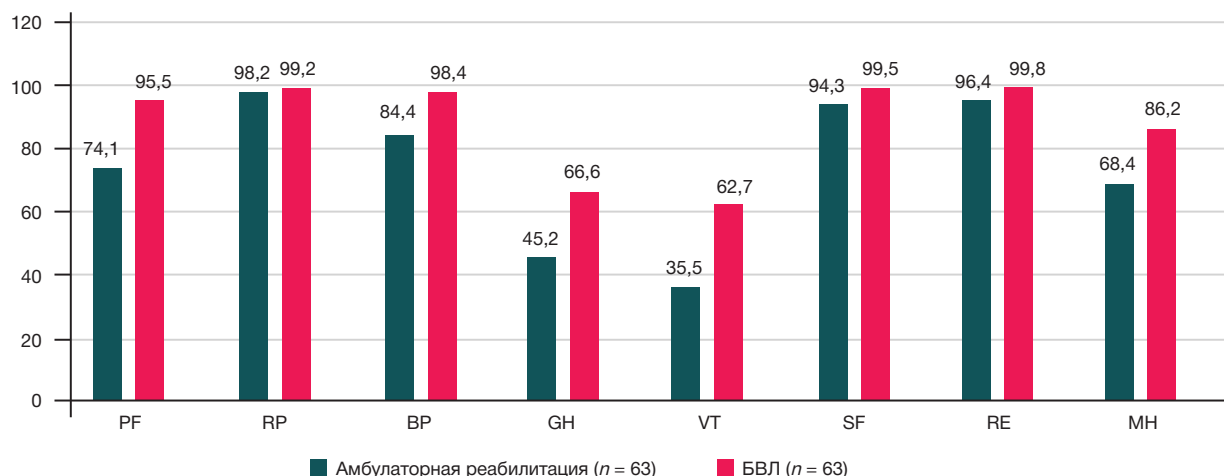


Рис. 6. Показатели качества жизни пациентов через три года после перенесенного ишемического инсульта в зависимости от методов реабилитации после выписки из стационара

эмоциональное функционирование) у пациентов с инсультом в бассейне правой СМА указывают на более выраженное влияние правополушарного очага на психоэмоциональное состояние, что подчеркнуто в ряде других наблюдений [14–16], а также подтверждено в нашей работе. Лучшие показатели КЖ у пациентов с вертебробазилярным инсультом возможно связаны также с меньшей тяжестью неврологической симптоматики, выявленной в нашем исследовании как в острейшем, так и в конце острого периода ИИ накануне выписки из стационара.

Проведенное исследование подтвердило эффективность комплексных немедикаментозных программ реабилитации [18, 19], показав высокие значения по большинству субшкал КЖ как в остром, так и отдаленном периодах при включении методов РТ в схемы ранней реабилитации на фоне улучшения психоэмоционального состояния постинсультных больных. Установлена высокая эффективность продолжения реабилитации больных в условиях БВЛ, что соответствует данным литературы, указавшим на преимущество санаторного долечивания по сравнению с реабилитацией в амбулаторных условиях [20, 21, 24].

ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты исследования позволили отнести к относительно неблагоприятным прогностическим факторам в отношении КЖ в отдаленном периоде возраст пациентов, превышающий 60 лет, женский пол и локализацию очага инсульта в бассейне СМА. Относительно более благоприятный прогноз возможно предполагать у более молодых пациентов (в возрасте до 60 лет), у больных мужского пола, при локализации инсульта в бассейне ВБА, а также при оптимизации ранней реабилитации включением в острый период ИИ методов РТ и продолжении реабилитации в условиях БВЛ.

Изучение факторов, способных оказать влияние на показатели КЖ постинсультных больных, может помочь прогнозировать результативность проводимых реабилитационных мероприятий, способствуя повышению их эффективности, а имеющиеся расхождения данных, полученных в исследовании, с ранее опубликованными подтверждают необходимость дальнейшего изучения этой проблемы.

Литература

- Portegies ML, Koudstaal PJ, Ikram MA. Cerebrovascular disease. *Handb Clin Neurol*. 2016; 138: 239–61.
- Скворцова В. И., Иванова Г. Е., Стаховская Л. В. Возможности расширения реабилитационного потенциала больных с церебральным инсультом. *Русский медицинский журнал*. 2011; 19 (9): 579–83.
- Пантелеенко Л. В. Качество жизни на протяжении года после ишемического инсульта. *Украинский неврологический журнал*. 2010; 3 (16): 73–79.
- Лукьянчикова Л. В. Современный взгляд на проблему качества жизни больных, перенесших ишемический инсульт. *Вестник ЮУрГУ. Серия «Психология»*. 2016; 9 (4): 64–72.
- Roche N. Auto-rehabilitation at home for stroke patients. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016; Sep; 59S: e38.
- Бельская Г. Н., Степанова С. Б. Восстановление нарушенных функций у больных ишемическим инсультом, прошедших санаторное долечивание. *Неврологический журнал*. 2009; (3): 33–36.
- Суслина З. А., Варакин Ю. Я., Верещагин Н. В. Клинико-эпидемиологические исследования — перспективное направление изучения церебральной патологии (сообщение первое). *Анналы неврологии*. 2009; (3): 4–11.
- Агапов А. Б. Оценка качества жизни с помощью опросников у пациентов с заболеванием вен нижних конечностей. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2015; (3): 126–133.
- Тюков Ю. А., Кочеткова Н. Г., Рыжий А. П., Салаватов Р. Р., Пластовец А. И. Оценка качества жизни у больных после перенесенного инсульта. *Медицинская наука и образование Урала*. 2011; 12 (1): 186–8.
- Медведкова С. А. Динамика показателей качества жизни больных в раннем восстановительном периоде мозгового ишемического полушарного инсульта. *Международный неврологический журнал*. 2013; 4 (58): 15–22.
- Almborg AH, Ulander K, Thulin A, Berg S. Discharged after stroke-important factors for health-related quality of life. *J Clin Nurs*. 2010; 19 (15–16): 2196–206.
- Лукьянчикова Л. В. Влияние качества жизни на реабилитационный потенциал больных, перенесших ишемический инсульт [диссертация]. Челябинск, 2018.
- Langhammer B, Sunnerhagen KS, Stanghelle JK, Sällström S, Becker F, Fugl-Meyer K. Life satisfaction in persons with severe stroke — A longitudinal report from the Sunnaas International Network (SIN) stroke study. *European Stroke Journal*. 2017; 2 (2): 154–62.
- Разумов А. Н., Мельникова Е. А. Комплексный подход к оценке реабилитационного прогноза у больных, перенесших инсульт. *Курортная медицина*. 2015; (4): 14–19.
- Мельникова Е. А. Клиническая характеристика реабилитационного потенциала у больных с инсультом. *Курортная медицина*. 2015; (4): 49–56.
- Разумов А. Н., Мельникова Е. А., Рассулова М. А., Рудь И. М. Нейрофункциональные основы восстановления психомоторных функций у больных, перенесших инсульт. В сборнике: *Материалы Международной научно-практической конференции «Вопросы восстановительной и спортивной медицины» 15 ноября 2017 г.; Москва. Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины департамента здравоохранения г. Москвы*, 2017: 6–10.
- Кислицын Ю. В., Конопаткина И. Ю. Сравнительная характеристика качества жизни больных, перенесших атеротромботический инсульт в каротидном и вертебробазилярном бассейнах. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 33 (2): 30–33.
- Солонец И. Л., Ефремов В. В. Качество жизни как предиктор эффективности реабилитационных мероприятий постинсультных больных. *Фундаментальные исследования*. 2013; 12 (1): 76–80.
- Солонец И. Л. Оценка качества жизни больных с нарушением функции движения в раннем восстановительном периоде церебрального инсульта в процессе комплексной реабилитации [диссертация]. Ростов-на-Дону, 2016.
- Бельская Г. Н., Лукьянчикова Л. В. Качество жизни, тревожно-депрессивное расстройство и когнитивные функции на фоне восстановительного лечения ишемического инсульта. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2017; 13 (1): 51–57.
- Исмаилов Е. Е., Есен Л. М., Жанысбаев Ж. З., Исаева У. А. Динамика качества жизни больных в остром и подостром периодах ишемического инсульта. *Вестник Казанского МУ*. 2016; (2): 241–3.
- Ware JE. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). *Medical Care*. 1992; 30 (6): 473–83.
- Kelly-Hayes M. Influence of age and health behaviors on stroke risk: lessons from longitudinal studies. *J Am Geriatr Soc*. 2010;

58 (2): 325–8.

24. Абдуллина Д. У. Медико-социальная эффективность

реабилитации больных после инсульта в условиях санатория [диссертация]. Москва, 2009.

References

- Portegies ML, Koudstaal PJ, Ikram MA. Cerebrovascular disease. *Handb Clin Neurol.* 2016; 138: 239–61.
- Skvortsova VI, Ivanova GE, Stahovskaja LV. Vozmozhnosti rasshirenija reabilitacionnogo potentsiala bol'nyh s cerebral'nym insul'tom. *Russkij medicinskij zhurnal.* 2011; 19 (9): 579–83. Russian.
- Panteleenko LV. Kachestvo zhizni na protjazhenii goda posle ishemicheskogo in-sul'ta. *Ukrainskij nevrologicheskij zhurnal.* 2010; 3 (16): 73–79. Russian.
- Lukjanchikova LV. Sovremennyy vzgljad na problemu kachestva zhizni bol'nyh, perenesshih ishemicheskij insul't. *Vestnik JuUrGU. Serija «Psihologija».* 2016; 9 (4): 64–72. Russian.
- Roche N. Auto-rehabilitation at home for stroke patients. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016; Sep; 59S: e38.
- Belskaja GN, Stepanova SB. Vosstanovlenie narushennyh funkcij u bol'nyh icheskim insul'tom, proshedshih sanatornoe dolechivanie. *Nevrologicheskij zhurnal.* 2009; (3): 33–36. Russian.
- Suslina ZA, Varakin YuYa., Vereshagin NV. Kliniko-jepidemiologicheskie issledovaniya — perspektivnoe napravlenie izucheniya cerebral'noj patologii (soobshhenie pervoe). *Annaly nevrologii.* 2009; (3): 4–11. Russian.
- Agapov AB. Ocenka kachestva zhizni s pomoshh'ju oprosnikov u pacientov s zabolevanijem ven nizhnih konechnostej. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2015; (3): 126–33. Russian.
- Tjukov YuA, Kochetkova NG, Ryzhij AP, Salavatov RR, Plastovec AI. Ocenka kachestva zhizni u bol'nyh posle perenesennogo insul'ta. *Medicinskaja nauka i obrazovanie Urala.* 2011; 12 (1): 186–8. Russian.
- Medvedkova SA. Dinamika pokazatelej kachestva zhizni bol'nyh v rannem vosstanovitel'nom periode mozgovogo ishemicheskogo polusharnogo insul'ta. *Mezhdunarodnyj nevrologicheskij zhurnal.* 2013; 4 (58): 15–22. Russian.
- Almborg AH, Ulander K, Thulin A, Berg S. Discharged after stroke-important factors for health-related quality of life. *J Clin Nurs.* 2010; 19 (15–16): 2196–206.
- Lukjanchikova LV. Vlijanie kachestva zhizni na reabilitacionnyj potentsial bol'nyh, perenesshih ishemicheskij insul't [dissertation]. Cheljabinsk, 2018. Russian.
- Langhammer B, Sunnerhagen KS, Stanghelle JK, Sällström S, Becker F, Fugl-Meyer K. Life satisfaction in persons with severe stroke — A longitudinal report from the Sunnaas International Network (SIN) stroke study. *European Stroke Journal.* 2017; 2 (2): 154–62.
- Razumov AN, Melnikova EA. Kompleksnyj podhod k ocenke reabilitacionnogo prognoza u bol'nyh, perenesshih insul't. *Kurortnaja medicina.* 2015; (4): 14–19. Russian.
- Melnikova EA. Klinicheskaja harakteristika reabilitacionnogo potentsiala u bol'nyh s insul'tom. *Kurortnaja medicina.* 2015; (4): 49–56. Russian.
- Razumov AN, Melnikova EA, Rassulova MA, Rud IM. Nejrofunkcional'nye os-novy vosstanovlenija psihomotornyh funkcij u bol'nyh, perenesshih insul't. V sbornike: *Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Voprosy vosstanovitel'noj i sportivnoj mediciny» 15 nojabrja 2017; Moskva. Moskovskij nauchno-prakticheskij centr medicinskoj reabilitacii, vosstanovitel'noj i sportivnoj mediciny departamenta zdravoohraneniya g. Moskvy,* 2017: 6–10. Russian.
- Kislitsyn YuV, Konopatkina IYu. Sravnitel'naja harakteristika kachestva zhizni bol'nyh, perenesshih aterotromboticheskij insul't v karotidnom i vertebrobasiljarnom bassejnah. *Permskij medicinskij zhurnal.* 2016; 33 (2): 30–33. Russian.
- Solonec IL, Efremov VV. Kachestvo zhizni kak prediktor jeffektivnosti reabilitacionnyh meroprijatij postinsul'tnyh bol'nyh. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2013; 12 (1): 76–80. Russian.
- Solonec IL. Ocenka kachestva zhizni bol'nyh s narusheniem funkcii dvizhenija v rannem vosstanovitel'nom periode cerebral'nogo insul'ta v processe kompleksnoj reabilitacii [dissertation]. Rostov-na-Donu, 2016. Russian.
- Belskaja GN, Lukjanchikova LV. Kachestvo zhizni, trevozhno-depressivnoe rasstrojstvo i kognitivnye funkcii na fone vosstanovitel'nogo lechenija ishemicheskogo insul'ta. *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal.* 2017; 13 (1): 51–57. Russian.
- Ismajlov EE, Esen LM, Zhanybaev ZhZ, Isaeva UA. Dinamika kachestva zhizni bol'nyh v ostrom i podostrom periodah ishemicheskogo insul'ta. *Vestnik KazN-MU.* 2016; (2): 241–3. Russian.
- Ware JE. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). *Medical Care.* 1992; 30 (6): 473–83.
- Kelly-Hayes M. Influence of age and health behaviors on stroke risk: lessons from longitudinal studies. *J Am Geriatr Soc.* 2010; 58 (2): 325–8.
- Abdullina DU. Mediko-social'naja jeffektivnost' reabilitacii bol'nyh posle insul'ta v uslovijah sanatorija [dissertation]. Moskva, 2009. Russian.

УДОВЛЕТВОРЕННОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 КАЧЕСТВОМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, ОКАЗАННОЙ В ФОРМЕ ДИСТАНЦИОННЫХ ТЕЛЕМЕДИЦИНСКИХ КОНСУЛЬТАЦИЙ

Н. В. Полунина¹, А. А. Тяжельников^{1,2}, А. В. Погонин^{1,3}, Е. В. Костенко^{1,4} ✉

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

² Консультативно-диагностическая поликлиника № 121, Москва, Россия

³ ГКБ имени С. И. Спасокукоцкого, Москва, Россия

⁴ Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины, Москва, Россия

В статье представлены результаты исследования мнения пациентов об оказании дистанционной консультативной медицинской помощи в телемедицинском центре ДЗМ в условиях пандемии. Обследование 216 пациентов с COVID-19, находившихся на амбулаторном лечении, дало возможность оценить их здоровье и определить факторы, влияющие на удовлетворенность предоставляемыми услугами. Здоровье пациентов оценивали на основании изучения течения основного заболевания и наличия сопутствующих заболеваний, которые были выявлены у 24,3% заболевших COVID-19. Были сформированы три группы — с благоприятной (37,5%), удовлетворительной (36,7%) и неблагоприятной (25,8%) характеристиками здоровья. Большинство пациентов (76,4%) остались удовлетворены телемедицинскими консультациями, при этом достоверно чаще — мужчины (79,8%), лица, имеющие благоприятное здоровье (83,1%), и пациенты моложе 50 лет (81,9%). В качестве аргументов использования телемедицинских консультаций пациенты указывали получение консультаций специалистов, оперативность назначения лечения, получение медицинских рекомендаций, в том числе по здоровому образу жизни, а также быстроту оформления вызова врача на дом и скорой медицинской помощи. Основными причинами неудовлетворенности были отсутствие у пациентов соответствующего оборудования, трудности с настройкой оборудования, сложность инструкции по подключению к телемедицинским консультациям, неудовлетворительное качество аудио- и видеосвязи, что свидетельствует о недостаточной технической оснащенности пациентов. Телемедицинские консультации могут быть рассмотрены в качестве эффективного метода при амбулаторном лечении пациентов с COVID-19, тем более, что 64,7% пациентов планируют в будущем их использование, а 72,3% готовы рекомендовать их другим.

Ключевые слова: телемедицинские консультации, заболеваемость, COVID-19, пандемия, удовлетворенность

Вклад авторов: Полунина Н. В., Тяжельников А. А., Погонин А. В. — концепция и дизайн исследования; Тяжельников А. А., Костенко Е. В. — сбор и обработка материала; Полунина Н. В. — статистическая обработка; Тяжельников А. А., Костенко Е. В. — написание статьи; Полунина Н. В. — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ГБУЗ «Городская поликлиника № 2 Департамента здравоохранения г. Москвы» (протокол № 9 от 30 сентября 2020 г.). Анкетирование проводили при условии согласия пациента с соблюдением анонимности, информируя пациента о том, что его личные данные нигде не будут использованы.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Владимировна Костенко
ул. Земляной Вал, д. 53, г. Москва, 105120; ekostenko58@mail.ru

Статья получена: 27.11.2020 **Статья принята к печати:** 14.12.2020 **Опубликована онлайн:** 27.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.084

COVID-19 PATIENTS' SATISFACTION WITH QUALITY OF MEDICAL CARE PROVIDED IN THE FORM OF TELEMEDICINE CONSULTATIONS

Polunina NV¹, Tyazhelnikov AA^{1,2}, Pogonin AV^{1,3}, Kostenko EV^{1,4} ✉

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Consultative and Diagnostic Polyclinic № 121, Moscow, Russia

³ Spasokukotsky City Clinical Hospital, Moscow, Russia

⁴ Moscow Centre for Research and Practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine, Moscow, Russia

The paper reports the results of survey carried out in order to assess patients' opinion on the remote medical care provided by the telemedicine center of the Department of health of Moscow during the pandemic. Survey of 216 COVID-19 patients who received outpatient care made it possible to assess their health condition and determine the factors contributing to satisfaction with care provided. Patients' health condition was evaluated based on the course of underlying disease and comorbidities, which were revealed in 24.3% of COVID-19 patients. The following three groups were formed: patients with favorable (37.5%), satisfactory (36.7%) and unfavorable (25.8%) health condition. The majority of patients (76.4%) were satisfied with telemedicine consultations; men (79.8%), individuals with favorable condition (83.1%) and patients under 50 (81.9%) demonstrated significantly higher level of satisfaction. The following arguments in favour of telemedicine consultations were specified by patients: appointment of the specialist's consultation, promptness of treatment appointment, provision of medical recommendations, including recommendations on a healthy lifestyle, as well as promptness of house call and ambulance call. The main dissatisfaction reasons were as follows: lack of appropriate equipment, difficulties when setting up the equipment, complexity of the instructions for connecting to telemedicine consultations, poor quality of video/audio conferencing; these indicated the patients' inadequate technical resources. Telemedicine consultations may be considered an effective method of outpatient care provision for COVID-19 patients, especially since 64.7% of patients plan to use telemedicine consultations in the future, and 72.3% of patients are ready to recommend them to others.

Keywords: telemedicine consultations, morbidity, COVID-19, pandemic, satisfaction

Author contribution: Polunina NV, Tyazhelnikov AA, Pogonin AV — study concept and design; Tyazhelnikov AA, Kostenko EV — data acquisition and processing; Polunina NV — statistical analysis; Tyazhelnikov AA, Kostenko EV — manuscript writing; Polunina NV — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the City Polyclinic № 2 of the Department of health of Moscow (protocol № 9 dated September 30, 2020). The survey was carried out by consent of the patient under full anonymity; the patient was informed that his/her personal data would never be used anywhere else.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Kostenko
Zemlyanoy Val, 53, Moscow, 105120; ekostenko58@mail.ru

Received: 27.11.2020 **Accepted:** 14.12.2020 **Published online:** 27.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.084

Сложившаяся в 2020 г. эпидемическая ситуация поставила новые вызовы как перед глобальным здравоохранением в целом, так и перед отечественной системой здравоохранения. Наиболее важным аспектом эпидемиологических мероприятий в условиях пандемии является ограничение скорости распространения инфекции путем сокращения контактов, в том числе очных визитов пациента в поликлинику или посещений врачом на дому [1].

В связи с возросшей в условиях пандемии потребностью населения в своевременной и качественной медицинской помощи возникла необходимость применения новых современных дистанционных информационно-коммуникационных технологий при оказании амбулаторной помощи населению. Дистанционные технологии позволяют не только расширить доступ к медицинским услугам, но и снизить риск распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19, позволяя пациентам не нарушать режим самоизоляции и не подвергать окружающих риску заражения. Согласно данным оперативного штаба по контролю и мониторингу ситуации с коронавирусом в г. Москве от 29 марта 2020 г., в среднем у 62% инфицированных SARS-CoV-2 пациентов заболевание протекает в легкой форме или бессимптомно. Несмотря на то что заболевание чаще протекает в легкой форме, такие пациенты требуют врачебного наблюдения, однако при необходимости оказания им медицинской помощи это позволяет наблюдать данную группу пациентов амбулаторно.

Дистанционные технологии, к которым относится телездоровье [2], позволяют оказать пациенту качественную и доступную медицинскую помощь независимо от местонахождения врача, обеспечив при этом эпидемиологическую безопасность как сотрудникам сферы здравоохранения, так и пациенту. Тенденции развития телемедицины демонстрируют актуальность изучения мнений пациентов о внедрении телемедицинских консультаций, необходимого для разработки предложений по их совершенствованию [3].

В настоящей статье рассмотрен опыт предоставления медицинских услуг в дистанционном режиме (телемедицинских консультаций), представлена оценка удовлетворенности пациентов их качеством.

Удовлетворенность пациентов является одним из показателей качества оказания медицинской помощи, признанным не только в Российской Федерации, но и в других странах. Удовлетворенность пациентов качеством услуг складывается на основе сопоставления ожиданий пациента при обращении за услугой и фактическим опытом, связанным с данным обращением. Таким образом, уровень удовлетворенности как субъективной оценки качества услуг напрямую зависит от ожиданий, требований, которые не обязательно зафиксированы в административных регламентах и иных нормативных актах, регламентирующих оказание тех или иных услуг [4, 5].

В связи с растущей распространенностью цифровых и телемедицинских технологий в системе организации оказания медицинской помощи существенное значение имеет изучение ключевого показателя качества деятельности системы здравоохранения — удовлетворенности пациентов и влияющих на нее факторов [6–8].

Мониторинг мнений пациентов необходим, чтобы организаторы интеграции телемедицинских технологий в систему оказания медицинской помощи могли проявлять гибкость при совершенствовании новых технологий в соответствии с основными потребностями пациентов.

Поскольку удовлетворенность медицинской помощью складывается из множества факторов, которые в большинстве случаев носят субъективный характер [9], наиболее информативным методом изучения мнения пациентов о работе системы здравоохранения признано проведение опросов [10]. Развитие телемедицинских технологий способствует повышению доступности амбулаторно-поликлинической помощи независимо от состояния и местонахождения пациента [11].

Целью настоящего исследования было изучить удовлетворенность пациентов качеством медицинских услуг, оказанных в дистанционном режиме посредством телемедицинских технологий.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе телемедицинского центра Департамента здравоохранения Москвы (ТМЦ ДЗМ), организованного в ГБУЗ КДП № 121 ДЗМ. Критерии включения пациентов в исследование: наличие документального подтверждения COVID-19, лечение в амбулаторных условиях.

Для изучения мнения пациентов об удовлетворенности организацией медицинской помощи и качеством предоставления дистанционной консультативной помощи было проведено анкетирование 216 пациентов с использованием разработанной нами анкеты «Изучение удовлетворенности пациентов с COVID-19 качеством предоставления дистанционных медицинских услуг в ТМЦ». Ответы пациентов на поставленные вопросы оценивали по 5-балльной рейтинговой шкале. При составлении анкеты использовали проверочные вопросы, что позволило исключить неправильно заполненные анкеты (приложение). Анкетирование в период с 30 апреля по 10 мая 2020 г. проводил администратор ТМЦ, который опрашивал использующих телемедицинские консультации пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 по телефону и заполнял анкету.

Изучение заболеваемости проводили на основании данных выкопировки из «Медицинской карты пациента, получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях» сведений о наличии у пациентов с COVID-19 симптомов проявления основного заболевания и хронических заболеваний. Эти данные вносили в выборочную карту, которая помимо перечисленных данных содержала ФИО пациента, дату рождения, место жительства, дату обращения к врачу и результаты дистанционного наблюдения.

Статистический анализ, выполненный с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics для Windows, версия 20.0 (IBM Corp.; США), предполагал вычисление экстенсивных и интенсивных показателей, средних величин и их ошибок, оценку их достоверности, сравнение средних и показателей. Различия считали значимыми при $P \geq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные данные свидетельствуют, что практически каждый третий пациент находился в возрасте от 30 до 40 лет (32,7%), каждый четвертый пациент — в возрасте от 40 до 50 лет (23,1%), каждый пятый пациент — в возрасте от 50 до 60 лет (19,4%). Наиболее малочисленную группу составили пациенты в возрасте 20–29 лет (15,6%) и 60 лет и старше (9,2%).

Таблица 1. Распределение пациентов с COVID-19 мужского и женского пола по наличию симптомов заболевания (в % к итогу)

Число симптомов у пациентов с COVID-19	Мужчины	Женщины	Вероятность безошибочного прогноза, P
0–3 симптома	44,9	29,9	$\geq 0,99$
4–7 симптомов	30,3	43,3	$\geq 0,95$
8–12 симптомов	24,7	26,8	$\leq 0,95$
Итого	100,0	100,0	

Средний возраст обследуемых составил $40,3 \pm 0,72$ лет среди мужчин, а среди женщин был достоверно выше ($44,2 \pm 0,97$ лет, $P < 0,01$). Отмечено, что среди мужчин 40,4% пациентов находились в возрасте от 30 до 40 лет, женщин было 26,6%, $P \leq 0,05$. Среди женщин преобладали пациенты в возрасте от 40 до 50 лет, составляя 27,3%, в этой же возрастной группе доля мужчин составляла 15,7%, $P \leq 0,05$. Наименьшее число как мужчин, так и женщин относилось к возрастной группе 20–29 лет (20,2% и 12,5% соответственно, $P \geq 0,05$) и группе 60 лет и старше (10,1% и 10,2% соответственно, $P \geq 0,05$).

Во всех возрастных группах выявлено достоверное различие по полу, за исключением двух возрастных групп — до 30 лет и 60 лет и старше.

Анализ состояния здоровья, проведенный на основании медицинской документации, предполагал изучение течения основного заболевания и сопутствующих заболеваний. Полученные данные показали, что у большинства обследованных пациентов, медицинскую помощь которым оказывали в амбулаторных условиях, заболевание COVID-19 протекало в легкой форме, в то время как пациентов с тяжелой формой течения заболевания госпитализировали в соответствующие стационары.

Однако и при легкой форме у большинства заболевших могут быть различные симптомы проявления заболевания. Изучение частоты распространенности симптомов заболевания показало, что большинство находившихся на амбулаторном лечении пациентов с COVID-19 жаловались на повышение температуры тела (84,9 случая на 100 обследованных), сухой или с небольшим количеством мокроты кашель (74,3 случая на 100 обследованных), одышку (48,5 случаев на 100 обследованных), общую слабость (78,6 случаев на 100 обследованных), быструю утомляемость (69,2 случая на 100 обследованных), отсутствие обоняния (37,5 случаев на 100 обследованных), конъюнктивит (29,7 случаев на 100 обследованных), нарушение сна (61,8 случаев на 100 обследованных). Наименее распространенными были такие симптомы заболевания, как головная боль (14,3 случая на 100 обследованных), тошнота и рвота (9,6 случаев на 100 обследованных), диарея (7,3 случая на 100 обследованных).

Отмечено, что в среднем на одного пациента приходилось $5,39 \pm 0,09$ симптомов. В зависимости от количества имевшихся симптомов все пациенты были распределены по трем группам. В первую группу, наиболее благоприятную по состоянию здоровья, вошли пациенты, у которых либо не было жалоб, либо они указали до трех жалоб. Удельный вес таких пациентов составил 37,5%. В третью группу, неблагоприятную по состоянию здоровья, вошли пациенты, предъявлявшие 8 и более жалоб на свое здоровье, их удельный вес составил 25,7%. Во вторую группу вошли остальные пациенты, их удельный вес составил 36,8%.

Полученные данные показали, что среди мужчин преобладали пациенты с более благоприятным течением заболевания, а среди женщин — пациенты, имевшие от 4 до 7 проявлений заболевания (табл. 1). В то же время

удельный вес пациентов, имевших 8 и более симптомов заболевания, составлял 24,7% у мужчин и у 26,8% женщин.

Изучение сопутствующей патологии у пациентов с COVID-19 обусловлено несколькими причинами. Во-первых, наличие сопутствующих заболеваний может способствовать ухудшению течения основного заболевания и инвалидизации, во-вторых, такие пациенты требуют дополнительного медицинского наблюдения и медикаментозного обеспечения.

Углубленное изучение состояния здоровья взятых под наблюдение пациентов с COVID-19 показало, что сопутствующие заболевания присутствовали у 24,3% заболевших COVID-19, в том числе среди мужчин сопутствующие заболевания были выявлены у 14,7%, среди женщин их число было в достоверно (в 2,3 раза, $P < 0,01$) выше и составляло 33,9%. Уровень сопутствующей заболеваемости составил 350,2%, в том числе среди пациентов до 40 лет — 312,9%, а среди лиц старше 40 лет — 387,8%. Анализ уровня заболеваемости среди мужчин и женщин показал, что среди мужчин уровень заболеваемости был достоверно (в 1,4 раза, $P < 0,99$) ниже по сравнению с женщинами (290,8% и 409,7% соответственно).

В структуре сопутствующей заболеваемости первые семь мест занимают болезни системы кровообращения (17,3%), мочеполовой (12,1%) и костно-мышечной систем (11,2%), органов пищеварения (10,5%) и новообразования (9,5%), органов дыхания (8,7%), болезни глаза и придаточного аппарата (7,4%), на долю которых приходится 76,7% от всей выявленной патологии.

Установлено, что большая часть всех выявленных заболеваний у обследованных пациентов мужского и женского пола (75,8% и 77,1% соответственно) приходится на перечисленные классы болезней. Однако ранговая структура заболеваемости различается (табл. 2).

Несмотря на то что первое место в структуре заболеваемости пациентов с COVID-19 занимают болезни системы кровообращения, уровень заболеваемости данной патологией в 1,8 раза выше среди женщин по сравнению с мужчинами (78,1% и 43,1% соответственно). Практически по всем заболеваниям уровень заболеваемости среди женщин выше по сравнению с мужчинами, при этом наиболее значимые различия наблюдаются в распространенности таких заболеваний, как болезни мочеполовой системы (в 1,7 раза — 53,8% и 30,9% соответственно), болезни глаза и придаточного аппарата (в 1,6 раза — 31,9% и 19,8% соответственно), болезни костно-мышечной системы (в 1,4 раза — 46,1% и 31,8% соответственно).

Обращает на себя внимание взаимосвязь между наличием сопутствующей патологии и числом симптомов проявления заболевания (табл. 3). Среди пациентов без сопутствующей патологии, достоверно (в 2,1 раза, $P \geq 0,95$) больше лиц, указавших не более трех симптомов заболевания, и достоверно меньше (в 1,7 раза, $P \geq 0,95$) лиц, отметивших 8 и более симптомов заболевания.

Таблица 2. Ранговое распределение заболеваний по классам болезней у обследованных пациентов с COVID-19 (в % к итогу)

Ранги	Мужчины		Женщины	
	Классы болезней	%	Классы болезней	%
1	Болезни системы кровообращения	14,8	Болезни системы кровообращения	19,1
2	Болезни органов пищеварения	11,8	Болезни мочеполовой системы	13,1
3	Болезни костно-мышечной системы	10,9	Болезни костно-мышечной системы	11,3
4	Новообразования	10,7	Болезни органов пищеварения	9,5
5.	Болезни мочеполовой системы	10,6	Новообразования	8,7
6	Болезни органов дыхания	10,2	Болезни глаза и придаточного аппарата	7,8
7	Болезни глаза и придаточного аппарата	6,8	Болезни органов дыхания	7,6
	Прочие	24,2	Прочие	22,9
	Итого	100	Итого	100

Приведенные данные показывают, что при наличии сопутствующей патологии заболевание чаще имеет неблагоприятное течение.

Для пациентов с COVID-19 был создан специализированный телемедицинский центр, основной задачей которого было предоставление врачами онлайн-консультаций больным с подтвержденным диагнозом коронавирусная инфекция. Поскольку их состояние позволяло лечиться в амбулаторных учреждениях, для таких пациентов врачи проводили дистанционные телемедицинские консультации из специально оснащенного специализированного телемедицинского центра.

Консультирование проводили круглосуточно в режиме онлайн. Применение видеонаблюдения с использованием аудио- или видеосвязи позволяет оценить состояние пациента, пользование электронной картой пациента и другими сведениями из ЕМИАС дает возможность оценить течение заболевания, а сведения о сопутствующих заболеваниях позволяют врачам корректировать лечение. При проведении консультаций врачи дают медицинские рекомендации, отвечают на вопросы пациентов.

Полученные данные показали, что большинство опрошенных пациентов с COVID-19 (76,4%) были удовлетворены телемедицинскими консультациями. Отмечено, что пациентов, удовлетворенных телемедицинскими консультациями, достоверно ($P < 0,95$) больше среди мужчин по сравнению с женщинами (79,8% в группе мужчин и 68,5% в группе женщин).

Установлено, что степень удовлетворенности телемедицинскими консультациями выше среди пациентов без сопутствующих заболеваний и имеющих не более 3-х симптомов заболевания по сравнению с пациентами, отнесенными по состоянию здоровья к неблагоприятной группе (83,1% против 62,1%, $P < 0,95$).

В качестве основных аргументов в пользу применения дистанционного режима консультирования пациенты указывали получение консультаций специалистов (73,9% пациентов), оперативность назначения лечения (61,6% пациентов), получение рекомендаций по здоровому образу жизни (52,8% пациентов) и медицинских рекомендаций

(47,3% пациентов), быстроту информирования о результатах лабораторного обследования (49,2% пациентов), постоянный контроль за состоянием здоровья пациентов (39,6% пациентов), а также быстроту оформления вызова врача на дом (31,7% пациентов) и вызова скорой медицинской помощи (29,3% пациентов).

Отмечено, что мужчины чаще указывали в качестве аргументов в пользу обращения в телемедицинский центр оперативность назначения лечения и получение интересующих их медицинских рекомендаций, а женщины — получение консультаций специалистов, наличие постоянного врачебного контроля и быстроту оформления вызова врача на дом. В среднем на одного пациента с COVID-19 приходилось от трех до четырех аргументов в пользу телемедицинских консультаций, в том числе у пациентов-мужчин среднее число аргументов составило $3,1 \pm 0,21$, у пациенток-женщин — $4,6 \pm 0,36$ ($P < 0,99$).

Анализ причин неудовлетворенности пациентов качеством предоставляемых дистанционных медицинских услуг показал, что ведущее место принадлежит причинам технического характера, в том числе отсутствию соответствующего оборудования, трудностям с его настройкой, сложности инструкции по подключению к телемедицинским консультациям, качеству аудио- и видеосвязи, частой смене врачей, длительности ожидания ответа (рис. 1).

Отмечено, что пациенты старшего возраста более требовательны к оценке качества оказания медицинской помощи, в том числе в дистанционном формате. В целом установлено, что среди пациентов старше 40 лет по сравнению с лицами в возрасте до 40 лет достоверно (в 1,7 раза) больше не удовлетворенных предоставляемыми дистанционными услугами (29,7% против 17,5% соответственно).

По сравнению с более молодыми пациентами, пациенты в возрасте старше 40 лет (табл. 4) чаще не имеют соответствующего оборудования для участия в дистанционном общении, у них чаще возникают трудности в настройке оборудования, страдает качество связи.

Одним из критериев удовлетворенности качеством медицинской помощи являются своевременность и полнота предоставления пациенту данных о состоянии здоровья.

Таблица 3. Распределение пациентов с COVID-19 по числу предъявляемых жалоб в зависимости от наличия сопутствующей патологии (в % к итогу)

Число симптомов у пациентов с COVID-19	Пациенты, не имеющие сопутствующей патологии	Пациенты, имеющие сопутствующую патологию	Вероятность безошибочного прогноза, p
0–3 симптомов	49,6	26,5	$\geq 0,99$
4–7 симптомов	30,8	39,4	$\leq 0,95$
8–12 симптомов	19,6	34,1	$\geq 0,95$
Итого	100,0	100,0	

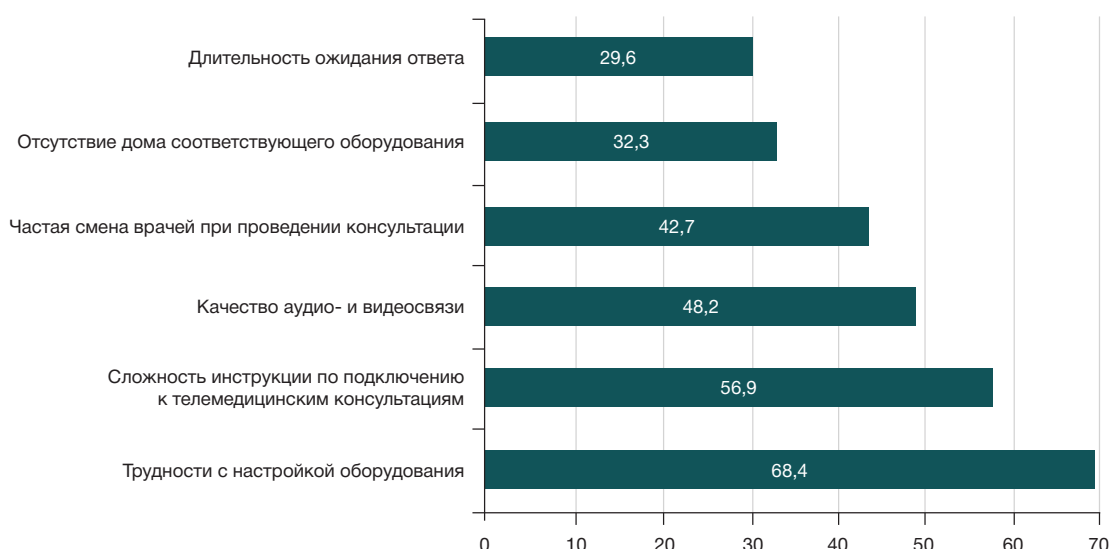


Рис. 1. Частота встречаемости пациентов с COVID-19 по причинам неудовлетворенности телемедицинскими консультациями (на 100 обследованных)

Установлено, что пациенты старшей возрастной группы более терпеливы — по сравнению с более молодыми пациентами, они реже указывали на длительность ожидания ответа на звонок и несвоевременность оказания консультаций как на причины неудовлетворенности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе ответов было установлено, что в основном ответы на вопрос о неполноте предоставляемых сведений касались ситуаций, не связанных с медицинской деятельностью, им была свойственна организационная или правовая направленность. Особое внимание пациенты уделяли оценке качества связи, поскольку одной из важнейших задач телемедицинских консультаций являлась визуальная оценка состояния здоровья пациента. В то же время при общении с пациентами лишь в каждом пятом (19,2%) случае врачи использовали аудиосвязь, в 18,1% случаев — аудио- и видеосвязь и лишь в 14,5% случаев видеосвязь.

К сожалению, в каждом втором случае имели место проблемы с качеством видеосвязи, что способствовало неудовлетворенности телемедицинскими консультациями (48,2%), причем испытывающих проблемы с видеосвязью среди пациентов старших возрастных групп было достоверно (в 1,4 раза) больше, чем среди пациентов молодого возраста (57,1% против 39,3%, $P \leq 0,95$).

Важным аспектом разработки мероприятий по улучшению медико-организационной деятельности

телемедицинского центра амбулаторного типа является изучение предложений пациентов по совершенствованию телемедицинских услуг (рис. 2).

Наиболее частым пожеланием являлось расширение выбора специалистов, консультирование одним и тем же врачом и своевременное устранение технических сбоев. Помимо приведенных результатов опроса пациентов об их удовлетворенности деятельностью телемедицинского центра о качестве телемедицинских консультаций можно судить по наличию у пациентов желания пользоваться данным видом медицинской помощи и в дальнейшем рекомендовать его своим друзьям и знакомым. Полученные данные показали, что 64,7% опрошенных пациентов с COVID-19 планируют использование телемедицинских консультаций в будущем, а 72,3% пациентов готовы рекомендовать их другим.

Несмотря на наличие компонента субъективности, показатель удовлетворенности пациентов медицинской помощью обладает высокой информативностью и может быть использован не только для оценки качества предоставляемых телемедицинских консультаций, но также для разработки мероприятий по совершенствованию медицинской помощи.

ВЫВОДЫ

1. Внедрение дистанционного консультирования с применением телемедицинских технологий в медицинскую практику ведения пациентов с подтвержденным

Таблица 4. Частота встречаемости пациентов с COVID-19 по причинам неудовлетворенности телемедицинскими консультациями и возрасту (на 100 обследованных)

№ п/п	Причины неудовлетворенности	Число случаев на 100 обследованных		Вероятность безошибочного прогноза, p
		до 50 лет	старше 50 лет	
1	Трудности с настройкой оборудования	53,2	73,6	$\geq 0,99$
2	Сложность инструкции по подключению к телемедицинским консультациям	44,5	61,3	$\geq 0,95$
3	Качество аудио- и видеосвязи	39,3	57,1	$\geq 0,95$
4	Частая смена врачей при проведении консультации	32,6	46,8	$\leq 0,95$
5	Отсутствие дома соответствующего оборудования	21,3	43,2	$\geq 0,99$
6	Длительность ожидания ответа	30,5	18,7	$\geq 0,95$
7	Несвоевременность оказания консультаций	27,3	15,3	$\geq 0,95$
8	Недостаточная полнота предоставляемых сведений	14,6	19,2	$\leq 0,95$

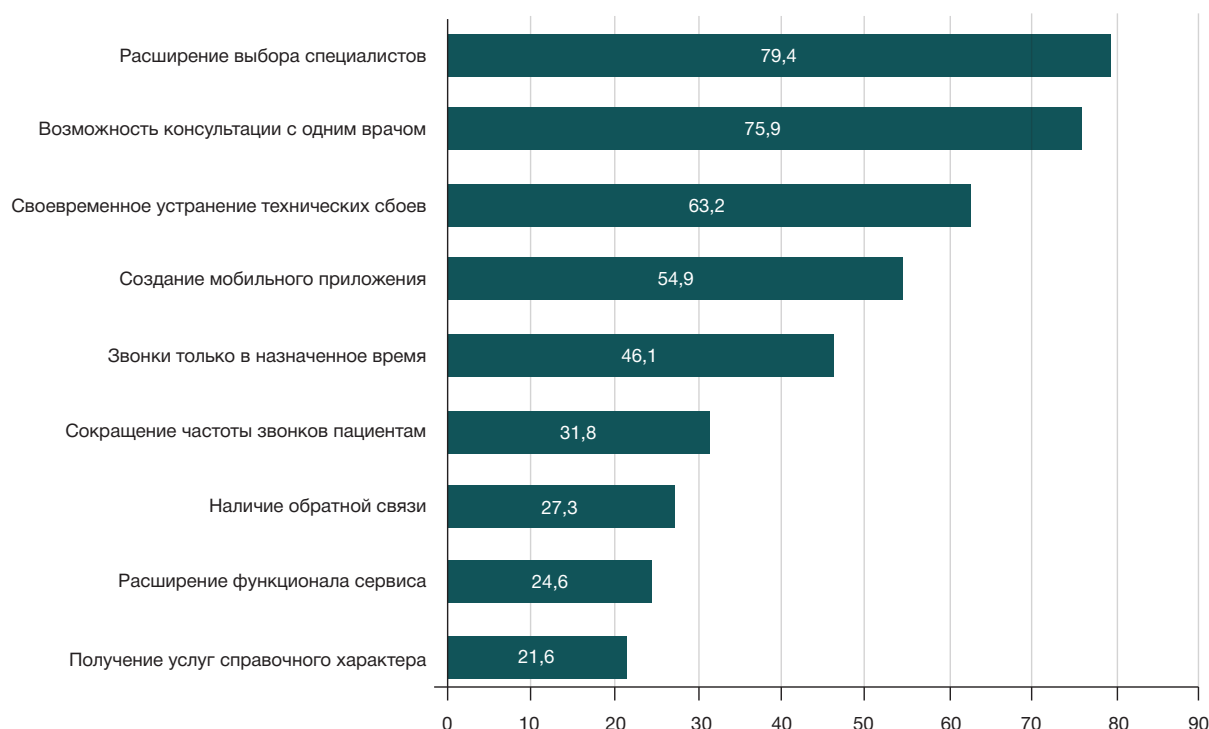


Рис. 2. Распределение пациентов с COVID-19 по предложениям по улучшению качества телемедицинских консультаций (на 100 обследованных)

диагнозом COVID-19 позволяет оценивать состояние здоровья пациента, проводить динамическое наблюдение за течением заболевания и осуществлять своевременную коррекцию лечения. 2. Показатель удовлетворенности пациентов качеством полученной медицинской помощи содержит компонент субъективности и связан с состоянием здоровья пациента. Так, степень удовлетворенности телемедицинскими консультациями выше среди пациентов без сопутствующих заболеваний и имеющих не более 3-х симптомов заболевания COVID-19 по сравнению с пациентами, отнесенными по состоянию здоровья к неблагоприятной группе. 3. Среди причин неудовлетворенности пациентов качеством предоставляемых дистанционных медицинских услуг ведущее место принадлежит причинам технического характера и организационно-процессным аспектам, что послужило основанием для разработки мероприятий по совершенствованию данного вида медицинской помощи. 4. Основными направлениями по улучшению качества оказания телемедицинских услуг можно назвать

следующие: совершенствование технических требований к оборудованию с учетом устранения причин, приводящих к сбоям во время проведения телеконсультирования; обеспечение пациентов мобильными приложениями для получения телемедицинских консультаций; расширение перечня врачей-специалистов в соответствии с выявленной у пациентов с COVID-19 сопутствующей патологией; проведение дистанционных консультаций в течение всего периода наблюдения пациента одним врачом. 5. С учетом того что 64,7% опрошенных пациентов с COVID-19 планируют использование телемедицинских консультаций в будущем, а 72,3% пациентов готовы рекомендовать их другим, следует рассматривать внедрение дистанционных медицинских услуг как новой организационной формы оказания высококачественных медицинских услуг на базе амбулаторных центров и их расширение на основе использования информационно-коммуникационных технологий. Это является одним из перспективных направлений современного здравоохранения.

Литература

- Matias T, Dominski FH, Marks DF. Human needs in COVID-19 isolation. *J Health Psychol.* 2020; 25 (7): 871–82. DOI: 10.1177/1359105320925149.
- Приказ Минздрава РФ от 30.11.2017 № 965 «Об утверждении порядка организации и оказания медицинской помощи с применением телемедицинских технологий».
- Акулин И. М., Чеснокова Е. А., Пресняков С. А., Прядко А. Е., Зиминая Е. И., Гурьянова Н. Е. Порядок осуществления телемедицинских консультаций в субъектах Российской Федерации. *Врач и информационные технологии.* 2020; 3: 45–59. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-3-49-59.
- Бойков В. Э., Добролюбова Е. И., Зыбуновская Н. В., Покида А. Н. Результаты исследования общей удовлетворенности граждан качеством государственных и муниципальных услуг. *Социология власти.* 2012; 1: 40–65.
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 10 мая 2017 г. № 203н «Об утверждении критериев оценки качества медицинской помощи».
- Jacobs JJ, Ekelboom R, Jacobs JP, et al. Patient satisfaction with a teleradiology service in general practice. *BMC Fam Pract.* 2016; Feb 10; 17: 17. DOI: 10.1186/s12875-016-0418-y.
- Морозов С. П., Владимирский А. В., Сименюра С. С. Качество первичных телемедицинских консультаций «пациент-врач» (по результатам тестирования телемедицинских сервисов). *Врач и информационные технологии.* 2020; 1: 52–62. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-1-52-62.
- Владимирский А. В., Морозов С. П., Сименюра С. С. Телемедицина и COVID-19: оценка качества телемедицинских

- консультаций, инициированных пациентами с симптомами ОРВИ. Врач и информационные технологии. 2020; 2: 52–63. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-2-52-63.
9. Суслин С. А., Вавилов А. В., Ганнатулина Р. И. Удовлетворенность пациентов городской многопрофильной больницы медицинским обслуживанием. Организация здравоохранения. 2018; 5 (4): 118–25. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-4-12.
 10. Касапов К. И., Некрасов А. Ю., Величко Е. А. Социологический опрос пациентов хирургического профиля как инструмент удовлетворенности оказываемой медицинской помощи. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2017; 16 (4): 38–42.
 11. Müller KI, Alstadhaug KB, Bekkelund SI, et al. Acceptability, feasibility, and cost of telemedicine for nonacute headaches: a randomized study comparing video and Traditional consultations. J Med Internet Res. 2016; 18: e140. DOI: 10.2196/jmir.

References

1. Matias T, Dominski FH, Marks DF. Human needs in COVID-19 isolation. J Health Psychol. 2020; 25 (7): 871–82. DOI: 10.1177/1359105320925149.
2. Prikaz Minzdrava RF ot 30.11.2017 №965 «Ob utverzhdenii poryadka organizatsii i okazaniya medicinskoj pomoshchi s primeneniem telemedicinskih tekhnologij». Russian.
3. Akulin IM, Chesnokova EA, Presnyakov SA, Pryadko AE, Zimina EI, Guryanova NE. Poryadok osushchestvleniya telemedicinskih konsul'tacij v sub'ektah Rossijskoj Federacii. Vrach i informacionnye tekhnologii. 2020; №3: 45–59. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-3-49-59. Russian.
4. Bojkov VE, Dobrolyubova EI, Zybunovskaya NV, Pokida AN. Rezul'taty issledovaniya obshchej udovletvorennosti grazhdan kachestvom gosudarstvennyh i municipal'nyh uslug. Sociologiya vlasti. 2012; 1: 40–65. Russian.
5. Prikaz Ministerstva zdravooohraneniya RF ot 10 maya 2017 g. № 203n «Ob utverzhdenii kriteriev ocenki kachestva medicinskoj pomoshchi». Russian.
6. Jacobs JJ, Ekkelboom R, Jacobs JP, et al. Patient satisfaction with a teleradiology service in general practice. BMC Fam Pract. 2016; Feb 10; 17: 17. DOI: 10.1186/s12875-016-0418-y.
7. Morozov SP, Vladimirskij AV, Simenyura SS. Kachestvo pervichnyh telemedicinskih konsul'tacij «pacient-vrach» (po rezul'tatam testirovaniya telemedicinskih servisov). Vrach i informacionnye tekhnologii. 2020; 1: 52–62. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-1-52-62. Russian.
8. Vladimirskij AV, Morozov SP, Simenyura SS. Telemedicina i COVID-19: ocenka kachestva telemedicinskih konsul'tacij, iniciirovannyh pacientami s simptomami ORVI. Vrach i informacionnye tekhnologii. 2020; 2: 52–63. DOI: 10.37690/1811-0193-2020-2-52-63. Russian.
9. Suslin SA, Vavilov AV, Gannatulina RI. Udovletvorennost' pacientov gorodskoj mnogoprofil'noj bol'nicy medicinskim obsluzhivaniem. Organizaciya zdravooohraneniya. 2018; 5 (4): 118–25. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-4-12. Russian.
10. Kasapov KI, Nekrasov AYU, Velichko EA. Sociologicheskij opros pacientov hirurgicheskogo profilya kak instrument udovletvorennosti okazyvaemoj medicinskoj pomoshchi. Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii. 2017; 16 (4): 38–42. Russian.
11. Müller KI, Alstadhaug KB, Bekkelund SI, et al. Acceptability, feasibility, and cost of telemedicine for nonacute headaches: a randomized study comparing video and Traditional consultations. J Med Internet Res. 2016; 18: e140. DOI: 10.2196/jmir.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИГИЕНИЧЕСКОГО ВОСПИТАНИЯ ШКОЛЬНИКОВ И СТУДЕНТОВ ПО ФОРМИРОВАНИЮ НАВЫКОВ БЕЗОПАСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННЫХ УСТРОЙСТВ

О. Ю. Милушкина, С. В. Маркелова , Н. А. Скоблина, А. Б. Моисеев, А. А. Аль-Сабунчи, А. А. Татаринчик, П. О. Савчук, О. В. Иевлева

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

Негативное влияние цифровой среды на здоровье молодежи стимулирует поиск новых приемов гигиенического воспитания. Целью работы были апробация и гигиеническая оценка эффективности практики формирования здорового образа жизни у студентов и школьников в части формирования навыков безопасного использования электронных устройств. В исследовании приняли участие 256 студентов, 200 учащихся старших классов, 400 преподавателей и 251 родитель. Гигиеническое воспитание осуществляли с использованием опубликованных в научной литературе материалов по здоровому образу жизни, а также материалов, размещенных на Интернет-ресурсах медицинских организаций, профессионально работающих в этой области и их группах в социальных сетях «Одноклассники», «ВКонтакте», «Facebook», «Инстаграм» и др. Было организовано динамическое наблюдение за физическим развитием школьников и студентов, а также анкетирование школьников, студентов, преподавателей, родителей. Для статистической обработки результатов использовали методы описательной статистики, *t*-критерий Стьюдента, корреляционный, дискриминантный и кластерный анализы, проводили расчет рисков. Наиболее популярным источником информации о сохранении здоровья респонденты отметили Интернет: среди школьников — 79,0%, студентов — 88,6%, родителей — 64,9%, преподавателей — 50,4%. Апробированная практика гигиенического воспитания позволила снизить число школьников и студентов, не имевших навыков безопасного использования электронных устройств до 20 и 25% соответственно; сократить продолжительность использования смартфона в течение дня; увеличить двигательную активность, а также долю детей с нормальным физическим развитием ($p \leq 0,01$); способствовала увеличению продолжительности ночного сна. Апробированные способы воспитания финансово не затратны и могут быть тиражированы в других регионах и организациях.

Ключевые слова: школьники, студенты, электронные устройства, правила использования, гигиеническое воспитание, оценка эффективности

Вклад авторов: О. Ю. Милушкина, Н. А. Скоблина — планирование и научное руководство, обработка материала, написание статьи; А. Б. Моисеев — написание статьи; А. А. Аль-Сабунчи, С. В. Маркелова, А. А. Татаринчик — анализ литературных данных, сбор и обработка материала, написание статьи; П. О. Савчук, О. В. Иевлева — сбор материала.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 159 от 21 ноября 2016 г.), проведено с соблюдением этических норм, представленных в Хельсинкской декларации и Директивах Европейского сообщества (8/609 ЕС). Добровольное информированное согласие было получено для каждого участника программы. Опрос взрослого населения (родители и педагоги) проводился на добровольной основе с использованием онлайн-сервиса.

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

Статья получена: 06.11.2020 **Статья принята к печати:** 17.12.2020 **Опубликована онлайн:** 29.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.086

EVALUATION OF EFFICACY OF PROVIDING HYGIENE EDUCATION TO SCHOOLCHILDREN AND STUDENTS IN THE PROCESS OF DEVELOPMENT OF THE SAFE ELECTRONIC DEVICE USE SKILLS

Milushkina OYu, Markelova SV , Skoblina NA, Moiseev AB, Alsabunchi AA, Tatarinchik AA, Savchuk PO, Ievleva OV


Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The negative impact of the digital environment on the health of young people necessitates the search for new methods of hygienic education. This study aimed to test and assess the hygienic qualities of the practice designed to give students and schoolchildren the skills allowing safe use of electronic devices. The study involved 256 students, 200 senior schoolchildren, 400 teachers and 251 parent. The hygienic education practice relied on the healthy lifestyle materials published in scientific literature, as well as materials posted on the Internet resources of medical organizations professionally engaged in the area considered, as well as their groups in the social networks Odnoklassniki, VKontakte, Facebook, Instagram, etc. We observed physical development of the schoolchildren and students dynamically and polled schoolchildren, students, teachers, and parents. For statistical processing of the results, we used methods of descriptive statistics, Student's *t*-test, correlation, discriminant and cluster analysis, and calculated risks. As the most popular source of information about health maintenance, Internet scored as follows: among schoolchildren — 79.0%, students — 88.6%, parents — 64.9%, teachers — 50.4%. The tested hygienic education practice allowed for a reduction of the number of schoolchildren and students who did not have the skills to safely use electronic devices to 20 and 25%, respectively. The practice also taught the participants to reduce their daily smartphone use time, engage in physical activity more often, which ultimately increased the share of children whose physical development was normal ($p \leq 0.01$), and helped to increase the duration of night sleep. The tested methods of education are not costly; they can be replicated in other regions and organizations.

Keywords: schoolchildren, students, electronic devices, rules of use, hygiene education, assessment of the effectiveness

Author contribution: OYu Milushkina, NA Skoblina — research planning and management, material processing, authoring; AB Moiseev — authoring; AA Alsabunchi, SV Markelova, AA Tatarinchik — literature data analysis, material collection and processing, authoring; PO Savchuk, OV Ievleva — material collection.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (Minutes #159 of November 21, 2016), conducted in compliance with the ethical standards provided by the Declaration of Helsinki and the European Community Directives (8/609 EU). Each participant signed a voluntary informed consent form. The participating adults (parents and teachers) were polled voluntary with the help of an online service.

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

Received: 06.11.2020 **Accepted:** 17.12.2020 **Published online:** 29.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.086

Целевым показателем приоритетного проекта «Формирование здорового образа жизни» («Укрепление общественного здоровья») в России является увеличение числа граждан, приверженных здоровому образу жизни, к 2025 г. до 60% [1]. Для реализации проекта предусмотрено проведение широкомасштабной информационной кампании в средствах массовой информации (СМИ), на различных Интернет-ресурсах, в социальных сетях и др. по вопросам сохранения здоровья. Проект предполагает привлечение авторитетных экспертов в области здорового образа жизни (ЗОЖ) для сбора, апробации и тиражирования лучших практик сохранения здоровья различных групп населения.

Формирование ЗОЖ у детей, подростков и молодежи всегда расценивалось специалистами как сложный, системный, комплексный, многоуровневый процесс, охватывающий все сферы жизнедеятельности подрастающего поколения [2–5].

Тенденция к цифровизации всех сторон жизнедеятельности является мировой. Цифровая среда оказывает существенное влияние на процессы обучения детей, подростков и молодежи, их досуг, социализацию, состояние здоровья и образ жизни [6–10].

В условиях цифровизации изменился и основной источник информации о сохранении здоровья, который используют дети, подростки и молодежь: им в большей степени становится Интернет, и в меньшей степени — родители, педагоги и медицинские работники [11].

Важную роль приобретают инновационные методы и средства пропаганды ЗОЖ, например флешмобы, квесты, освещаемые в социальных сетях, экономическое стимулирование и т. п., — они более привлекательны для молодежи по сравнению с традиционными методами, которые использовали несколько десятилетий назад [12–14].

Однако в современных условиях цифровизации практически отсутствуют научные исследования по оценке эффективности использования Интернет-ресурсов по гигиеническому воспитанию подрастающего поколения. Примером Интернет-ресурсов, содержащих актуальную информацию по вопросам ЗОЖ, можно считать «Ямальский центр общественного здоровья и медицинской профилактики». Сотрудники Центра осуществляют активную информационно-коммуникационную кампанию в различных Интернет-ресурсах, социальных сетях путем размещения материалов по профилактике заболеваний, регулярно проводят различные творческие конкурсы, популяризирующие ЗОЖ. Аналогичную работу по профилактике, в том числе неинфекционных заболеваний, проводят специалисты «НМИЦ терапии и профилактической медицины», ФБУЗ «Центр гигиенического образования населения» Роспотребнадзора.

Низкая доля лиц, приверженных принципам ЗОЖ, а также соблюдающих правила безопасного использования электронных устройств (ЭУ) [15–16], свидетельствует о недостаточности действующих мер профилактической направленности и обуславливает необходимость проведения дальнейших научных исследований и активизации работы по воспитанию у подрастающего поколения гигиенических навыков, в том числе безопасного использования ЭУ.

Целью исследования было апробировать и оценить эффективность практик гигиенического воспитания студентов и школьников, в том числе способов формирования навыков безопасного использования

электронных устройств, базирующихся на Интернет-ресурсах.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В течение двух лет в рамках данного исследования осуществлялись меры по гигиеническому воспитанию студентов-медиков 2–3 курсов, изучающих гигиену в рамках Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования. Сотрудники и аспиранты кафедры гигиены на экспериментальной площадке «Долгопрудненская гимназия» (Московская обл.) также в течение двух лет проводили меры по формированию у школьников, их родителей и педагогов гигиенических навыков безопасного использования ЭУ в учебной и досуговой деятельности.

Критерии включения в исследование: наличие добровольно подписанного информированного согласия; принадлежность по возрасту к группе школьников, студентов; корректное заполнение участником опросника. Проведение опроса взрослого населения (родители и педагоги) проводили на добровольной основе с использованием онлайн-сервиса.

В ходе исследования осуществляли динамическое наблюдение за физическим развитием с использованием стандартизированных методик и инструментария [17].

Опытную группу составили 128 студентов-медиков (средний возраст 20 лет) и 100 школьников (средний возраст 16 лет) «Долгопрудненской гимназии». В контрольную группу вошли 128 студентов-медиков и 100 старших школьников, обучавшихся в образовательных организациях г. Долгопрудного, где работу по гигиеническому воспитанию не проводили. В исследовании приняли также участие 251 родитель и 400 преподавателей организаций начального, среднего и высшего образования.

Использовали все методы гигиенического воспитания (устный, печатный, наглядный, смешанный) и такие средства, как беседа, дискуссия, лекция, памятки, листовки, плакаты, видеоматериалы, телекоммуникационные средства и др. В частности, в работе по гигиеническому воспитанию студентов и школьников были использованы материалы, размещенные на официальных сайтах и в социальных сетях «Ямальский центр общественного здоровья и медицинской профилактики», «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины», «Центр гигиенического образования населения» Роспотребнадзора, а также видеоролики на канале «YouTube».

С учетом широкой вовлеченности молодежи, а также их родителей и педагогов в различные социальные сети и высокого интереса к Интернет-ресурсам, им было рекомендовано получать информацию по вопросам ЗОЖ посредством тематического общения с профильными специалистами в социальных сетях «Одноклассники», «ВКонтакте», «Facebook», «Инстаграм», «Телеграмм», а также посещения сайтов профильных медицинских организаций.

На официальном сайте «Долгопрудненской гимназии» была дополнительно размещена информация по ЗОЖ с практическими рекомендациями для учителей и родителей по ее использованию.

Для целей гигиенического воспитания было апробировано использование приложений по ЗОЖ, разработанных различными производителями на базе платформ ios и Android, которые школьники и студенты устанавливали на индивидуальные смартфоны.

Приложения позволяли осуществлять мониторинг индекса массы тела, экранного времени, пройденных шагов, продолжительности ночного сна.

В программу мер по гигиеническому воспитанию было включено использование: материалов по профилактике факторов риска, обусловленных техническими и аудиовизуальными характеристиками ЭУ (электромагнитное излучение, ионизация воздуха, диагональ экрана, уровень яркости экрана и т. п.), параметрами микроклимата в помещении, уровня его освещенности; информации по эргономике рабочего места, режимах труда и отдыха; информации по профилактике и лечебно-оздоровительным мероприятиям.

Для оценки эффективности практик формирования ЗОЖ у студентов и школьников были разработаны специальные опросники, распространяемые через онлайн-сервис Google Forms [18]. Анкеты содержали вопросы по изучению особенностей использования ЭУ учащимися, уровня их информированности о факторах риска, связанных с бесконтрольным использованием ЭУ, сформированности навыков безопасной работы с ЭУ, субъективно характеризовали состояние здоровья респондентов [18].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0 (StatSoft Inc.; США). В работе использовали методы описательной статистики, t -критерий Стьюдента, критический уровень значимости принимали равным 0,05; применяли корреляционный, дискриминантный и кластерный анализы, выполняли расчет рисков.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу по гигиеническому воспитанию школьников и студентов осуществляли как традиционными методами и средствами (беседы, дискуссии с использованием наглядных материалов, подготовка листовок и плакатов), так и инновационными, в числе которых были деловые игры, веб-квесты, тематическое общение с профильными специалистами в социальных сетях, информационных блогах, использование приложений по ЗОЖ для смартфонов. Программа была основана как на официальных материалах, так и на опубликованной ранее информации о правилах безопасного использования ЭУ, полученной авторами в ходе научных исследований.

Результаты анкетирования респондентов позволили определить безопасное время использования ЭУ, когда отсутствуют жалобы на состояние здоровья у школьников и студентов. При сравнении суммарного времени использования ЭУ учащимися, имеющими и не имеющими жалобы на состояние здоровья после работы с ЭУ, установлены статистически значимые различия ($p \leq 0,05$). Общее время работы с ЭУ у учащихся с наличием жалоб было существенно выше (представлено как $Me [Q_1; Q_3]$ в минутах — (660 [420; 960]), чем у тех, кто не предъявлял жалобы на состояние здоровья — (480 [360; 750]). Для определения вероятности появления жалоб при работе с ЭУ, а также поиска максимально допустимой продолжительности работы, не приводящей к появлению жалоб на здоровье, был применен дискриминантный анализ и получена следующая теоретическая модель:

$$Y_{\text{ж}} = -1,655 + 0,02 \times X_{\text{время}}$$

где $Y_{\text{ж}}$ — дискриминантная функция, характеризующая вероятность наличия жалоб; $X_{\text{время}}$ — время работы с ЭУ.

Константу дискриминации, которая разделила обследованных на две группы, определяли как значение функции, равноудаленное от центроидов. В группе с отсутствием жалоб на здоровье она составила $-0,216$, а в группе с наличием жалоб — $0,080$. Чувствительность модели достигала 73,3%, специфичность — 62,6%.

Согласно данной модели, допустимое время непрерывного использования ЭУ для старших школьников и студентов, при котором не будут наблюдаться жалобы на здоровье, составляет 78 мин, что и было взято за основу при разработке программы по гигиеническому воспитанию. Исходя из этой величины было установлено допустимое время работы с ЭУ, сформированы режимы труда и отдыха, организация перерывов с использованием гимнастики для глаз и двигательной активности.

Полученные данные, свидетельствующие о связи между двигательной активностью и средним временем использования мобильных электронных устройств в день (коэффициент корреляции между числом шагов в день и экранным временем составил $-0,36$), явились основанием для рекомендаций по увеличению двигательной активности учащихся как альтернативе работы с ЭУ, и использования в качестве критерия оценки эффективности профилактической работы учета «экранного времени» и «числа пройденных шагов».

С учетом высокой степени доверия респондентов к Интернету как источнику информации, в том числе в вопросах сохранения здоровья и ЗОЖ (студенты — 88,6%; старшие школьники — 79,0%; родители — 64,9%; учителя — 50,4%), в программу гигиенического воспитания были интегрированы материалы, размещенные на сайтах профильных медицинских организаций и их социальных сетях, общение онлайн с профильными специалистами.

К работе по гигиеническому воспитанию школьников были подключены родители школьников и педагоги, прошедшие адаптированный курс подготовки и тоже использующие Интернет-ресурсы профильных медицинских организаций.

В результате проведенной работы была сформирована группа школьников и студентов, благоприятно откликнувшихся на работу по гигиеническому воспитанию.

Использование специальных приложений по ЗОЖ на базе индивидуальных смартфонов позволило учащимся осуществлять мониторинг индекса массы тела, пройденных шагов, экранного времени, продолжительности ночного сна. У студентов, принявших участие в программе по гигиеническому воспитанию, согласно фиксируемым данным о двигательной активности произошло достоверное увеличение пройденных шагов ($p \leq 0,01$) до $13\,068 \pm 70$ шагов у юношей и 8555 ± 50 шагов у девушек, по сравнению со студентами, не вовлеченными в программу (9033 ± 90 и 7807 ± 70 шагов соответственно).

У школьников, принявших участие в программе по гигиеническому воспитанию, согласно приложению, фиксирующему данные о ночном сне, были получены сведения об увеличении продолжительности ночного сна до 8 ч (482 ± 42 мин), что приближается к гигиенически обоснованным рекомендациям, в то время как у школьников, не вовлеченных в программу, такой тенденции не было зафиксировано. Суммарное время использования ЭУ в учебный день у школьников, принявших участие в программе по гигиеническому воспитанию, сократилось в среднем до 3,8 ч (230 ± 30 мин).

Кластерный анализ в зависимости от динамики изучаемых показателей позволил разделить учащихся на

Таблица. Длительность использования смартфона в день и жировая масса тела учащихся в зависимости от эффективности освоения программы гигиенического воспитания

Показатель	Группа учащихся, благоприятно откликнувшихся на программу гигиенического воспитания		Группа учащихся, где гигиеническое воспитание не проводилось или оказалось не эффективным		p
	Me	[Q ₂₅ ; Q ₇₅]	Me	[Q ₂₅ ; Q ₇₅]	
Длительность использования смартфона в день, мин	180	[90; 300]	720	[480; 900]	< 0,001
Жировая масса тела, кг	12	[9; 17]	14	[11; ~23]	< 0,001

группы. Школьники и студенты, эффективно освоившие программу гигиенического воспитания, в среднем менее продолжительно использовали смартфон в течение дня и имели лучшие показатели физического развития (см. табл.).

Так, средняя жировая масса тела у них составила 12 кг, в то время как у учащихся, неэффективно освоивших программу гигиенического воспитания, — 14 кг ($p \leq 0,001$). При сравнении групп по наличию избытка массы тела были получены достоверные результаты ($p \leq 0,004$), и шансы развития избытка массы тела у учащихся, гигиеническое воспитание которых оказалось не эффективным или не проводилось, были в 2,44 выше (ОШ — 0,41; 95% ДИ: 0,23–0,73), относительный риск составил 2,01 (95% ДИ: 1,29–3,21).

В двухлетней динамике профилактической работы на базе «Долгопрудненской гимназии» удалось добиться увеличения числа старших школьников с нормальным уровнем физического развития (возросло до $79,0 \pm 1,7\%$; $p \leq 0,01$) по сравнению с общеобразовательными организациями г. Долгопрудного, где программу гигиенического воспитания не реализовывали, а число старших школьников с нормальным физическим развитием продолжало оставаться на невысоком уровне ($61,0 \pm 1,5\%$) (см. рис.).

Только 25% учащихся старших классов из «Долгопрудненской гимназии» имели показатели динамометрии ниже среднего, в то время как среди старших школьников из других общеобразовательных организаций этот показатель зафиксирован в 45% случаев ($p \leq 0,05$), что может свидетельствовать о большем дефиците двигательной активности у них.

По итогам анкетирования школьников и студентов, проведенного после завершения программы гигиенического воспитания, было установлено снижение числа жалоб учащихся со стороны органа зрения, снижение доли школьников и студентов, не имеющих навыков безопасного использования электронных устройств до 20 и 25% соответственно.

Кроме того, в рамках практических занятий по гигиене преподавателями осуществлялось формирование общекультурных компетенций у студентов-медиков с использованием элементов деловой игры, веб-квестов, в результате чего у студентов повысилась мотивация не только к соблюдению ЗОЖ, но и к изучению предмета. Некоторые студенты стали позиционировать себя как «блогеры в сфере рационального питания», «блогеры в сфере здоровья», «блогеры в сфере безопасного использования ЭУ» и др., более активно стали размещать информацию по вопросам ЗОЖ на своих страницах в блогах и социальных сетях, что является для будущих врачей положительным опытом пропагандисткой деятельности по ЗОЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современная система образования представляет собой «зону риска», обусловленную интенсификацией образовательного процесса, что сопровождается умственными нагрузками, снижением двигательной активности, дефицитом ночного сна, нарушениями режима труда и отдыха [19–22]. Процесс обучения характеризуется динамичностью, высокой интенсивностью труда, разнообразием форм и методов обучения, возрастанием объема информации, внедрением ЭУ и связанных с ними учебных технологий, что требует напряжения адаптационных резервов организма детей, подростков и молодежи [23–29]. Эффективной профилактической мерой в этих условиях должно стать формирование ЗОЖ, в том числе формирование навыков безопасного использования ЭУ [12, 13, 15]. Повышение информированности в вопросах безопасного использования ЭУ и связанных с ними принципов ЗОЖ, овладение навыками их практической реализации должно стать основой безопасного поведения участников образовательного процесса (педагогов, медицинских работников, учащихся) в условиях цифровой образовательной среды [30].

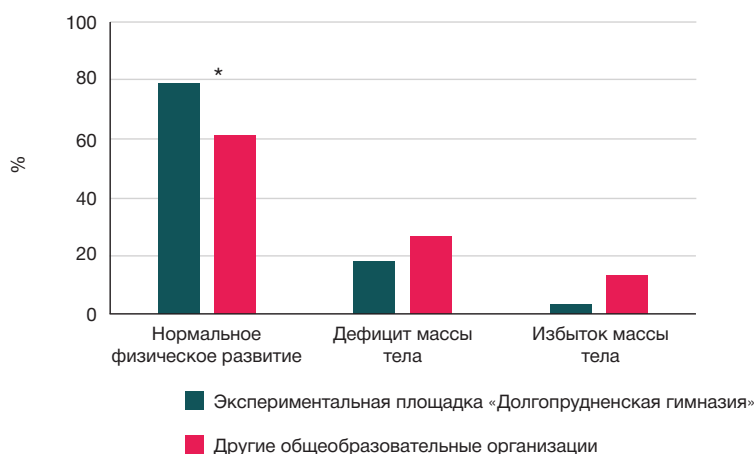


Рис. Распределение старших школьников из «Долгопрудненской гимназии» и других общеобразовательных организаций г. Долгопрудного по уровню физического развития ($p < 0,05$)

Исследование показало, что наиболее распространенным источником информации о сохранении здоровья для всех категорий респондентов является Интернет. В качестве «источников» информации по вопросам ЗОЖ две трети студентов назвали преподавателей, более половины школьников — родителей, что необходимо учитывать родителям школьников и преподавательскому составу образовательных учреждений при формировании общекультурных компетенций у молодежи, а также обуславливает необходимость информирования взрослых в этой области знаний и формирования у них навыков ведения ЗОЖ как в профессиональной деятельности, так и в быту [15, 30]. В связи с развитием цифровой образовательной среды целесообразно совершенствование подготовки педагогов по вопросам безопасного использования ЭУ и принципов ЗОЖ [2, 15].

Проведенные ранее исследования свидетельствуют об отсутствии навыков безопасного использования ЭУ среди более чем трети родителей (35%) и учителей (40%). При этом аналогичная «группа риска» среди студентов-медиков составила 40%, среди школьников — 35% [15].

По итогам проведенной работы были выделены основные вопросы, требующие включения в программу гигиенического воспитания школьников и студентов в части формирования навыков безопасного использования электронных устройств:

- соблюдение режима труда и отдыха, рациональная организация ночного сна и двигательной активности;
- сокращение времени использования ЭУ до 3 ч в день, проведение перерывов через каждые 40 мин — 1 ч работы с ЭУ;
- обучение приемам гимнастики для глаз и упражнениям для снятия общего утомления;
- использование мобильных приложений для мониторинга времени использования ЭУ, двигательной активности и других параметров;
- участие в социальных сетях, поддерживаемых медицинскими организациями и содержащими корректную информацию по вопросам сохранения здоровья и ЗОЖ;
- повышение мотивации к участию в программах по гигиеническому воспитанию с помощью использования инновационных, популярных среди молодежи элементов работы, стимулирование у студентов-медиков интереса к «блоггерству» в сфере здоровья;

– вовлечение в пропаганду ЗОЖ ближайшего окружения школьников и студентов (родители, учителя, преподаватели).

Полученные сведения являются основанием рекомендовать апробированную практику для целей гигиенического воспитания подрастающего поколения, их родителей и специалистов, в профессиональные компетенции которых входит формирование у молодежи знаний, умений и навыков безопасного использования ЭУ, привитие ей основ ЗОЖ.

ВЫВОДЫ

Показана эффективность проведения гигиенического воспитания среди школьников и студентов-медиков с целью формирования навыка безопасного использования электронных устройств с применением традиционных и инновационных методов. Для повышения эффективности гигиенического воспитания необходимо вести параллельную работу по пропаганде ЗОЖ среди учителей и родителей, которых дети, подростки и молодежь воспринимают как носителей информации по данному вопросу. Пропаганду ЗОЖ необходимо включать в преподавание профилактических дисциплин, например гигиены для студентов лечебного и педиатрического факультета, поскольку в своей дальнейшей профессиональной деятельности они станут «источниками» информации о ЗОЖ для подрастающего поколения и пациентов. Различные категории населения настоятельно рекомендуется обучать приемам мониторинга параметров, связанных с двигательной активностью, сном, контролем экранного времени и др., для чего можно использовать мобильные приложения на индивидуальных смартфонах. В качестве критерия оценки эффективности освоения программы гигиенического воспитания предложено использовать уровень информированности участников программы о факторах риска бесконтрольного использования ЭУ, а также наличие у них навыков безопасного использования ЭУ, выявление которых возможно проводить посредством анкетирования слушателей перед и после прохождения курса гигиенического воспитания. Апробированные практики не являются финансово затратными и могут быть тиражированы в других регионах и организациях.

Литература

1. Паспорт приоритетного проекта «Формирование здорового образа жизни», утвержденного президиумом Совета при Президенте Российской Федерации по стратегическому развитию и приоритетным проектам (протокол от 26 июля 2017 г. № 8). Доступно по ссылке: <http://government.ru/news/28745/>.
2. Соколова Н. В., Попов В. И., Картышева С. И., Королева А. О. Некоторые аспекты профилактической деятельности учителя, направленной на улучшение состояния здоровья школьников. Гигиена и санитария. 2014; 93 (1): 90–91.
3. Каприн А. Д., Александрова Л. М., Старинский В. В. Медико-социальные аспекты формирования в России концепции здорового образа жизни. Российский медицинский журнал. 2017; 25 (14): 995–9.
4. Крылов В. М., Крылова А. В., Пономарева Т. А. Особенности здоровьесберегающего поведения студентов. Казанский социально-гуманитарный вестник. 2019; 6 (41): 28–32.
5. Федюнин В. А., Неймышев А. В. Формирование готовности вести здоровый образ жизни у обучающихся. Современный ученый. 2020; (4): 64–68.
6. Большаков А. М., Крутько В. Н., Кутепов Е. Н. и др. Информационные нагрузки как новый актуальный раздел гигиены детей и подростков. Гигиена и санитария. 2016; 2: 172–7.
7. Кучма В. Р. Гигиеническая безопасность гиперинформатизации жизнедеятельности детей. Гигиена и санитария. 2017; 96 (11): 1059–63. DOI: 10.18821/0016-9900-2017-96-11-1059-1063.
8. Попов М. В., Либина И. И., Мелихова Е. П. Оценка влияния гаджетов на психоэмоциональное состояние студентов. Молодежный инновационный вестник. 2019; 8 (2): 676–8.
9. Милушкина О. Ю., Попов В. И., Скоблина Н. А., Маркелова С. В., Соколова Н. В. Использование электронных устройств участниками образовательного процесса при традиционной и дистанционной формах обучения. Вестник Российского

- государственного медицинского университета. 2020; 3: 85–91.
10. Милушкина О. Ю., Скоблина Н. А., Маркелова С. В., Татаринчик А. А., Мелихова Е. П., Либи́на И. И. и др. Влияние электронных устройств на физическое развитие современной молодежи и рекомендации по регламенту их использования. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2019; 4: 83–89.
 11. Скоблина Н. А., Шлаков А., Милушкина О. Ю., Маркелова С. В., Кузнецова А., Татаринчик А. А. Риски для здоровья глаз, связанные с использованием электронных устройств, и осведомленность молодежи. *Klinika Oczna / Acta Ophthalmologica Polonica*. 2020; 122 (2): 60–65. DOI: 10.5114/ko.2020.96492.
 12. Дорофеев С. Б., Бабенко А. И. Национальные стратегии формирования здорового образа жизни населения. Здравоохранение Российской Федерации. 2015; 59 (6): 44–47.
 13. Цыбусов А. П., Атнайкина О. В., Уткина Л. И. Формирование и управление здоровьесберегающим поведением россиян — актуальная и неотложная государственная задача. Медицинский альманах. 2017; 2 (47): 10–13.
 14. Шальнова С. А., Баланова Ю. А., Деев А. Д., Концевая А. В., Имаева А. Э., Капустина А. В. и др. Интегральная оценка приверженности здоровому образу жизни как способ мониторинга эффективности профилактических мер. Профилактическая медицина. 2018; 21 (4): 65–72.
 15. Маркелова С. В. Роль родителей, учителей, медицинских работников в формировании знаний, умений и навыков безопасного использования электронных устройств старшими школьниками. Здоровье населения и среда обитания. 2020; 8 (329): 50–57.
 16. Кучма В. Р., Седова А. С., Степанова М. И., Рапопорт И. К., Поленова М. А., Соколова С. Б. и др. Особенности жизнедеятельности и самочувствия детей и подростков, дистанционно обучающихся во время эпидемии новой коронавирусной инфекции COVID-19. Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья. 2020; 2: 4–19.
 17. Баранов А. А., Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Рапопорт И. К., Павлович К. Э. и др. Проведение мониторинга состояния здоровья детей и подростков и организация их оздоровления. Методические рекомендации. М.: НЦЗД, 2006; 47 с.
 18. Пивоваров Ю. П., Скоблина Н. А., Милушкина О. Ю., Маркелова С. В., Федотов Д. М., Окольников Ф. Б. и др. Использование интернет-опросов в оценке осведомленности об основах здорового образа жизни. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2020; 2: 398–413.
 19. Кучма В. Р., Сухарева Л. М., Степанова М. И., Храмов П. И., Александрова И. Э., Соколова С. Б. Научные основы и технологии обеспечения гигиенической безопасности детей в «Цифровой школе». Гигиена и санитария. 2019; 98 (12): 1385–91.
 20. Поленова М. А. Информационно-образовательные нагрузки как фактор риска здоровью школьников. Здоровье населения и среда обитания. 2015; 10: 20–22.
 21. Храмов П. И. Физиолого-гигиенические предпосылки повышения здоровьесберегающей эффективности физического воспитания детей в образовательных организациях. Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья. 2017; (4): 15–20.
 22. Лукьянец Г. Н., Макарова Л. В., Параничева Т. М., Тюрина Е. В., Шибалова М. С. Влияние гаджетов на развитие детей. Новые исследования. 2019; 1 (57): 25–35.
 23. Кучма В. Р., Ткачук Е. А. Оценка влияния на детей информатизации обучения и воспитания в современных условиях. Российский педиатрический журнал. 2015; 6: 20–24.
 24. Солдатова Г. У., Рассказова Е. И. «Оборотная сторона» цифровой компетентности российских подростков: иллюзия компетентности и рискованное поведение онлайн. Вопросы психологии. 2017; 3: 3–15.
 25. Степанова М. И. Гигиеническая безопасность цифровой образовательной среды для детей и подростков. Педагогика. 2018; (12): 38–46.
 26. Laks M, Guerra CM, Miraglia JL, Medeiros EA. Distance Learning in Antimicrobial Stewardship: Innovation in Medical Education. PMID: 31174524; PMCID: PMC6555969; DOI: 10.1186/s12909-019-1623-x.
 27. Maria B, Oleksandr K, Valentina E, Olena Y Distance-pedagogical technologies in olympic education for schoolchildren Journal of Physical Education and Sport. Journal of Physical Education and Sport. 2019; 378 (4): 2497–503. Ukraine.
 28. Ушаков И. Б., Попов В. И., Петрова Т. Н., и др. Изучение здоровья студентов как результат взаимодействия медико-биологических, экологических и социально-гигиенических факторов риска. Медицина труда и промышленная экология. 2017; 4: 33–36.
 29. Кучма В. Р., Рапопорт И. К., Соколова С. Б., Александрова И. Э., Макарова А. Ю., Мустафаева К. Ш. и др. Распространенность и оценка использования электронных устройств в учебной и досуговой деятельности школьников 7–8 классов. Сеченовский вестник. 2015; 3 (21): 43–50.
 30. Липанова Л. Л., Насыбуллина Г. М., Хачатурова Н. Л., Гончарова А. С. Подготовка медицинских и педагогических кадров для осуществления гигиенического обучения и воспитания детей. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2018; 15 (3): 503–10.

References

1. Pasport prioritetnogo proekta "Formirovanie zdorovogo obraza zhizni", utverzhdennoho prezidiumom Soveta pri Prezidente Rossijskoj Federacii po strategicheskomu razvitiyu i prioritetnym proektam (protokol ot 26 iulja 2017 g. №8). Dostupno po ssylke: <http://government.ru/news/28745/>. Russian.
2. Sokolova NV, Popov VI, Kartysheva SI, Koroleva AO. Nekotorye aspekty profilakticheskoy dejatel'nosti uchitelja, napravlennoj na uluchshenie sostojanija zdorov'ja shkol'nikov. *Gigiena i sanitarija*. 2014; 93 (1): 90–91. Russian.
3. Kaprin AD, Aleksandrova LM, Starinskij VV. Mediko-social'nye aspekty formirovanija v Rossii koncepcii zdorovogo obraza zhizni. *Rossijskij medicinskij zhurnal*. 2017; 25 (14): 995–9. Russian.
4. Krylov VM, Krylova AV, Ponomareva TA. Osobennosti zdorov'esberegajushhego povedenija studentov. *Kazanskij social'no-gumanitarnyj vestnik*. 2019; 6 (41): 28–32. Russian.
5. Fedjunin VA, Nejmyshev AV. Formirovanie gotovnosti vesti zdorovij obraz zhizni u obuchajushchihhsja. *Sovremennij uchenyj*. 2020; (4): 64–68. Russian.
6. Bolshakov AM, Krutko VN, Kutepov EN, i dr. Informacionnye nagruzki kak novyj aktual'nyj razdel gigeny detej i podrostkov. *Gigiena i sanitarija*. 2016; (2): 172–7. Russian.
7. Kuchma VR. Gigienicheskaja 'bezopasnost' giperinformatizacii zhiznedejatel'nosti detej. *Gigiena i sanitarija*. 2017; 96 (11): 1059–63. DOI: 10.18821/0016-9900-2017-96-11-1059-1063. Russian.
8. Popov MV, Libina II, Melihova EP. Ocenka vlijanija gadzhetov na psihoemocional'noe sostojanie studentov. *Molodezhnyj innovacionnyj vestnik*. 2019; 8 (2): 676–8. Russian.
9. Milushkina OYu, Popov VI, Skoblina NA, Markelova SV, Sokolova NV. The use of electronic devices by students, parents and teachers before and after the transition to distance learning. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020; 3: 85–91. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.037.
10. Milushkina OYu, Skoblina NA, Markelova SV, Tatarinchik AA, Melikhova E, Libina II, et al. The impact of electronic devices on the physical growth and development of the modern youth and recommendations on their safe use. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2019; 4: 83–89.
11. Skoblina NA, Shpakou A, Milushkina O, Markelova SV, Kuzniatsou A, Tatarinchik AA. Eye health risks associated with the use of electronic devices and awareness of youth. *Klinika Oczna / Acta Ophthalmologica Polonica*. 2020; 122 (2): 60–65. DOI:10.5114/ko.2020.96492.

12. Dorofeev SB, Babenko AI. Nacional'nye strategii formirovaniya zdorovogo obraza zhizni naselenija. Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii. 2015; 59 (6): 44–47. Russian.
13. Cybusov AP, Atmajkina OV, Utkina LI. Formirovanie i upravlenie zdorov'esohranjajushhim povedeniem rossijan — aktual'naja i neotlozhnaja gosudarstvennaja zadacha. Medicinskij al'manah. 2017; 2 (47): 10–13. Russian.
14. Shalnova SA, Balanova YuA, Deev AD, Koncevaja AV, Imaeva AY, Kapustina AV, i dr. Integral'naja ocenka priverzhennosti zdorovomu obrazu zhizni kak sposob monitoringa jeffektivnosti profilakticheskikh mer. Profilakticheskaya meditsina. 2018; 21 (4): 65–72. Russian.
15. Markelova SV. The role of printed and electronic publications in development of vision disorders. Fundamental and Clinical Medicine. 2020; 8 (329): 50–57.
16. Kuchma VR, Sedova AS, Stepanova MI, Rapoport IK, Polenova MA, Sokolova SB, i dr. Osobennosti zhiznedejatel'nosti i samochuvstviya detej i podrostkov, distancionno obuchajushhihsja vo vremja jepidemii novoj koronavirusnoj infekcii COVID-19. Voprosy shkol'noj i universitetskoj mediciny i zdorov'ja. 2020; 2: 4–19. Russian.
17. Baranov AA, Kuchma VR, Suhareva LM, Rapoport IK, Pavlovich KYe, i dr. Provedenie monitoringa sostojaniya zdorov'ja detej i podrostkov i organizacija ih ozdorovlenija. Metodicheskie rekomendacii. M.: NCZD, 2006; 47 c. Russian.
18. Pivovarov YuP, Skoblina NA, Milushkina OYu, Markelova SV, Fedotov DM, Okolnikov FB, et al. Use of internet surveys in the assessment of awareness of the basics of a healthy lifestyle. Current problems of health care and medical statistics. 2020; (2): 398–413.
19. Kuchma VR, Suhareva LM, Stepanova MI, Hramcov PI, Aleksandrova IYe, Sokolova SB. Nauchnye osnovy i tehnologii obespechenija gigienicheskoi bezopasnosti detej v «Cifrovoj shkole». Gigiena i sanitarija. 2019; 98 (12): 1385–91. Russian.
20. Polenova MA. Informacionno-obrazovatel'nye nagruzki kak faktor riska zdorov'ju shkol'nikov. Zdorov'e naselenija i sreda obitaniya. 2015; 10: 20–22 Russian.
21. Hramcov PI. Fiziologo-gigienicheskie predposylki povyshenija zdorov'esberegajushhej jeffektivnosti fizicheskogo vospitaniya detej v obrazovatel'nyh organizacijah. Voprosy shkol'noj i universitetskoj mediciny i zdorov'ja. 2017; 4: 15–20. Russian.
22. Lukjanec GN, Makarova LV, Paranicheva TM, Tjurina EV, Shibalova MS. Vlijanie gadzhetov na razvitie detej. Novye issledovaniya. 2019; 1 (57): 25–35. Russian.
23. Kuchma VR, Tkachuk EA. Ocenka vlijaniya na detej informatizacii obuchenija i vospitaniya v sovremennyh uslovijah. Rossijskij pediatričeskij zhurnal. 2015; 6: 20–24. Russian.
24. Soldatova GU, Rasskazova EI. «Oborotnaja storona» cifrovoj kompetentnosti rossijskikh podrostkov: illuzija kompetentnosti i riskovannoe povedenie onlajn. Voprosy Psychologi. 2017; 3: 3–15. Russian.
25. Stepanova MI. Gigienicheskaja bezopasnost' cifrovoj obrazovatel'noj sredy dlja detej i podrostkov. Pedagogika. 2018; 12: 38–46. Russian.
26. Laks M, Guerra CM, Miraglia JL, Medeiros EA. Distance Learning in Antimicrobial Stewardship: Innovation in Medical Education. PMID: 31174524; PMCID: PMC6555969; DOI: 10.1186/s12909-019-1623-x.
27. Maria B, Oleksandr K, Valentina E, Olena Y. Distance-pedagogical technologies in olympic education for schoolchildren. Journal of Physical Education and Sport. 2019; 378 (4): 2497–503. Ukraine.
28. Ushakov IB, Popov VI, Petrova TN, i dr. Izuchenie zdorov'ja studentov kak rezul'tat vzaimodejstviya mediko-biologicheskikh, jekologicheskikh i social'no-gigienicheskikh faktorov riska. Medicina truda i promyshlennaja jekologija. 2017; (4): 33–36. Russian.
29. Kuchma VR, Rapoport IK, Sokolova SB, Aleksandrova IJe, Makarova AJu, Mustafaeva KSh, i dr. Rasprostranennost' i ocenka ispol'zovanija jelektronnyh ustrojstv v uchebnoj i dosugovoj dejatel'nosti shkol'nikov 7–8 klassov. Sechenovskij vestnik. 2015; 3 (21): 43–50. Russian.
30. Lipanova LL, Nasybullina GM, Hachaturova NL, Goncharova AS. Podgotovka medicinskih i pedagogicheskikh kadrov dlja osushhestvlenija gigienicheskogo obuchenija i vospitaniya detej. Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoi nauki. 2018; 15 (3): 503–10. Russian.