

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 2020: 0,4

Журнал включен в WoS. JCR 2020: 0,4

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

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Журнал включен в РИНЦ. IF 2018: 0,5

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.2021-01

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 28.02.2021
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)
Kzyshkowska 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 2020: 0.4

Scopus®

Indexed in WoS. JCR 2020: 0.4

WEB OF SCIENCE™

Five-year h-index is 6

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2018: 0.5

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.2021-01

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 28.02.2021
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
Особенности течения сочетанной инфекции ВИЧ/SARS-CoV-2 в условиях пандемии А. Ф. Олейник, Ч. Г. Реватхи, В. Х. Фазылов The features of HIV and SARS-CoV-2 coinfection in a pandemic Oleynik AF, Revathy CG, Fazylov VH	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	14
Важность определения N-антигена вируса SARS-CoV-2 для лечения пневмонии COVID-19 в условиях стационара Ю. С. Лебедин, О. В. Лянг, А. Г. Галстян, А. В. Пантелеева, В. В. Белоусов, Д. В. Ребриков The importance of determining SARS-CoV-2 N-Ag serodiagnostics for the management of COVID-19 pneumonia in hospital settings Lebedin YuS, Lyang OV, Galstyan AG, Panteleeva AV, Belousov VV, Rebrikov DV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	20
Ассоциация полиморфных вариантов гена каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы с клиническими характеристиками ишемического инсульта Ю. А. Бочарова Associations between glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene polymorphisms and clinical characteristics of ischemic stroke Bocharova YA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	26
Характеристика <i>BRCA</i> -ассоциированного рака молочной железы в российской популяции Е. И. Новикова, Е. А. Кудинова, В. К. Боженко, В. А. Солодкий Characteristics of <i>BRCA</i> -associated breast cancer in the population of the Russian Federation Novikova EI, Kudinova EA, Bozhenko VK, Solodkiy VA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	33
Анализ частот 13 полиморфизмов в генах <i>TP53</i> и <i>WRAP53</i> в российских популяциях М. В. Олькова, В. С. Петрушенко, Г. Ю. Пономарев Analysis of 13 <i>TP53</i> and <i>WRAP53</i> polymorphism frequencies in Russian populations Olkova MV, Petrushenko VS, Ponomarev GYu	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	43
Морфофункциональные особенности соединительнотканного рубца на коже у повторнородящих женщин после оперативного родоразрешения Е. С. Мишина, М. А. Затолокина, М. В. Мнихович, В. В. Харченко Morphofunctional characteristics of cutaneous connective tissue scars in women with past history of childbirth after cesarian delivery Mishina ES, Zatolokina MA, Mnikhovich MV, Kharchenko VV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	48
Элементный состав крови пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий А. Г. Сыркашева, В. Е. Франкевич, Н. В. Долгушина Elemental composition of blood of infertile patients participating in assisted reproduction programs Syrkasheva AG, Frankevich VE, Dolgushina NV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	54
Глазодвигательные реакции при восприятии изображений младшими школьниками с легкой степенью умственной отсталости В. Б. Никишина, О. Ф. Природова, Е. А. Петраш, И. А. Севрюкова Oculomotor response to images in primary school children with mild intellectual disability Nikishina VB, Prirodova OF, Petrash EA, Sevrukova IA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	64
Маркеры ремоделирования костной ткани при консолидации изолированного перелома бедренной кости в условиях системной озонотерапии М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов Bone turnover markers in patients with isolated femoral shaft fracture undergoing systemic ozone therapy Osikov MV, Davidova EV, Abramov KS	

Совершенствование неинвазивных методов диагностики предраковых и злокачественных заболеваний слизистой оболочки рта на приеме у стоматолога

М. А. Постников, А. Г. Габриелян, Д. А. Трунин, О. И. Каганов, В. П. Кириллова, А. М. Хамадеева, О. В. Осокин, И. С. Копецкий, Д. А. Еремин

Refinement of noninvasive methods for diagnosing precancer and cancer of oral mucosa in general dental practice

Postnikov MA, Gabrielyan AG, Trunin DA, Kaganov OI, Kirillova VP, Khamadeeva AM, Osokin OV, Kopetskiy IS, Eremin DA

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ СОЧЕТАННОЙ ИНФЕКЦИИ ВИЧ/SARS-COV-2 В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

А. Ф. Олейник^{1,2}✉, Ч. Г. Реватхи², В. Х. Фазылов^{1,3}¹ Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Казань, Россия² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия³ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Известно, что некоторые группы пациентов тяжело переносят COVID-19. В обзоре представлены последние данные об особенностях течения COVID-19 у пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Установлено, что у людей с ВИЧ, находящихся на непрерывной антиретровирусной терапии (АРВТ), имеющих подавленную вирусную нагрузку и число CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл, риск заражения и течение COVID-19 сопоставимы с таковыми в общей популяции. Пациенты с ВИЧ-инфекцией демонстрируют меньшую частоту госпитализаций, чем ожидалось, что предположительно может быть связано с бессимптомным течением COVID-19 на фоне слабого иммунного ответа у этих больных. Кроме того, сравнительно легкое течение заболевания у пациентов с коинфекцией, вызванной ВИЧ/SARS-CoV-2, может быть связано с применением АРВТ. Несмотря на отсутствие протективного действия АРВТ в отношении заражения вирусом SARS-CoV-2, исследователи предполагают, что АРВТ может стабилизировать иммунный ответ у коинфицированных пациентов, что препятствует прогрессированию заболевания до тяжелых форм.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, ВИЧ, вирус иммунодефицита человека, антиретровирусная терапия, ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекция, лица живущие с ВИЧ, ЛЖВ

Вклад авторов: А. Ф. Олейник, Ч. Г. Реватхи — обзор литературы, подготовка рукописи; В. Х. Фазылов — подготовка рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Альфия Фаридовна Олейник
ул. Гвардейская, д. 31/42-42, г. Казань, 420073; alfiyaoleinik@yandex.ru

Статья получена: 19.12.2020 **Статья принята к печати:** 26.01.2021 **Опубликована онлайн:** 08.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.004

THE FEATURES OF HIV AND SARS-COV-2-COINFECTION IN A PANDEMIC

Oleynik AF^{1,2}✉, Revathy CG², Fazyllov VH^{1,3}¹ Republic Center for AIDS and Infectious Diseases Prevention and Control, Kazan, Russia² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

COVID-19 is known to undertake a severe course in several groups of patients. The review presents the latest data on the main features of COVID-19 course in HIV patients. People living with HIV, have not been found to be at a higher risk for acquiring COVID-19 and the disease runs a similar course compared to the general population in HIV patients on continuous antiretroviral therapy (ART) with a suppressed viral load and CD4⁺-T-lymphocytes count > 200cells/μl. Fewer than expected HIV patients have been reported to be hospitalised, this leads to hypothesize that infection may be majorly asymptomatic in this group of patients owing to their weak immune response. The patient's use of ART might also explain the comparatively milder disease course of COVID-19 seen in patients with HIV/SARS-CoV-2 coinfection. While ART use cannot be considered to be a protective factor against contracting the SARS-CoV-2, researchers assume that the therapy could stabilize the immune response in coinfecting patients and thus prevent progression of the disease to the severe forms.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, HIV, human immunodeficiency virus, antiretroviral therapy, HIV/SARS-CoV-2-coinfection, PLHIV

Author contribution: Oleynik AF, Revathy Govindarajan C — literature review, manuscript authoring; Fazyllov VH — manuscript authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alfiya F. Oleynik
Gvardeyskaya, 31/42-42, Kazan, 420073; alfiyaoleinik@yandex.ru

Received: 19.12.2020 **Accepted:** 26.01.2021 **Published online:** 08.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.004

Пандемия коронавирусной инфекции, объявленная Всемирной организацией здравоохранения в 2020 г., играет центральную роль в дестабилизации систем здравоохранения во всем мире, что связано с быстрым распространением инфекции и способностью вызывать неблагоприятные исходы. Несмотря на определение групп высокого риска заражения вирусом SARS-CoV-2, беременные, дети и хронические больные остаются группами с «неясной» уязвимостью, как в социальном, так и клиническом плане, что вызывает беспокойство у медицинского сообщества. Пациенты с ВИЧ-инфекцией представляют среди них отдельную категорию из-за иммунодефицитного характера заболевания и особенности лечения. Более того, большинство ВИЧ-инфицированных пациентов испытывают трудности с доступом к медицинской помощи во многих частях мира, и соблюдение лечебного протокола может стать затруднительным из-за коинфекции с SARS-CoV-2. Уже

известно, что проявления коронавирусной инфекции (CoV) у ВИЧ-инфицированных пациентов в основном ограничивались кишечными проявлениями, такими как диарея, и редко приводили к тяжелым респираторным симптомам [1]. Во время вспышки атипичной пневмонии в 2003 г. было зафиксировано всего несколько случаев заболевания у ВИЧ-инфицированных, все из которых протекали в легкой форме [2]. Ближневосточный респираторный синдром, вызванный MERS-CoV в 2012 г. и демонстрировавший наиболее тяжелое течение и высокую смертность, не оказал значительного воздействия на людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ): описано выздоровление пациента в зарегистрированном случае заболевания [3]. Мимолетный характер вышеупомянутых вспышек не позволил провести широкомасштабные исследования в отношении перспектив использования антиретровирусной терапии (АРВТ) против коронавируса. Таким образом, важно прояснить все возможные аспекты

коинфекции двумя потенциально опасными вирусами, их силу, взаимодействие, влияние APBT и другие вопросы.

Ключевые особенности COVID-19 и ВИЧ-инфекции

Случаи COVID-19 (от *англ.* Coronavirus Disease 2019) впервые были зарегистрированы в декабре 2019 г. в Ухане (провинция Хубэй, Китай). Инфекционный агент, идентифицированный как новый РНК-содержащий бета-коронавирус с оболочкой, получивший название коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), вызвал более 93 млн случаев заболевания по всему миру по состоянию на январь 2021 г. Несмотря на высокую восприимчивость, риск тяжелого течения COVID-19 увеличивается с возрастом, оставаясь наивысшим у лиц старше 65 лет. Исследования показали, что мужчины могут быть более восприимчивы к инфекции, чем женщины, а частота заражения детей ниже, чем взрослых [4]. Показано, что сопутствующие заболевания, включая артериальную гипертензию, сахарный диабет, хроническую обструктивную болезнь легких, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания, повышают риск заражения и осложнений COVID-19 [5, 6].

Основные пути передачи заболевания от человека к человеку — воздушно-капельный и контактный при переносе вируса с загрязненной поверхности на слизистую оболочку хозяина. У 70% больных COVID-19 протекает бес- или малосимптомно, в то время как 30% пациентов демонстрируют лихорадку и респираторный синдром вплоть до тяжелой дыхательной недостаточности, требующей интенсивной терапии [7]. Нередки сердечно-сосудистые, неврологические и желудочно-кишечные проявления заболевания. Наиболее широко используемый метод диагностики ПЦР (полимеразная цепная реакция) основан на обнаружении нуклеиновой кислоты вируса SARS-CoV-2. Серологические методы применяют для обнаружения антител к SARS-CoV-2 в плазме и цельной крови [7]. Разработанный недавно Т-клеточный тест T-Detect Assay позволяет с большей точностью идентифицировать перенесенную инфекцию по сравнению с детекцией антител, поэтому может служить чувствительным и надежным методом диагностики перенесенной инфекции, подтверждая особую роль Т-клеток в формировании иммунитета к SARS-CoV-2 [8].

Лечение COVID-19 сводится в основном к поддерживающей и симптоматической терапии, профилактике последующей передачи инфекции. В качестве противовирусных средств рассматривают ремдесивир, фавипиравир ввиду их способности подавлять SARS-CoV-2, вызывать клиническое улучшение и сокращать период восстановления [9, 10]. Кроме того, основываясь на предыдущем опыте с SARS и MERS, а также результатах *in vitro*, были использованы такие препараты, как рибавирин, интерферон, хлорохин/гидроксихлорохин, лопинавир-ритонавир, и последний, по-видимому, дает несколько лучшие результаты, чем первый [11]. В тяжелых случаях рекомендуется применение кортикостероидов [12].

ВИЧ, передающийся во время незащищенного полового контакта, через кровь при использовании общего нестерильного инструментария и переливании зараженных продуктов крови, при рождении ребенка ВИЧ-инфицированной матерью, стал причиной миллионов смертей во всем мире и продолжает распространяться среди населения и в настоящее время. После проникновения в организм ВИЧ реплицируется в

активированных Т-клетках, мигрирует в лимфатические узлы, что приводит к снижению общего количества CD4⁺-Т-клеток и инверсии соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток. Это ослабляет иммунный ответ, делая хозяина восприимчивым к различным оппортунистическим заболеваниям, преимущественно вирусным и к микозам. APBT подавляет вирусную нагрузку, что приводит к снижению риска передачи ВИЧ, восстановлению иммунной системы, препятствует тем самым возникновению вторичных заболеваний, увеличивая продолжительность и качество жизни ВИЧ-инфицированных.

Коинфекция, вызванная ВИЧ/SARS-CoV-2, представляет собой комбинацию двух отдельных заболеваний, как в клиническом, так и диагностическом плане, поэтому рассмотрение особенностей этих заболеваний имеет решающее значение для понимания их взаимодействия. Клиническая картина заболевания и протокол лечения этой группы пациентов могут отличаться от таковых в общей популяции, в связи с чем тщательное изучение случаев заболевания в этой группе больных может дать нам ценную информацию о «поведении» вирусов в пределах одного и того же хозяина, нюансах прогрессирования заболевания, эффективных стратегиях лечения.

Течение и исходы COVID-19 у пациентов с ВИЧ-инфекцией: описание случаев и обсуждение

До настоящего времени число ЛЖВ, инфицированных SARS-CoV-2, оставалось невысоким. Однако этот факт следует интерпретировать с осторожностью, поскольку он не гарантирует, что ВИЧ-положительные люди меньше заражаются, это может просто означать, что пациенты с ВИЧ-инфекцией предпринимают более серьезные меры предосторожности для ограничения воздействия SARS-CoV-2 [13].

Один из первых случаев коинфекции, вызванной ВИЧ и SARS-CoV-2, был зарегистрирован в Ухане у 61-летнего мужчины с многолетним «стажем» курения с диабетом 2-го типа, проявившимся продолжительным сухим кашлем и лихорадкой. Легкая лимфопения, диагностированная в анализе крови вначале, прогрессировала до тяжелой степени с числом лимфоцитов $0,56 \times 10^9/\text{л}$ и относительным значением CD4⁺-Т-лимфоцитов 4,75%. Лечение включало прием лопинавира/ритонавира при поступлении, моксифлоксацина, гамма-глобулина и метилпреднизолона. Выздоровление и выписка — через 20 дней после первого обращения в клинику [14].

Популяционное исследование, проведенное в Ухане среди ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфицированных, продемонстрировало отсутствие разницы по тяжести заболевания и летальности COVID-19 в группе ВИЧ-инфицированных и общей популяции. Сообщается, что частота COVID-19 среди ЛЖВ на APBT составляет 0,52%, 2,20% — среди ЛЖВ, прекративших APBT, и 0,63% — среди ЛЖВ, никогда не принимавших APBT [15].

На основании немногочисленных текущих результатов исследований коинфекции, вызванной ВИЧ/SARS-CoV-2 (см. табл.), международное медицинское сообщество пришло к выводу, что ВИЧ-инфекция не является независимым фактором риска заражения и тяжелого течения COVID-19 [16]. ЛЖВ, получающие APBT, с подавленной вирусной нагрузкой ВИЧ и числом CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл, демонстрируют сопоставимое с общей популяцией течение COVID-19 [13, 17–19]. При этом тяжесть заболевания у коинфицированных, как

Таблица. Исследования по оценке влияния ВИЧ-инфекции на течение COVID-19

Авторы	Год	Регион	Число пациентов	Дизайн	Основные результаты
Shalev N et al.	2020	США	31	Поперечное	Сопоставимые с общей популяцией течение и исход COVID-19 у ЛЖВ на АРБТ с CD4 более 200
Gudipati S et al.	2020	США	14	Поперечное	Сопоставимые с общей популяцией течение и исход COVID-19 у ЛЖВ
Stoeckle K et al.	2020	США	120	Продольное	Сопоставимые с общей популяцией течение и исход COVID-19 у ЛЖВ
Karmen-Tuohy S et al.	2020	США	63	Продольное	Сопоставимые с общей популяцией течение и исход COVID-19 у ЛЖВ
Inciarte A et al.	2020	Испания	62	Продольное	Сопоставимые с общей популяцией течение и исход COVID-19 у ЛЖВ. Более низкая заболеваемость ЛЖВ, чем в общей популяции
Vizcarra P et al.	2020	Испания	51	Продольное	Риск тяжелого течения COVID-19 у ЛЖВ не ниже, чем в общей популяции
Davies MA	2020	Western Cape Province, Южная Африка	22 308	Продольное	Увеличение вдвое риска смерти ЛЖВ от COVID-19
Huang J et al.	2020	Китай	35	Продольное	Течение и прогноз COVID-19 у ЛЖВ могут быть более неблагоприятными в сравнении с общей популяцией
Suwanwongse K et al.	2020	США	9	Поперечное	ВИЧ-инфекция и низкий иммунный статус могут негативно влиять на исходы COVID-19
Gervasoni C et al.	2020	Италия	47	Поперечное	Снижение риска тяжелого течения и неблагоприятных исходов COVID-19 у ЛЖВ

и у населения в целом, связана с возрастом, полом и наличием сопутствующих заболеваний, таких как диабет и гипертония [18, 19]. Показано, что пациенты с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией часто имеют большее число сопутствующих заболеваний по сравнению с населением в целом [18].

Однако ряд исследователей демонстрируют противоположные результаты. Например, согласно ретроспективному исследованию пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией в клиниках Нью-Йорка, ВИЧ-положительные пациенты чаще нуждались в интенсивной терапии, искусственной вентиляции легких (ИВЛ), чаще умирали или были выписаны в хоспис по сравнению с когортой без ВИЧ-инфекции. Разнообразные патологические рентгенологические данные при поступлении были частым явлением среди ВИЧ-инфицированных. Три пациента с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией, осложнившейся присоединением бактериальной флоры, скончались. При этом все ВИЧ-инфицированные пациенты, кроме одного, получали АРБТ и имели число CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл [20].

Результаты крупного когортного исследования с участием 22 308 пациентов, проведенного в Южной Африке, также свидетельствуют о двукратном увеличении риска смерти пациентов с ВИЧ-инфекцией от COVID-19. Однако автор не исключал эффект конфаундинга, что может ставить результаты под сомнение [21].

Среди факторов, потенциально способных влиять на исход, помимо сопутствующих заболеваний, рассматривают низкий иммунный статус, расу, схему АРБТ. Так, авторы одного из проспективных когортных исследований с участием 51 пациента с контролируемой ВИЧ-инфекцией делают вывод, что неблагоприятный исход (тяжелое течение COVID-19 и смерть), вероятно, связан с числом CD4⁺-Т-лимфоцитов менее 200 клеток/мкл [22].

В публикации серии случаев госпиталя King's College (Великобритания) описаны клинические характеристики 18 ЛЖВ со средним возрастом 52 года, госпитализированных с подтвержденным COVID-19.

Обнаружено, что большинство пациентов принадлежат к негроидной расе с более низким медианным числом CD4⁺-Т-клеток и тенденцией к более широкому использованию ингибиторов протеазы в качестве схемы АРБТ в сравнении с амбулаторными пациентами [23].

По результатам исследования, проведенного в Турции, из 1224 ВИЧ-инфицированных только четыре пациента мужского пола инфицированы SARS-CoV-2, из которых трое не имели сопутствующих заболеваний и полностью выздоровели. Все три пациента получали АРБТ, и у них развилась легкая форма COVID-19. Четвертый, 44-летний пациент, получавший АРБТ, с низкой вирусной нагрузкой ВИЧ и высоким числом CD4⁺-Т-клеток, а также несколькими сопутствующими заболеваниями, умер, что доказывает сходство предикторов неблагоприятного исхода болезни с населением в целом с точки зрения сопутствующих заболеваний [24].

О сходстве в течении COVID-19 у пациентов с контролируемой ВИЧ-инфекцией (о чем свидетельствуют высокий уровень CD4⁺-Т-клеток и низкая вирусная нагрузка) и населения в целом упоминается еще в нескольких исследованиях, авторы которых заключают, что зарегистрированные летальные случаи обусловлены пожилым возрастом и наличием множественных сопутствующих заболеваний [25, 26].

Примечательно, что анализ всей совокупности госпитализаций ЛЖВ с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией свидетельствует, что большинство пациентов длительно находились на АРБТ, имели подавленную или минимальную вирусную нагрузку ВИЧ и число CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл. Лишь небольшое число пациентов не получали АРБТ, имели определяемую вирусную нагрузку ВИЧ, число CD4⁺-Т-клеток менее 200 клеток/мкл, демонстрируя при этом скорое клиническое выздоровление [25].

В результатах исследователей из Испании, описывающих пять случаев коинфекции, представлено интересное наблюдение: пациент без АРБТ и уровнем CD4⁺-Т-лимфоцитов менее 200 клеток/мкл, нуждавшийся

только в неинвазивной вентиляции, выписан без каких-либо осложнений, в то время как другой пациент с числом CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл и подавленной вирусной нагрузкой ВИЧ нуждался в инвазивной механической вентиляции [18].

Схожий случай ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекции у 28-летнего мужчины без сопутствующих заболеваний описывает отсутствие прогрессирования болезни и плавное выздоровление в течение 9 дней, несмотря на отсутствие должного контроля иммунного статуса в отсутствие APBT (число CD4⁺-Т-лимфоцитов 194 клеток/мкл) [27].

Подобная тенденция была прослежена и в другом ретроспективном когортном исследовании 23 пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией, в котором три пациента со СПИДом были выписаны домой без осложнений, а пациенты с неопределяемой вирусной нагрузкой и относительно высоким уровнем CD4⁺-Т-лимфоцитов (более 400 клеток/мкл) продемонстрировали неблагоприятный исход. CD4⁺-Т-клеточная лимфопения в этой серии случаев признана протективным фактором в отношении развития тяжелого течения COVID-19, а схема APBT — не имеющей влияния на исход [28].

В одноцентровом проспективном исследовании, проведенном в Италии, в котором отслеживали исходы ВИЧ-инфицированных пациентов с COVID-19, также не было обнаружено связи между иммуносупрессией и тяжелым течением заболевания. Сообщается, что единственным пациентом, тяжело перенесшим COVID-19, был мужчина европеоидной расы с оптимальным иммунологическим профилем (исходный уровень CD4⁺-Т-лимфоцитов 438 клеток/мкл), в то время как два пациента негроидной расы с тяжелым иммунодефицитом и сопутствующими заболеваниями демонстрировали бессимптомное течение [29].

В другом исследовании, проведенном ретроспективно, когорты коинфицированных с подавленной вирусной нагрузкой у большинства пациентов и приемлимым числом CD4⁺-Т-лимфоцитов была в среднем на 10 лет моложе ВИЧ-отрицательной когорты и имела несколько сопутствующих заболеваний. Показало, что риск тяжелого течения COVID-19, госпитализации в отделение интенсивной терапии и смерти был значительно ниже у ВИЧ-положительных пациентов. Однако необходимо учитывать, что в это исследование были включены ВИЧ-положительные пациенты с вероятными COVID-19, не подтвержденным лабораторными методами, поэтому результаты исследования могут быть сомнительными [30].

В представленных сообщениях предполагалось, что ВИЧ-ассоциированная иммуносупрессия может парадоксальным образом защищать от тяжелых проявлений COVID-19 [17, 30, 31]. В одной из работ в группе ВИЧ-инфицированных были выявлены низкие пиковые уровни СРБ, что, по мнению исследователей, свидетельствует о затруднении формирования выраженного иммунного ответа. Относительная иммунная дисфункция, по-видимому, играет защитную роль при COVID-19, что выражается в меньшей потребности ЛЖВ в неинвазивной и инвазивной ИВЛ [19].

Однако результаты более поздних исследований показали, что пациенты с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией со смертельным исходом имели более высокие уровни растворимых маркеров иммунной активации и воспаления, чем выжившие, что позволяет предположить, что ЛЖВ остаются способными к глубокой воспалительной реакции в ответ на SARS-CoV-2-инфицирование [13, 22, 32].

Отмечена обратная зависимость между числом CD4⁺-Т-лимфоцитов и уровнем смертности. В серии случаев госпитализации пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией в госпитале Южного Бронкса (штат Нью-Йорк) описаны девять участников (семь из них — мужчины) в возрасте 58 лет со множественными сопутствующими заболеваниями, числом CD4⁺-Т-лимфоцитов 179–1827 клеток/мкл и вирусной нагрузкой ВИЧ от очень низкой до неопределяемой [33]. Исследователями сделан вывод, что предикторы прогрессирования заболевания до тяжелой формы и смерти одинаковы как в группе ВИЧ-инфицированных, так и в группе ВИЧ-негативных. Сопоставляя с данными других работ, авторы заключили, что пациенты в текущем исследовании имели число CD4⁺-Т-лимфоцитов значительно ниже, но уровень смертности выше, что служит основанием опровержения протективного действия иммуносупрессии. Результаты исследования, однако, должны быть интерпретированы с осторожностью, так как большинству пациентов с неблагоприятными исходами в этом исследовании не проводили APBT, уровень CD4⁺-Т-лимфоцитов у них был более 200 клеток/мкл, и присутствовали множественные сопутствующие заболевания [33].

Наравне с противоречивыми сообщениями об особенностях течения COVID-19 при ВИЧ-инфекции, необходимо рассмотреть еще одну теорию, согласно которой, благодаря возможным преимуществам использования лопинавира/ритонавира в отношении SARS-CoV-2 время инициации и режим APBT могут уравнивать иммунный ответ и клиренс коронавируса, предотвращая тем самым развитие неблагоприятного гипервоспалительного состояния у коинфицированных пациентов [34].

Мы предполагаем, что пациенты с тяжелым иммунодефицитом сами по себе не защищены от COVID-19, они лишь бессимптомны/малосимптомны, поскольку не состоятельны развить достаточно сильный воспалительный ответ, чтобы вызвать симптоматическое заболевание, что приводит к снижению частоты госпитализаций. Такую иммуносупрессию нельзя назвать протективной, поскольку она может приводить к длительному вирусному клиренсу. В зависимости от нескольких факторов, например сопутствующих заболеваний, возраста пациента, своевременности лечения, схемы APBT, с учетом отсроченного клиренса вируса бессимптомная форма может прогрессировать от легких до тяжелых форм, приводя иногда к летальному исходу.

Широкомасштабная детекция антител негоспитализированных ВИЧ-инфицированных пациентов помогла бы прояснить, действительно ли все пациенты с иммуносупрессией остаются бессимптомными [31].

В то же время большинство представленных в исследованиях ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфицированных пациентов имели уровень CD4⁺-Т-лимфоцитов более 200 клеток/мкл, что, как мы предполагаем, могло приводить к симптоматической форме заболевания. В этой группе пациентов COVID-19-индуцированная лимфопения накладывалась на имеющуюся легкую или умеренную иммуносупрессию, что возможно вызывало более сильный ответ на фоне ранее назначенной APBT, увеличивало тем самым число лимфоцитов до уровня стабилизированного иммунного ответа, при котором невозможно ни серьезное воспалительное, ни вирус-опосредованное повреждение.

Согласно другой гипотезе, более легкое течение заболевания может быть обусловлено механизмом

вирусной интерференции, когда ВИЧ изменяет клетки хозяина, создавая неблагоприятную среду для других вирусов, модифицируя тем самым течение COVID-19.

Иммунологическая характеристика пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией

Преходящая лимфопения является частым явлением при COVID-19, однако в сочетании с прогрессирующей ВИЧ-ассоциированной лимфопенией уровень лимфоцитов у пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией улучшается лишь незначительно после выздоровления от COVID-19 [35].

Сравнительно более низкое число CD4⁺-Т-лимфоцитов у пациентов, инфицированных ВИЧ/SARS-CoV-2, может быть одной из причин стертой клинической картины, а также замедленной и недостаточной продукции антител против SARS-CoV-2. Более того, низкие уровни IgM и IgG к SARS-CoV-2 были связаны с более высокой вирусной нагрузкой ВИЧ (≥ 20 копий/мл) по сравнению с пациентами с нагрузкой менее 20 копий/мл [15].

Ретроспективное исследование COVID-19 у ЛЖВ выявило тяжелую лимфопению и снижение числа CD4⁺-Т-лимфоцитов, в то время как уровни СРБ, фибриногена, D-димера, интерлейкина-6, интерлейкина-8 и TNF α были повышены. Сообщалось о более высоком уровне воспалительных маркеров и более тяжелой лимфопении в случае неблагоприятных исходов COVID-19 у ЛЖВ в сравнении с выздоровевшими [36]. В то время как увеличение уровня интерлейкина-6 и d-димера в общей популяции связано с тяжестью COVID-19, у ЛЖВ они могут служить биомаркерами хронической ВИЧ-инфекции [37]. Тем не менее не обнаружены различия в содержании биомаркеров у людей с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией в сравнении с общей популяцией.

Тяжелая лимфопения может быть объяснена ускоренным апоптозом лимфоцитов на фоне вирусной инфекции, вызывающей их активацию и участие в противовирусном ответе [38]. Другим объяснением лимфопении может быть прямое действие SARS-CoV-2 на лимфоциты через ACE2-зависимые и ACE2-независимые пути. Сообщалось, что менее 5% лимфоцитов слизистой оболочки полости рта могут экспрессировать ACE2 [39]. Кроме того, SARS-CoV-2 может использовать для проникновения в Т-клетки такие рецепторы, как CD147 [40].

COVID-19 и антиретровирусная терапия

Пациенты с контролируемой на АРВТ ВИЧ-инфекцией демонстрируют сопоставимый с общей популяцией риск заражения COVID-19 [14], однако эффект АРВТ при ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекции недостаточно исследован. Основная причина, по которой более ранние исследования позволили выдвинуть гипотезу о протективном действии АРВТ в отношении COVID-19 у ЛЖВ, заключалась в том, что такие противовирусные препараты, как тенофовир и лопинавир, показали активность против SARS-CoV-2 *in vitro* [41, 42]. Косвенно это подтверждают результаты ретроспективного исследования, включавшего 20 пациентов с ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекцией, в ходе которого обнаружены более низкие показатели СОЭ и СРБ у пациентов на АРВТ в сравнении с пациентами, у которых не проводили терапию [43].

Клиническое испытание с участием госпитализированных взрослых ВИЧ-отрицательных пациентов с подтвержденной новой коронавирусной

инфекцией продемонстрировало отсутствие значимой разницы в сроках достижения клинического улучшения на фоне лечения лопинавиром/ритонавиром. Тем не менее уровень смертности в течение 28 дней, длительность пребывания в отделении интенсивной терапии и госпитализации в целом были ниже, кроме того, большее число пациентов демонстрировало клиническое улучшение на 14-й день в группе с применением лопинавира/ритонавира по сравнению с группой со стандартным лечением. Добавление лопинавира/ритонавира в протокол лечения снижает нагрузку ПНК SARS-CoV-2 и длительность обнаружения вирусной ПНК по сравнению со стандартным поддерживающим лечением [44]. Несмотря на полученные результаты о потенциальной клинической пользе применения лопинавира, необходимо оценить эффективность этого препарата у ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфицированных пациентов [34].

В исследовании другой серии случаев ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекции сообщается, что большинству пациентов проводили антиретровирусную терапию, содержащую ингибитор протеазы, преимущественно дарунавир, усиленный ритонавиром или кобициклатом [23].

Также сообщается, что дарунавир в дозе 800 мг не имеет протекторного действия в отношении заражения и прогрессирования дыхательной недостаточности, тогда как благоприятные исходы COVID-19 были зарегистрированы у пациентов, получавших в основном ингибиторы интегразы [30].

Испанскими исследователями показана более высокая распространенность SARS-CoV-2 среди пользователей предэкспозиционной профилактики на основе тенофовира дизопроксилфумарата или тенофовира алафенамида и эмтрицитабина (TDF/TAF + FTC) без существенных различий в клинических проявлениях по сравнению с контрольной группой [45], что опровергает гипотезу о протективном эффекте тенофовира в отношении инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 [42]. В нескольких других работах также есть данные о большей доле ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфицированных пациентов, получающих АРВТ на основе TDF, по сравнению с ВИЧ-моноинфицированными пациентами [17, 22].

Необходимы дополнительные исследования в отношении мезилата нелфинавира, ингибитора протеазы ВИЧ, являющегося, как недавно было обнаружено, эффективным ингибитором S-белка SARS-CoV-2 — основного детерминанта вирусной инфекционности [46].

Заключение

COVID-19, вероятно, имеет сопоставимое с общей популяцией течение у ВИЧ-положительных пациентов, находящихся на вирусологически и иммунологически эффективной АРВТ. По всей видимости, АРВТ не снижает риск заражения SARS-CoV-2, однако стабилизация иммунной системы на фоне терапии может способствовать снижению частоты неблагоприятных исходов COVID-19. SARS-CoV-2-ассоциированная лимфопения, «накладывающаяся» на текущее иммунодефицитное состояние может служить причиной стертой клинической картины, замедленной и недостаточной продукции антител против SARS-CoV-2 и отсроченного вирусного клиренса. Неясно, влечет ли за собой SARS-CoV-2-ассоциированная лимфопения развитие оппортунистических заболеваний. Вышеперечисленное является мощным аргументом в пользу соблюдения всех мер предосторожности ВИЧ-инфицированными пациентами.

Доступная информация о ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекции представляется довольно противоречивой и имеющей множество пробелов. Эта ситуация может быть связана с недостаточным размером выборки ВИЧ/SARS-CoV-2-пациентов в некоторых исследованиях, отсутствием широкомасштабной диагностики бессимптомных форм, недоучета предрасполагающих факторов при сравнении ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфицированных и

ВИЧ-моноинфицированных, что приводит к недооценке конфаундинга коморбидных состояний, режима АРВТ на развитие неблагоприятного исхода при коинфекции и, соответственно, искажению результатов исследования. Таким образом, необходимы дополнительные исследования для подтверждения или опровержения некоторых из предложенных гипотез, а также оценки эффективности проведения АРВТ при ВИЧ/SARS-CoV-2-коинфекции.

Литература

- Eis-Hübinger AM, Stifter G, Schneweis KE. Opportunistic infections with coronavirus-like particles in patients infected with the human immunodeficiency virus? *Zentralbl Bakteriol.* 1989 Sep; 271 (3): 351–5. DOI: 10.1016/s0934-8840(89)80034-9. PMID: 2553042; PMCID: PMC7135704.
- Chen XP, Cao Y. Consideration of highly active antiretroviral therapy in the prevention and treatment of severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004 Apr 1; 38 (7): 1030–2. DOI: 10.1086/386340. Epub 2004 Mar 15. PMID: 15034838.
- Shalhoub S, AlZahrani A, Simhairi R, Mushtaq A. Successful recovery of MERS CoV pneumonia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *J Clin Virol.* 2015 Jan; 62: 69–71. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.11.030. Epub 2014 Nov 29. PMID: 25542475; PMCID: PMC7128447.
- Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Immunol.* 2017 May 15; 198 (10): 4046–53. DOI: 10.4049/jimmunol.1601896. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28373583; PMCID: PMC5450662.
- Wang B, Li R, Lu Z, Huang Y. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. *Aging (Albany NY).* 2020 Apr 8; 12 (7): 6049–57. DOI: 10.18632/aging.103000. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32267833; PMCID: PMC7185114.
- Promislow DEL. A Geroscience Perspective on COVID-19 Mortality. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2020 Sep 16; 75 (9): e30–e33. DOI: 10.1093/gerona/glaa094. PMID: 32300796; PMCID: PMC7184466.
- Casella M, Rajnik M, Cuomo A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus. [Updated 2020 Oct 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
- Gittelman RM, Lavezzo E, Snyder TM, Zahid HJ, Elyanow R, Dalai S, et al. Diagnosis and Tracking of Past SARS-CoV-2 Infection in a Large Study of Vo', Italy Through T-Cell Receptor Sequencing. *medRxiv [Preprint]* 2020.11.09.20228023; 2020 [cited 2020 Nov 10] Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.09.20228023v1>.
- Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med.* 2020 Nov 5; 383 (19): 1813–26. DOI: 10.1056/NEJMoa2007764. Epub 2020 Oct 8. PMID: 32445440; PMCID: PMC7262788.
- Балыкова Л. А., Грановская М. В., Заславская К. Я., Симакина Е. Н., Агафьина А. С., Иванова А. Ю. и др. Новые возможности направленной противовирусной терапии COVID-19: результаты многоцентрового клинического исследования эффективности и безопасности применения препарата Арелливир. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2020. 3 (34): 16–29. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-16-29.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020 Feb 15; 395 (10223): 507–13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007143; PMCID: PMC7135076.
- World Health Organization (2020 Sep 2) [cited 2020 Nov 19] Available from: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-updates-clinical-care-guidance-with-corticosteroid-recommendations>.
- Kanwugu ON, Adadi P. HIV/SARS-CoV-2 coinfection: A global perspective. *J Med Virol.* 2020 Jul 21. DOI: 10.1002/jmv.26321. Epub ahead of print. PMID: 32692406; PMCID: PMC7404432.
- Zhu F, Cao Y, Xu S, Zhou M. Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV in a patient in Wuhan city, China. *J Med Virol.* 2020 Jun; 92 (6): 529–30. DOI: 10.1002/jmv.25732. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32160316; PMCID: PMC7228399.
- Huang J, Xie N, Hu X, Yan H, Ding J, Liu P, et al. Epidemiological, virological and serological features of COVID-19 cases in people living with HIV in Wuhan City: A population-based cohort study. *Clin Infect Dis.* 2020 Aug 17: ciaa1186. DOI: 10.1093/cid/ciaa1186. Epub ahead of print. PMID: 32803216; PMCID: PMC7454403.
- European AIDS Clinical Society. EACS-BHIVA, G. B statement (1 April 2020) [cited 2020 Nov 19]. Available from: <https://www.eacsociety.org/home/eacs-bhiva-statement-1-april.html>.
- Shalev N, Scherer M, LaSota ED, Antoniou P, Yin MT, Zucker J, et al. Clinical Characteristics and Outcomes in People Living With Human Immunodeficiency Virus Hospitalized for Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19; 71 (16): 2294–7. DOI: 10.1093/cid/ciaa635. PMID: 32472138; PMCID: PMC7314170.
- Blanco JL, Ambrosioni J, Garcia F, Martínez E, Soriano A, Mallolas J, et al. COVID-19 in patients with HIV: clinical case series. *Lancet HIV.* 2020 May; 7 (5): e314–e316. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30111-9. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32304642; PMCID: PMC7159872.
- Stoeckle K, Johnston CD, Jannat-Khah DP, Williams SC, Ellman TM, Vogler MA, et al. COVID-19 in Hospitalized Adults With HIV. *Open Forum Infect Dis.* 2020 Aug 1; 7 (8): ofaa327. DOI: 10.1093/ofid/ofaa327. PMID: 32864388; PMCID: PMC7445584.
- Karmen-Tuohy S, Carlucci PM, Zervou FN, Zacharioudakis IM, Rebeck G, Klein E, et al. Outcomes Among HIV-Positive Patients Hospitalized With COVID-19. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2020 Sep 1; 85 (1): 6–10. DOI: 10.1097/QAI.0000000000002423. PMID: 32568770; PMCID: PMC7446982.
- Davies MA. HIV and risk of COVID-19 death: a population cohort study from the Western Cape Province, South Africa. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Jul 3: 2020.07.02.20145185. DOI: 10.1101/2020.07.02.20145185. PMID: 32637972; PMCID: PMC7340198.
- Vizcarra P, Pérez-Elías MJ, Quereda C, Moreno A, Vivancos MJ, Dronda F, et al. Description of COVID-19 in HIV-infected individuals: a single-centre, prospective cohort. *Lancet HIV.* 2020 Aug; 7 (8): e554–e564. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30164-8. Epub 2020 May 28. PMID: 32473657; PMCID: PMC7255735.
- Childs K, Post FA, Norcross C, Ottaway Z, Hamlyn E, Quinn K, et al. Hospitalized Patients With COVID-19 and Human Immunodeficiency Virus: A Case Series. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 5; 71 (8): 2021–2. DOI: 10.1093/cid/ciaa657. PMID: 32459833; PMCID: PMC7314116.
- Altuntas Aydin O, Kumbasar Karaosmanoglu H, Kart Yasar K. HIV/SARS-CoV-2 coinfecting patients in Istanbul, Turkey. *J Med Virol.* 2020 Nov; 92 (11): 2288–90. DOI: 10.1002/jmv.25955. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32347975

25. Inciarte A, Gonzalez-Cordon A, Rojas J, Torres B, de Lazzari E, de la Mora L, et al. Clinical characteristics, risk factors, and incidence of symptomatic coronavirus disease 2019 in a large cohort of adults living with HIV: a single-center, prospective observational study. *AIDS*. 2020 Oct 1; 34 (12): 1775–80. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002643. PMID: 32773471; PMCID: PMC7493771.
26. Gudipati S, Brar I, Murray S, McKinnon JE, Yared N, Markowitz N. Descriptive Analysis of Patients Living With HIV Affected by COVID-19. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020 Oct 1; 85 (2): 123–6. DOI: 10.1097/QAI.0000000000002450. PMID: 32675771; PMCID: PMC7446990.
27. Nakamoto T, Kutsuna S, Yanagawa Y, Kanda K, Okuhama A, Akiyama Y, et al. A case of SARS-CoV-2 infection in an untreated HIV patient in Tokyo, Japan. *J Med Virol*. 2020 Jun 3; 10.1002/jmv.26102. DOI: 10.1002/jmv.26102. Epub ahead of print. PMID: 32492188; PMCID: PMC7300885.
28. Nagarakanti SR, Okoh AK, Grinberg S, Bishburg E. Clinical outcomes of patients with COVID-19 and HIV coinfection. *J Med Virol*. 2020 Sep 19. DOI: 10.1002/jmv.26533. Epub ahead of print. PMID: 32949148; PMCID: PMC7537324.
29. Mondì A, Cimini E, Colavita F, Cicalini S, Pinnetti C, Matusali G, et al. COVID-19 in people living with HIV: Clinical implications of dynamics of the immune response to SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2020 Sep 25. DOI: 10.1002/jmv.26556. Epub ahead of print. PMID: 32975842; PMCID: PMC7537181.
30. Gervasoni C, Meraviglia P, Riva A, Giacomelli A, Oreni L, Minisci D, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients With Human Immunodeficiency Virus With COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71 (16): 2276–78. DOI: 10.1093/cid/ciaa579. PMID: 32407467; PMCID: PMC7239244.
31. Zhao J, Liao X, Wang H, Wei L, Xing M, Liu L, et al. Early Virus Clearance and Delayed Antibody Response in a Case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With a History of Coinfection With Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71 (16): 2233–35. DOI: 10.1093/cid/ciaa408. PMID: 32270178; PMCID: PMC7184426.
32. Hu Y, Ma J, Huang H, Vermund SH. Coinfection With HIV and SARS-CoV-2 in Wuhan, China: A 12-Person Case Series. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020 Sep 1; 85 (1): 1–5. DOI: 10.1097/QAI.0000000000002424. PMID: 32568771; PMCID: PMC7446977.
33. Suwanwongse K, Shabarek N. Clinical features and outcome of HIV/SARS-CoV-2 coinfecting patients in The Bronx, New York city. *J Med Virol*. 2020 Nov; 92 (11): 2387–9. DOI: 10.1002/jmv.26077. Epub 2020 Jun 9. PMID: 32462663; PMCID: PMC7283854.
34. Mascolo S, Romanelli A, Carleo MA, Esposito V. Could HIV infection alter the clinical course of SARS-CoV-2 infection? When less is better. *J Med Virol*. 2020 Oct; 92 (10): 1777–8. DOI: 10.1002/jmv.25881. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32293709; PMCID: PMC7262314.
35. Yang R, Gui X, Zhang Y, Xiong Y, Gao S, Ke H. Clinical characteristics of COVID-19 patients with HIV coinfection in Wuhan, China. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Oct 27: 1–7. DOI: 10.1080/17476348.2021.1836965. Epub ahead of print. PMID: 33074039; PMCID: PMC7605649.
36. Ho HE, Peluso MJ, Margus C, Matias Lopes JP, He C, Gaisa MM, et al. Clinical outcomes and immunologic characteristics of Covid-19 in people with HIV. *J Infect Dis*. 2020 Jun 30; jiaa380. DOI: 10.1093/infdis/jiaa380. Epub ahead of print. PMID: 32601704; PMCID: PMC7337732.
37. Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*. 2010 Jun 15; 201 (12): 1788–95. DOI: 10.1086/652749. PMID: 20446848; PMCID: PMC2872049.
38. Feng X, Li S, Sun Q, Zhu J, Chen B, Xiong M, et al. Immune-Inflammatory Parameters in COVID-19 Cases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jun 9; 7: 301. DOI: 10.3389/fmed.2020.00301. PMID: 32582743; PMCID: PMC7295898.
39. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020 Feb 24; 12 (1): 8. DOI: 10.1038/s41368-020-0074-x. PMID: 32094336; PMCID: PMC7039956.
40. Biegler B, Kasinrerk W. Reduction of CD147 surface expression on primary T cells leads to enhanced cell proliferation. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012 Dec; 30 (4): 259–67. PMID: 23393905.
41. Chan KS, Lai ST, Chu CM, Tsui E, Tam CY, Wong MM, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with lopinavir/ritonavir: a multicentre retrospective matched cohort study. *Hong Kong Med J*. 2003 Dec; 9 (6): 399–406. PMID: 14660806.
42. Elfiky AA. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study. *Life Sci*. 2020 Jul 15; 253: 117592. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117592. Epub 2020 Mar 25. Erratum in: *Life Sci*. 2020 Oct 1; 258: 118350. PMID: 32222463; PMCID: PMC7102646.
43. Liu J, Zeng W, Cao Y, Cui Y, Li Y, Yao S, et al. Effect of a Previous History of Antiretroviral Treatment on Clinical Picture of Patients with Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV: A Preliminary Study. *Int J Infect Dis*. 2020 Nov; 100: 141–8. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.08.045. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32829051; PMCID: PMC7439831.
44. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7; 382 (19): 1787–99. DOI: 10.1056/NEJMoa2001282. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32187464; PMCID: PMC7121492.
45. Ayerdi O, Puerta T, Clavo P, Vera M, Ballesteros J, Fuentes ME, et al. Preventive efficacy of Tenofovir/Emtricitabine against severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 among pre-exposure prophylaxis users. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Sep 25; 7 (11): ofaa455. DOI: 10.1093/ofid/ofaa455. PMID: 33200081; PMCID: PMC7543639.
46. Musarrat F, Chouljenko V, Dahal A, Nabi R, Chouljenko T, Jois SD, et al. The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARSCoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections. *J Med Virol*. 2020 Oct; 92 (10): 2087–95. DOI: 10.1002/jmv.25985. Epub 2020 May 17. PMID: 32374457; PMCID: PMC7267418.

References

1. Eis-Hübinger AM, Stifter G, Schneweis KE. Opportunistic infections with coronavirus-like particles in patients infected with the human immunodeficiency virus? *Zentralbl Bakteriol*. 1989 Sep; 271 (3): 351–5. DOI: 10.1016/s0934-8840(89)80034-9. PMID: 2553042; PMCID: PMC7135704.
2. Chen XP, Cao Y. Consideration of highly active antiretroviral therapy in the prevention and treatment of severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 1; 38 (7): 1030–2. DOI: 10.1086/386340. Epub 2004 Mar 15. PMID: 15034838.
3. Shalhoub S, AlZahrani A, Simhairi R, Mushtaq A. Successful recovery of MERS CoV pneumonia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *J Clin Virol*. 2015 Jan; 62: 69–71. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.11.030. Epub 2014 Nov 29. PMID: 25542475; PMCID: PMC7128447.
4. Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Immunol*. 2017 May 15; 198 (10): 4046–53. DOI: 10.4049/jimmunol.1601896. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28373583; PMCID: PMC5450662.
5. Wang B, Li R, Lu Z, Huang Y. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2020 Apr 8; 12 (7): 6049–57. DOI: 10.18632/

- aging.103000. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32267833; PMCID: PMC7185114.
6. Promislow DEL. A Geroscience Perspective on COVID-19 Mortality. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020 Sep 16; 75 (9): e30–e33. DOI: 10.1093/gerona/glaa094. PMID: 32300796; PMCID: PMC7184466.
 7. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus. [Updated 2020 Oct 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
 8. Gittelman RM, Lavezzo E, Snyder TM, Zahid HJ, Elyanow R, Dalai S, et al. Diagnosis and Tracking of Past SARS-CoV-2 Infection in a Large Study of Vo', Italy Through T-Cell Receptor Sequencing. medRxiv [Preprint] 2020.11.09.20228023; 2020 [cited 2020 Nov 10] Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.09.20228023v1>.
 9. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kail AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med*. 2020 Nov 5; 383 (19): 1813–26. DOI: 10.1056/NEJMoa2007764. Epub 2020 Oct 8. PMID: 32445440; PMCID: PMC7262788.
 10. Balykova LA, Granovskaya MV, Zaslavskaya KYa, Simakina EN, Agafina AS, Ivanova AYU, et al. New possibilities for targeted antiviral therapy for COVID-19. Results of a multicenter clinical study of the efficacy and safety of using the drug Areplivir. *Infectious diseases: news, opinions, training*. 2020. 3 (34): 16–29. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-16-29.
 11. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020 Feb 15; 395 (10223): 507–13. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32007143; PMCID: PMC7135076.
 12. World Health Organization (2020 Sep 2) [cited 2020 Nov 19] Available from: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-updates-clinical-care-guidance-with-corticosteroid-recommendations>.
 13. Kanwugu ON, Adadi P. HIV/SARS-CoV-2 coinfection: A global perspective. *J Med Virol*. 2020 Jul 21. DOI: 10.1002/jmv.26321. Epub ahead of print. PMID: 32692406; PMCID: PMC7404432.
 14. Zhu F, Cao Y, Xu S, Zhou M. Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV in a patient in Wuhan city, China. *J Med Virol*. 2020 Jun; 92 (6): 529–30. DOI: 10.1002/jmv.25732. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32160316; PMCID: PMC7228399.
 15. Huang J, Xie N, Hu X, Yan H, Ding J, Liu P, et al. Epidemiological, virological and serological features of COVID-19 cases in people living with HIV in Wuhan City: A population-based cohort study. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 17: ciaa1186. DOI: 10.1093/cid/ciaa1186. Epub ahead of print. PMID: 32803216; PMCID: PMC7454403.
 16. European AIDS Clinical Society. EACS-BHIVA, G. B statement (1 April 2020) [cited 2020 Nov 19]. Available from: <https://www.eacsociety.org/home/eacs-bhiva-statement-1-april.html>.
 17. Shalev N, Scherer M, LaSota ED, Antoniou P, Yin MT, Zucker J, et al. Clinical Characteristics and Outcomes in People Living With Human Immunodeficiency Virus Hospitalized for Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71 (16): 2294–7. DOI: 10.1093/cid/ciaa635. PMID: 32472138; PMCID: PMC7314170.
 18. Blanco JL, Ambrosioni J, Garcia F, Martínez E, Soriano A, Mallolas J, et al. COVID-19 in patients with HIV: clinical case series. *Lancet HIV*. 2020 May; 7 (5): e314–e316. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30111-9. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32304642; PMCID: PMC7159872.
 19. Stoeckle K, Johnston CD, Jannat-Khah DP, Williams SC, Ellman TM, Vogler MA, et al. COVID-19 in Hospitalized Adults With HIV. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Aug 1; 7 (8): ofaa327. DOI: 10.1093/ofid/ofaa327. PMID: 32864388; PMCID: PMC7445584.
 20. Karmen-Tuohy S, Carlucci PM, Zervou FN, Zacharioudakis IM, Rebick G, Klein E, et al. Outcomes Among HIV-Positive Patients Hospitalized With COVID-19. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020 Sep 1; 85 (1): 6–10. DOI: 10.1097/QAI.0000000000002423. PMID: 32568770; PMCID: PMC7446982.
 21. Davies MA. HIV and risk of COVID-19 death: a population cohort study from the Western Cape Province, South Africa. medRxiv [Preprint]. 2020 Jul 3: 2020.07.02.20145185. DOI: 10.1101/2020.07.02.20145185. PMID: 32637972; PMCID: PMC7340198.
 22. Vizcarra P, Pérez-Elías MJ, Quereda C, Moreno A, Vivancos MJ, Dronda F, et al. Description of COVID-19 in HIV-infected individuals: a single-centre, prospective cohort. *Lancet HIV*. 2020 Aug; 7 (8): e554–e564. DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30164-8. Epub 2020 May 28. PMID: 32473657; PMCID: PMC7255735.
 23. Childs K, Post FA, Norcross C, Ottaway Z, Hamlyn E, Quinn K, et al. Hospitalized Patients With COVID-19 and Human Immunodeficiency Virus: A Case Series. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 5; 71 (8): 2021–2. DOI: 10.1093/cid/ciaa657. PMID: 32459833; PMCID: PMC7314116.
 24. Altuntas Aydin O, Kumbasar Karaosmanoglu H, Kart Yasar K. HIV/SARS-CoV-2 coinfecting patients in Istanbul, Turkey. *J Med Virol*. 2020 Nov; 92 (11): 2288–90. DOI: 10.1002/jmv.25955. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32347975
 25. Inciarte A, Gonzalez-Cordon A, Rojas J, Torres B, de Lazzari E, de la Mora L, et al. Clinical characteristics, risk factors, and incidence of symptomatic coronavirus disease 2019 in a large cohort of adults living with HIV: a single-center, prospective observational study. *AIDS*. 2020 Oct 1; 34 (12): 1775–80. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002643. PMID: 32773471; PMCID: PMC7493771.
 26. Gudipati S, Brar I, Murray S, McKinnon JE, Yared N, Markowitz N. Descriptive Analysis of Patients Living With HIV Affected by COVID-19. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020 Oct 1; 85 (2): 123–6. DOI: 10.1097/QAI.00000000000002450. PMID: 32675771; PMCID: PMC7446990.
 27. Nakamoto T, Kutsuna S, Yanagawa Y, Kanda K, Okuhama A, Akiyama Y, et al. A case of SARS-CoV-2 infection in an untreated HIV patient in Tokyo, Japan. *J Med Virol*. 2020 Jun 3: 10.1002/jmv.26102. DOI: 10.1002/jmv.26102. Epub ahead of print. PMID: 32492188; PMCID: PMC7300885.
 28. Nagarakanti SR, Okoh AK, Grinberg S, Bishburg E. Clinical outcomes of patients with COVID-19 and HIV coinfection. *J Med Virol*. 2020 Sep 19. DOI: 10.1002/jmv.26533. Epub ahead of print. PMID: 32949148; PMCID: PMC7537324.
 29. Mondini A, Cimini E, Colavita F, Cicalini S, Pinnetti C, Matusali G, et al. COVID-19 in people living with HIV: Clinical implications of dynamics of the immune response to SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2020 Sep 25. DOI: 10.1002/jmv.26556. Epub ahead of print. PMID: 32975842; PMCID: PMC7537181.
 30. Gervasoni C, Meraviglia P, Riva A, Giacomelli A, Oreni L, Minisci D, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients With Human Immunodeficiency Virus With COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71 (16): 2276–78. DOI: 10.1093/cid/ciaa579. PMID: 32407467; PMCID: PMC7239244.
 31. Zhao J, Liao X, Wang H, Wei L, Xing M, Liu L, et al. Early Virus Clearance and Delayed Antibody Response in a Case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With a History of Coinfection With Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19; 71 (16): 2233–35. DOI: 10.1093/cid/ciaa408. PMID: 32270178; PMCID: PMC7184426.
 32. Hu Y, Ma J, Huang H, Vermund SH. Coinfection With HIV and SARS-CoV-2 in Wuhan, China: A 12-Person Case Series. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020 Sep 1; 85 (1): 1–5. DOI: 10.1097/QAI.0000000000002424. PMID: 32568771; PMCID: PMC7446977.
 33. Suwanwongse K, Shabarek N. Clinical features and outcome of HIV/SARS-CoV-2 coinfecting patients in The Bronx, New York city. *J Med Virol*. 2020 Nov; 92 (11): 2387–9. DOI: 10.1002/jmv.26077. Epub 2020 Jun 9. PMID: 32462663; PMCID: PMC7283854.
 34. Mascolo S, Romanelli A, Carleo MA, Esposito V. Could HIV infection alter the clinical course of SARS-CoV-2 infection? When less is better. *J Med Virol*. 2020 Oct; 92 (10): 1777–8. DOI: 10.1002/jmv.25881. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32293709; PMCID: PMC7262314.
 35. Yang R, Gui X, Zhang Y, Xiong Y, Gao S, Ke H. Clinical characteristics of COVID-19 patients with HIV coinfection in Wuhan, China. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Oct 27: 1–7. DOI: 10.1080/17476348.2021.1836965. Epub ahead of print. PMID:

- 33074039; PMCID: PMC7605649.
36. Ho HE, Peluso MJ, Margus C, Matias Lopes JP, He C, Gaisa MM, et al. Clinical outcomes and immunologic characteristics of Covid-19 in people with HIV. *J Infect Dis*. 2020 Jun 30; jiaa380. DOI: 10.1093/infdis/jiaa380. Epub ahead of print. PMID: 32601704; PMCID: PMC7337732.
 37. Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*. 2010 Jun 15; 201 (12): 1788–95. DOI: 10.1086/652749. PMID: 20446848; PMCID: PMC2872049.
 38. Feng X, Li S, Sun Q, Zhu J, Chen B, Xiong M, et al. Immune-Inflammatory Parameters in COVID-19 Cases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Jun 9; 7: 301. DOI: 10.3389/fmed.2020.00301. PMID: 32582743; PMCID: PMC7295898.
 39. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020 Feb 24; 12 (1): 8. DOI: 10.1038/s41368-020-0074-x. PMID: 32094336; PMCID: PMC7039956.
 40. Biegler B, Kasinrerker W. Reduction of CD147 surface expression on primary T cells leads to enhanced cell proliferation. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012 Dec; 30 (4): 259–67. PMID: 23393905.
 41. Chan KS, Lai ST, Chu CM, Tsui E, Tam CY, Wong MM, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with lopinavir/ritonavir: a multicentre retrospective matched cohort study. *Hong Kong Med J*. 2003 Dec; 9 (6): 399–406. PMID: 14660806.
 42. Elfiky AA. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study. *Life Sci*. 2020 Jul 15; 253: 117592. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117592. Epub 2020 Mar 25. Erratum in: *Life Sci*. 2020 Oct 1; 258: 118350. PMID: 32222463; PMCID: PMC7102646.
 43. Liu J, Zeng W, Cao Y, Cui Y, Li Y, Yao S, et al. Effect of a Previous History of Antiretroviral Treatment on Clinical Picture of Patients with Co-infection of SARS-CoV-2 and HIV: A Preliminary Study. *Int J Infect Dis*. 2020 Nov; 100: 141–8. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.08.045. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32829051; PMCID: PMC7439831.
 44. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7; 382 (19): 1787–99. DOI: 10.1056/NEJMoa2001282. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32187464; PMCID: PMC7121492.
 45. Ayerdi O, Puerta T, Clavo P, Vera M, Ballesteros J, Fuentes ME, et al. Preventive efficacy of Tenofovir/Emtricitabine against severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 among pre-exposure prophylaxis users. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Sep 25; 7 (11): ofaa455. DOI: 10.1093/ofid/ofaa455. PMID: 33200081; PMCID: PMC7543639.
 46. Musarrat F, Chouljenko V, Dahal A, Nabi R, Chouljenko T, Jois SD, et al. The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARSCoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections. *J Med Virol*. 2020 Oct; 92 (10): 2087–95. DOI: 10.1002/jmv.25985. Epub 2020 May 17. PMID: 32374457; PMCID: PMC7267418.

ВАЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-АНТИГЕНА ВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПНЕВМОНИИ COVID-19 В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА

Ю. С. Лебедин¹✉, О. В. Лян², А. Г. Галстян², А. В. Пантелеева¹, В. В. Белоусов^{2,3}, Д. В. Ребриков³

¹ ООО «ХЕМА», Москва, Россия

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

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Появившаяся в декабре 2019 г. новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, почти за год унесла жизни 2,5 млн человек. Высокая контагиозность вируса привела к его широкому и быстрому распространению по всему миру. По состоянию на февраль 2021 г. общее число заболевших достигает 111 млн человек; в РФ зарегистрировано более 4 млн случаев заражения SARS-CoV-2. Для успешной борьбы с возникшей пандемией необходимо быстро диагностировать заболевание на ранней стадии, что позволит предотвращать дальнейшее распространение этого вируса и своевременно назначать необходимое лечение. Целью работы было оценить использование нуклеокапсидного антигена (N-Ag) SARS-CoV-2 и соответствующих антител в качестве диагностических маркеров у больных пневмонией. Исследование проводили в разгар пандемии COVID-19 в Москве (Россия). В него вошли 425 экстренных пациентов с клиническими признаками пневмонии COVID-19, из которых 280 (66%) были положительны либо на сыровороточный N-Ag, либо на соответствующие ему антитела. Продемонстрирована общая распространенность сероконверсии N-Ag у пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2, в течение 3–5 дней после госпитализации. Полученные результаты свидетельствуют о высокой целесообразности серодиагностики SARS-CoV-2 у экстренных больных.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, нуклеокапсидный антиген, сероконверсия

Финансирование: работа выполнена при частичной поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1789, выделенного Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

Благодарности: мы благодарим Наталью Усман за помощь в обсуждении.

Вклад авторов: Ю. С. Лебедин — разработка концепции, отбор проб, молекулярные исследования, редактирование рукописи; О. В. Лян, А. Г. Галстян — клинические обследования, отбор проб, биохимические и молекулярные исследования; А. В. Пантелеева — молекулярные исследования; редактирование рукописи, В. В. Белоусов, Д. В. Ребриков — подготовка исследования; редактирование рукописи. Все авторы прочли и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 2020/07 от 16 марта 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Юрием Степановичем Лебедин
9-я Парковая, д. 48, 105264, г. Москва; lebedin@xema-medica.com

Препринт опубликован: 25.09.2020 **DOI:** 10.1101/2020.09.24.20200303

Статья получена: 11.02.2021 **Статья принята к печати:** 24.02.2021 **Опубликована онлайн:** 28.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.009

THE IMPORTANCE OF DETERMINING SARS-COV-2 N-Ag SERODIAGNOSTICS FOR THE MANAGEMENT OF COVID-19 PNEUMONIA IN HOSPITAL SETTINGS

Lebedin YuS¹✉, Lyang OV², Galstyan AG², Panteleeva AV¹, Belousov VV^{2,3}, Rebrikov DV³

¹ XEMA Co. Ltd., Moscow, Russia

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

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

A new coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus, which appeared in December 2019, has claimed the lives of 2.5 million people in almost a year. The high contagiousness of this virus has led to its wide and rapid spread around the world. As of February 2021, the total number of cases is 111 million people; more than 4 million cases of SARS-CoV-2 infection have been registered in the Russian Federation. To successfully combat the emerging pandemic, it is necessary to quickly diagnose the disease at an early stage, which will prevent the further spread of this virus and prescribe the necessary treatment on time. The aim of the work was to evaluate the use of the SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen (N-Ag) and respective antibodies as diagnostic markers in pneumonia patients. The study was conducted at the height of COVID-19 pandemic in Moscow, Russia. It included 425 emergency patients with clinical signs of COVID-19 pneumonia, of which 280 (66%) were positive for either serum N-Ag and/or its respective antibodies. We demonstrate the total prevalence of N-Ag seroconversion in SARS-CoV-2-associated pneumonia patients within 3–5 days after hospital admission. The results indicate high feasibility of SARS-CoV-2 serodiagnostics in emergency patients.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, nucleocapsid antigen, seroconversion

Funding: this work was partially supported by a grant № 075-15-2019-1789 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation allocated to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

Acknowledgement: we acknowledge Natalia Usman for helpful discussions

Author contribution: Lebedin YS designed the study, performed the sampling, conducted molecular studies and drafted the manuscript, Lyang OV and Galstyan AG performed the clinical examinations and sampling, conducted biochemical and molecular studies, Panteleeva AV conducted molecular studies and drafted the manuscript, Belousov VV and Rebrikov DV designed the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study protocol was reviewed and approved by the Local Ethics Committee at the Pirogov Russian State Medical University (Protocol № 2020/07 dated March 16, 2020); the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuri S. Lebedin
9-ya Parkovaya, 48, Moscow, 105264; lebedin@xema-medica.com

Preprint published: 25.09.2020 **DOI:** 10.1101/2020.09.24.20200303

Received: 11.02.2021 **Accepted:** 24.02.2021 **Published online:** 28.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.009

Иммунохимическое определение антигенов в крови широко применяют в диагностике инфекционных заболеваний. Тесты на антигемию обычно нацелены на патогены, переносимые кровью (в частности, вирусы, вызывающие хронические вирусные инфекции, включая цитомегаловирус, вирусы гепатитов В и С и вирус иммунодефицита человека [1–3]). При респираторных заболеваниях проникновение компонентов патогена (нуклеиновых кислот или белков) в нереспираторные жидкости организма возможно, но их обнаружение обычно затруднено из-за очагового характера патогенеза и его сильной связи с местным иммунитетом слизистых. Несмотря на это, некоторые респираторные инфекции можно эффективно диагностировать и контролировать путем обнаружения соответствующих антигенов в крови, например галактоманна при легочном аспергиллезе [4] и антигена *Legionella pneumophila* в моче пациентов с болезнью легионеров [5]. Кроме того, сообщалось об использовании методов иммуноанализа для лечения вирусассоциированных нозокомиальных пневмоний у пациентов отделения интенсивной терапии [4, 6]. Сывороточный нуклеокапсидный антиген (N-Ag) вируса «тяжелого острого респираторного синдрома» был описан при SARS-ассоциированной пневмонии [7, 8].

Целью работы было оценить нуклеокапсидный антиген (N-Ag) вируса SARS-CoV-2 и соответствующих антител в качестве диагностического маркера и продемонстрировать общую распространенность сероконверсии N-Ag у пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в Федеральном центре исследований мозга и нейротехнологий весной 2020 г. В разгар пандемии COVID-19 стационарные учреждения Центра были перепрофилированы для экстренной госпитализации и ведения пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2. В исследовании приняли участие 425 пациентов. Критерии включения: наличие клинических признаков пневмонии COVID-19 (лихорадка с сочетанием двух и более клинических признаков, включая температуру тела $\geq 38,5$ °C, частоту дыхания ≥ 30 вдохов в минуту и/или $SpO_2 \leq 93\%$) [9]. Образцы сыворотки крови для исследования отбирали у каждого пациента не менее двух раз; отбор проб при поступлении и при выписке проводили одновременно с обязательной процедурой рутинных анализов крови. Стационарное лечение продолжалось 20 ± 2 дня. Критерии выписки включали снижение уровня С-реактивного белка при подсчете WBC в пределах нормы (выше $4,0 \times 10^9$ л) и, в частности, наличие четкой тенденции к регрессу характерных признаков, выявленных компьютерной томографией: отсутствие новых помутнений типа «матового стекла», уменьшение выраженности соответствующих изменений в легочной ткани и/или уменьшение объема или степени консолидации помутнений типа «матового стекла» (не более трех, каждое в пределах 3 см по максимальному размеру) [10]. Качественный ОТ-ПЦР-тест для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки осуществляли при поступлении с использованием SARS-CoV-2/SARS-CoV Multiplex Real-Time PCR Detection Kit согласно протоколу производителя («ДНК-Технология»; Россия); аналитическая чувствительность прибора — 10 экзепляров на усилительную пробку, диагностическая чувствительность —

100% (95% CI: 95,6–100%), диагностическая специфичность — 100% (95% CI: 96,7–100%).

Кодирующая последовательность нуклеокапсидного антигена SARS-Cov-2 (N-Ag)

Кодирующую последовательность нуклеокапсидного антигена SARS-Cov-2 (N-Ag) (номер присоединения NCBI 045512.2) клонировали NdeI/XhoI в вектор pET-30b(+) Novagen (EMD Millipore, США); плазмиду расширяли в *E. coli* Top10 и трансформировали в *E. coli* Rosetta (DE3) для экспрессии N-Ag.

Условия были оптимизированы для ферментации биореактора при температуре 37 °C в 3000 мл богатой среды (дрожжевой экстракт, бактоп-пептон, глюкоза и микроэлементы). После 12-часовой инкубации культуру индуцировали 2,5 мМ имидазолом в течение 4 ч. Полученную биомассу ресуспендировали в фосфатном буферном физиологическом растворе (PBS) в соотношении 1 : 3 (масса/объем) и разрушали с помощью гомогенизатора APV-2000 (Spx Flow; США) при 1200 бар. Раствор осветляли центрифугированием при 12 000 g. Нерастворимую фракцию (тельца включения), содержащую целевой белок, последовательно промывали PBS, 2%-м Тритоном в PBS и свежей порцией PBS для удаления остаточного детергента. Белок растворяли в мочеvine (8 M) с NaCl (250 мМ) и фосфатом (50 мМ), pH 10,0. Раствор инкубировали при температуре +4 °C в течение ночи и центрифугировали при 15 000 g; собранный супернатант фильтровали и добавляли 20 мМ имидазола для предотвращения неспецифического связывания примесей. Полигистидин-меченый белок N-Ag очищали методом иммобилизованной аффинной хроматографии металлов с использованием никелевой колонки High Density Nickel #6BCL-QHNi (ABT; Испания), уравновешенной мочеvinным буфером. Белок элюировали 250 мМ имидазольным буфером и стерилизовали фильтрованием через фильтры диаметром 0,45 мкм.

Сывороточные IgG-антитела к нуклеокапсидному антигену (N-IgG)

Сывороточные IgG-антитела к нуклеокапсидному антигену (N-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого рекомбинантный полноразмерный нуклеокапсидный антиген SARS-CoV-2, полученный в *E. coli* (XEMA; Россия), был нанесен на поверхность полистирольных микроэлементов. Сыворотки, предварительно разведенные в 100 раз в ИФА-буфере (0,1%-й Твин-20 и 1%-й гидролизированный казеин в 0,1 M PBS), помещали в лунки планшета на 30 мин при 37 °C. После трех промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия лунки подвергали воздействию конъюгата мышиных моноклональных антител XG78 против IgG человека (γ -цепь) с пероксидазой хрена (XEMA; Россия) в течение 30 мин. После пяти промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия связанный фермент выявляли добавлением субстрат-хромогенной смеси (субстрат ТМБ, XEMA; Россия). Развитие цвета останавливали 5%-й серной кислотой и измеряли оптическую плотность (ОП) при 450 нм в планшетном ИФА-анализаторе Multiskan MC (Thermo Labsystems; Финляндия). Внутренний контроль (стабилизированная человеческая сыворотка, содержащая специфичные IgG-антитела) был включен во все планшеты с целью расчета порога положительности ОП для каждого

запуска индивидуально. Результаты выражены в виде индексов позитивности (рассчитываются как ОП искомого образца к ОП внутреннего контроля).

Сывороточные IgM-антитела против нуклеокапсидного антигена (N-IgM)

Сывороточные IgM-антитела против нуклеокапсидного антигена (N-IgM) обнаруживали методом обратного твердофазного ИФА. Мышиное моноклональное антитело против μ -цепи IgM человека (клон X616, XEMA; Россия) адсорбировали на поверхности полистирольных микроэлементов. Разведения сывороток (приготовленных таким же образом, как и для анализа IgG) помещали в лунки планшета на 30 мин при 37 °C. После трех промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия рабочее разведение рекомбинантного полноразмерного нуклеокапсидного антигена SARS-CoV-2, конъюгированного с пероксидазой хрена в ИФА-буфере, помещали в лунки на 30 мин при 37 °C. После пяти промывок 0,1%-м Твин-20 в 0,9%-м хлориде натрия связанный меченый антиген был обнаружен субстратом ТМБ и считыванием ОП. Расчет индекса позитивности (аналогично с анализом IgG) проводили с использованием внутреннего контроля IgM+.

Определение сывороточного N-антигена (N-Ag)

Определение сывороточного N-антигена (N-Ag) проводили двухфазным твердофазным сэндвич-методом с использованием моноклональных антител (мкАт), любезно предоставленных компанией HyTest Ltd. (Турку; Финляндия). На поверхность микропланшет наносили мкАт NP1510. Образцы сыворотки крови или калибраторы (растворы нуклеокапсидного антигена в донорской сыворотке в диапазоне от 20 до 2000 пг/мл) инкубировали с меченым пероксидазой мкАт в рабочей концентрации (клон NP1517) в ИФА-буфере с добавлением гетерофильного реагента для элиминации иммуноглобулинов (10 мкг/мл, HIER-E-010, Фапон Biotech; Китай) в течение 2 ч при 37 °C при непрерывном перемешивании в режиме 600 об. в PST-60HL-4 шейкере-инкубаторе (Biosan; Латвия). Детекцию проводили с использованием субстрата ТМБ (ХЕМА; Россия) и считывания ОП. Концентрации

N-Ag определяли методом калибровочной кривой с использованием программы GraphPad (Visual Data Tools, Inc.; США). Концентрации N-Ag, превышающие верхний предел калибровочной кривой (2000 пг/мл), в расчетах и графическом представлении были показаны как 2222 пг/мл. Образцам с показаниями ОП, соответствующими значениям концентрации ниже 20 пг/мл, не имеющим разрешения от нулевого калибратора, в представленных данных условно присваивали значения 15 пг/мл.

Статистическая обработка

Результаты обрабатывали в GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.; США) и Excel 2016 (Microsoft; США).

Референтные диапазоны определяли путем анализа образцов сыворотки крови, взятых у здоровых доноров ($n = 250$) до декабря 2019 г. В обоих анализах пороговые значения (cutoff) были установлены для достижения полной специфичности (ни одного из доноров не считали положительным).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуноферментное определение сывороточного N-Ag в сочетании с соответствующими антителами подтвердило COVID-19 у 280 пациентов (66%) исследуемой когорты. ОТ-ПЦР-анализ мазков из носоглотки подтвердил COVID-19 у 76% пациентов; перехват составляет 63% и соответствует конкордации 79%.

Несколько пациентов ($n = 21$; 5%) были идентифицированы как отрицательные по SARS-CoV-2 с помощью как ОТ-ПЦР-тестов, так и серодиагностики и, скорее всего, представляли собой случаи пневмоний, не ассоциированных с SARS-CoV-2. Небольшое число таких пациентов объясняется тем, что исследование проводили на пике пандемии.

Согласно полученным данным, антигенемия N-Ag характерна для большинства пациентов с тяжелым течением COVID-19 (63%).

Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови в зависимости от фазы заболевания представлена на рис. 1. Во время выписки у большинства пациентов, имевших положительный уровень N-Ag при поступлении (104 из 116; 90%), уровень N-Ag в сыворотке крови стал ниже

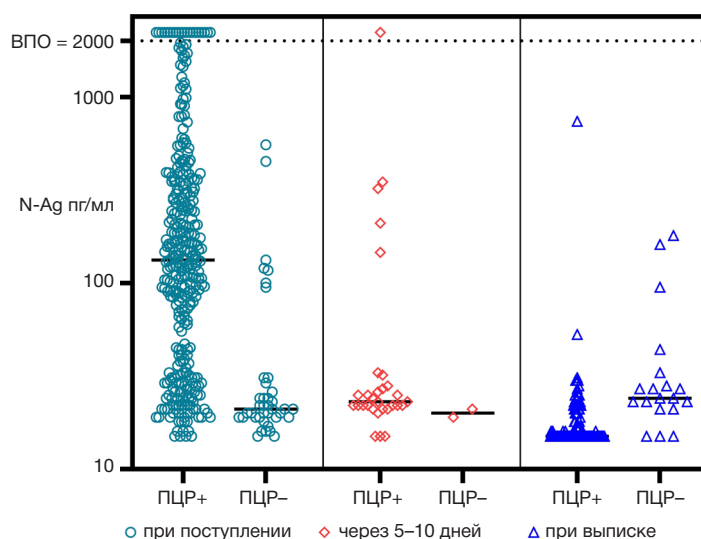


Рис. 1. Динамика уровня N-Ag в сыворотке в исследуемой когорте стационарных больных. ВПО — верхний предел количественной оценки; «ПЦР+» и «ПЦР-» — относятся к состоянию пациента при поступлении

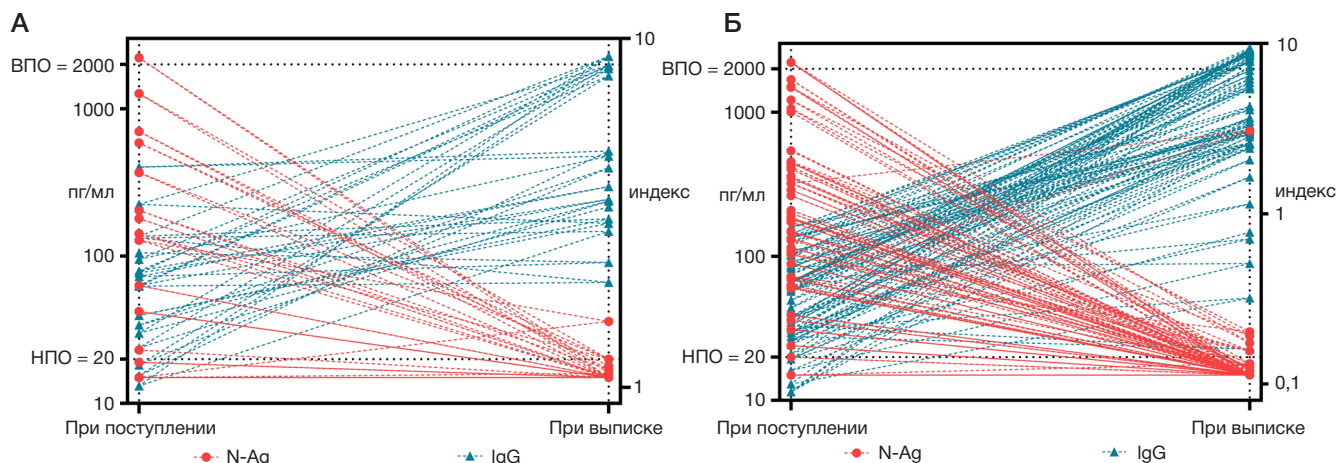


Рис. 2. Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови по сравнению с соответствующими IgG-антителами у пациентов IgG-серопозитивных при поступлении (А) и IgG-серонегативных при поступлении (Б). Вертикальные оси соответствуют концентрации N-Ag (слева) и индексу Ат (справа). ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения

нижней границы калибровочной кривой (< 20 пг/мл; 104 из 116 пациентов, 90%). Однако некоторые пациенты имели явно положительный уровень N-Ag даже при выписке.

К моменту выписки сероконверсия была выявлена у большинства пациентов, поступивших с положительным уровнем N-Ag (108 из 116; 93%), хотя степень сероконверсии значительно варьировала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения паттернов сероконверсии мы построили график, демонстрирующий уровни N-Ag в сыворотке крови и двух изотипов антител для отдельных случаев, разделив их на две подгруппы по Ат-серопозитивности при поступлении (рис. 2А и 3А против рис. 2Б и 3Б). Полученные результаты указывают на реципрокные паттерны для N-Ag и соответствующих антител, что характерно для классической сероконверсии. У пациентов, Ат-серонегативных при поступлении (предположительно находящихся на более ранней стадии заболевания), были выявлены более отчетливые паттерны классической сероконверсии. Паттерны IgG-антител были более выражены, чем паттерны IgM-антител в обеих группах.

Совместное обнаружение N-Ag и анти-N-Ag антител в 92 (18%) из 503 образцов сыворотки крови показывает, что эпитоп, распознанный иммуноферментной парой,

используемой для определения антигена, по крайней мере, не полностью перекрывается (маскируется) ответом человеческого антитела.

В подгруппе из 20 пациентов мы имели возможность оценить сероконверсию в течение более короткого периода в несколько дней. Согласно результатам, в большинстве случаев переход из состояния Ag+At- в состояние Ag-At+ происходил в течение 3–5 дней после экстренной госпитализации (рис. 4).

Согласно результатам исследования, госпитализация пациентов с пневмонией, ассоциированной с SARS-CoV-2, в разгар пандемии чаще всего происходила до начала сероконверсии (т. е. на фоне обнаруживаемых концентраций N-Ag в сыворотке). У большинства пациентов антиген преобладал на момент поступления и «замещался» соответствующими антителами к моменту выписки. Тем не менее в некоторых случаях к моменту экстренной госпитализации уровень антител к N-Ag в крови пациента уже был высоким, что, вероятно, отражало либо отсроченную госпитализацию, либо индивидуальную вариабельность патогенеза COVID-19.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой целесообразности серодиагностики SARS-CoV-2 у экстренных больных (по аналогии с «экспресс-тестами» Capillus HIV-1/HIV-2®, Determine HIV-1/2® и др., предлагаемыми в настоящее время в качестве золотого

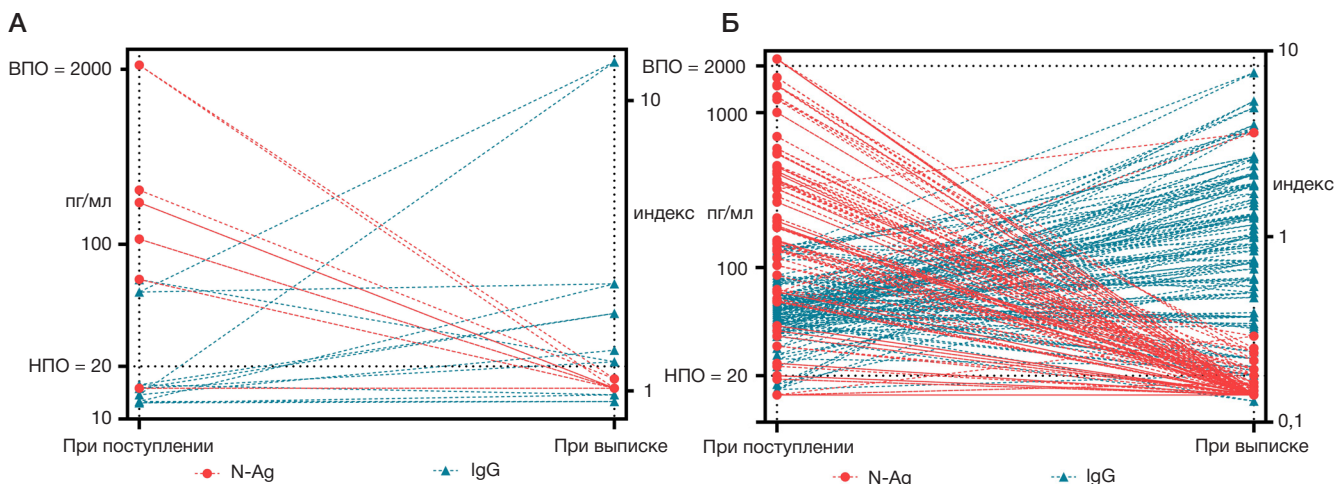


Рис. 3. Динамика уровня N-Ag в сыворотке крови по сравнению с соответствующими IgM-антителами у пациентов IgM-серопозитивных при поступлении (А) и IgM-серонегативных при поступлении (Б). Вертикальные оси соответствуют концентрации N-Ag (слева) и индексу Ат (справа). ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения

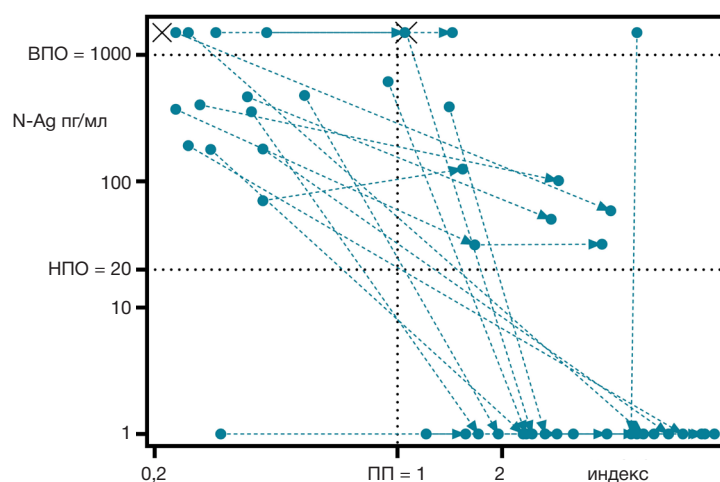


Рис. 4. Индивидуальные паттерны сероконверсии в течение 3–5 дней после поступления. ВПО — верхний предел количественной оценки; НПО — нижний предел обнаружения; ПП — порог положительности

стандарта диагностики ВИЧ вместо более дорогого и трудоемкого вестерн-блот анализа [11]). Аналогичные выводы были сделаны при исследовании небольших групп пациентов с подтвержденным SARS-CoV-2 с помощью различных методов иммунохимического анализа [12, 13].

Следует отметить, что ложноположительные результаты серодиагностики SARS-CoV-2 могут появляться у пациентов с высоким уровнем ревматоидного фактора или антител НАМА, что подчеркивает значимость персонифицированной комплексной диагностики для пациентов с тяжелым течением COVID-19.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о высокой актуальности проведения комбинированных тестов на определение N-антигена SARS-CoV-2 и антител к данному вирусу применительно к экстренным больным инфекционной пневмонией при поступлении, так как:

- 1) чувствительность и специфичность теста на N-Ag

сопоставима с таковыми у ОТ-ПЦР-анализа мазков из носоглотки, а использование иммунохимических тестов в сочетании с ПЦР-тестами на SARS-CoV-2 обеспечивает значительное повышение общей чувствительности; 2) обработка образцов крови более безопасна для персонала из-за незначительного присутствия инфекционных частиц SARS-CoV-2 в крови, в отличие от мазков из носоглотки; 3) иммунохимические тесты, как правило, быстрее в исполнении, чем ОТ-ПЦР-тесты (при учете полного цикла обработки биоматериала и пробоподготовки), что ускоряет определение статуса SARS-CoV-2 для оперативного принятия решения о режиме ведения и мерах изоляции; кроме того, анализы сыворотки крови легче автоматизировать; 4) сбор образцов крови для иммуноферментной диагностики SARS-CoV-2 в условиях стационара не является дополнительной инвазивной процедурой, а проводится в рамках обязательного первичного обследования непосредственно при поступлении (а также заключительного обследования при выписке из стационара).

Литература

1. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
2. Laing N, Tufton H, Ochola E, P'Kingston OG, Maini MK, Easom N. Hepatitis B assessment without hepatitis B virus DNA quantification: a prospective cohort study in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113 (1): 11–17. DOI: 10.1093/trstmh/try117.
3. Thai KTD, Götz H, Slingerland BCGC, Klaasse J, Schutten M, GeurtsvanKessel CH. An analysis of the predictive value of the HIV Ag/Ab screening assay within the performance characteristics of the DiaSorin LIAISON XL for the detection of blood-borne viruses. *J Clin Virol*. 2018; 102: 95–100. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.02.018.
4. Loughlin L, Hellyer TP, White PL, et al. Pulmonary Aspergillosis in Patients with Suspected Ventilator-associated Pneumonia in UK Intensive Care Units [published online ahead of print, 2020 Jul 1]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 10.1164/rccm.202002-0355OC. DOI: 10.1164/rccm.202002-0355OC.
5. Edelstein PH, Jørgensen CS, Wolf LA. Performance of the ImmuView and BinaxNOW assays for the detection of urine and cerebrospinal fluid *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in patients with Legionnaires' disease or pneumococcal pneumonia and meningitis. *PLoS One*. 2020; 15 (8): e0238479. Published 2020 Aug 31. DOI: 10.1371/journal.pone.0238479.
6. Chiche L, Forel JM, Papazian L. The role of viruses in nosocomial pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24 (2): 152–56. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328343b6e4.
7. Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol*. 2004 Jun; 42 (6): 2629–35. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004.
8. Xiao-yan Che, Biao Di, Guo-ping Zhao, Ya-di Wang, Li-wen Qiu, Wei Hao, et al. A Patient with Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Antigenemia from the 2003–2004 Community Outbreak of SARS in Guangzhou, China. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43 (1): e1–e5. DOI: 10.1086/504943.
9. Приказ департамента здравоохранения города Москвы от 22 марта 2020 г. № 230 «Об утверждении регламентов (алгоритмов) работы медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы в период с 23 по 30 марта 2020 г. по оказанию медицинской помощи пациентам, заболевшим новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), и контактным с ними лицам». Доступно по ссылке: <https://rg.ru/2020/03/24/moscow-prikaz230-reg-dok.html>.

10. Приказ Департамента здравоохранения города Москвы от 06 апреля 2020 г. № 351 «О порядке выписки из медицинских организаций (стационаров), подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, пациентов с внебольничной пневмонией или коронавирусной инфекцией (COVID-19), для продолжения лечения в амбулаторных условиях (на дому)». Доступно по ссылке: <https://www.mos.ru/dzdrav/documents/department-acts/view/239550220/>.
11. Huang X, Liu X, Chen J, et al. Evaluation of Blood-Based Antibody Rapid Testing for HIV Early Therapy: A Meta-Analysis of the Evidence. *Front Immunol.* 2018; 9: 1458. Published 2018 Jun 26. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01458.
12. Le Hingrat Q, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, et al. Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection.* December 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.025.
13. Ogata AF, Maley AM, Wu C, Gilboa T, Norman M, Lazarovits R, et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease, *Clinical Chemistry.* 2020; 66 (12): 1562–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa213.

References

1. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* 2016; 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
2. Laing N, Tufton H, Ochola E, P'Kingston OG, Maini MK, Easom N. Hepatitis B assessment without hepatitis B virus DNA quantification: a prospective cohort study in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019; 113 (1): 11–17. DOI: 10.1093/trstmh/try117.
3. Thai KTD, Götz H, Slingerland BCGC, Klaasse J, Schutten M, GeurtsvanKessel CH. An analysis of the predictive value of the HIV Ag/Ab screening assay within the performance characteristics of the DiaSorin LIAISON XL for the detection of blood-borne viruses. *J Clin Virol.* 2018; 102: 95–100. DOI: 10.1016/j.jcv.2018.02.018.
4. Loughlin L, Hellyer TP, White PL, et al. Pulmonary Aspergillosis in Patients with Suspected Ventilator-associated Pneumonia in UK Intensive Care Units [published online ahead of print, 2020 Jul 1]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 10.1164/rccm.202002-0355OC. DOI: 10.1164/rccm.202002-0355OC.
5. Edelstein PH, Jørgensen CS, Wolf LA. Performance of the ImmuView and BinaxNOW assays for the detection of urine and cerebrospinal fluid *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in patients with Legionnaires' disease or pneumococcal pneumonia and meningitis. *PLoS One.* 2020; 15 (8): e0238479. Published 2020 Aug 31. DOI: 10.1371/journal.pone.0238479.
6. Chiche L, Forel JM, Papazian L. The role of viruses in nosocomial pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24 (2): 152–56. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328343b6e4.
7. Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun; 42 (6): 2629–35. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004.
8. Xiao-yan Che, Biao Di, Guo-ping Zhao, Ya-di Wang, Li-wen Qiu, Wei Hao, et al. A Patient with Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Antigenemia from the 2003–2004 Community Outbreak of SARS in Guangzhou, China, *Clinical Infectious Diseases.* 2006; 43 (1): e1–e5. DOI: 10.1086/504943.
9. Приказ департамента здравоохранения города Москвы от 22 марта 2020 г. № 230 «Об утверждении регламентов (алгоритмов) работы медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы в период с 23 по 30 марта 2020 г. по оказанию медицинской помощи пациентам, заболевшим новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), и контактным с ними лицам». Available from: <https://rg.ru/2020/03/24/moscow-prikaz230-reg-dok.html>. Russian.
10. Приказ Департамента здравоохранения города Москвы от 06 апреля 2020 г. № 351 «О порядке выписки из медицинских организаций (стационаров), подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, пациентов с внебольничной пневмонией или коронавирусной инфекцией (COVID-19), для продолжения лечения в амбулаторных условиях (на дому)». Available from: <https://www.mos.ru/dzdrav/documents/department-acts/view/239550220/>. Russian.
11. Huang X, Liu X, Chen J, et al. Evaluation of Blood-Based Antibody Rapid Testing for HIV Early Therapy: A Meta-Analysis of the Evidence. *Front Immunol.* 2018; 9: 1458. Published 2018 Jun 26. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01458.
12. Le Hingrat Q, Visseaux B, Laouenan C, Tubiana S, Bouadma L, Yazdanpanah Y, et al. Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection.* December 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.025.
13. Ogata AF, Maley AM, Wu C, Gilboa T, Norman M, Lazarovits R, et al. Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease, *Clinical Chemistry.* 2020; 66 (12): 1562–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa213.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЛУТАМАТЦИСТЕИНЛИГАЗЫ С КЛИНИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ю. А. Бочарова^{1,2} ✉

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

² Курская областная клиническая больница, Курск, Россия

Дисбаланс между образованием активных форм кислорода и их обезвреживанием лежит в основе окислительного стресса — патологического процесса, патогенетически связанного с развитием ишемического инсульта (ИИ) и последующими этапами постишемического повреждения тканей головного мозга. Целью настоящего исследования было изучение влияния частых полиморфных вариантов гена *GCLC* каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы на степень поражения головного мозга и клинические проявления у больных с ишемическим инсультом. У 589 пациентов с ишемическим инсультом было проведено генотипирование шести однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs12524494, rs17883901, rs606548, rs636933, rs648595 и rs761142 гена *GCLC* с помощью генетического анализатора MassARRAY-4. Установлено, что генотипы rs636933-G/A-A/A ($p = 0,009$) и rs761142-A/C-C/C ($p = 0,015$) ассоциированы с увеличением зоны инфаркта мозга. Генотипы rs12524494-G/G ($p = 0,05$) и rs606548-T/T ($p = 0,003$) ассоциировались с возникновением двух и более эпизодов ИИ. Генотип rs17883901-G/A был ассоциирован с более ранним дебютом ИИ ($p = 0,004$). Выявлены многочисленные ассоциации SNP гена *GCLC* с клиническими проявлениями болезни. Таким образом, полиморфные варианты гена *GCLC* являются значимыми ДНК-маркерами, влияющими на зону инфаркта мозга у больных ишемическим инсультом, ассоциированы с возрастом дебюта первого инсульта, числом перенесенных инсультов и клиническими проявлениями болезни.

Ключевые слова: ишемический инсульт, инфаркт мозга, редокс-гомеостаз, глутатион, глутаматцистеинлигаза, однонуклеотидный полиморфизм

Благодарности: автор выражает благодарность сотрудникам научно-исследовательского института генетической и молекулярной эпидемиологии Курского государственного медицинского университета А. В. Полонику, Ю. Э. Азаровой, Е. Ю. Клёсовой, М. А. Быкановой и О. Ю. Бушуевой за помощь в выполнении молекулярно-генетических исследований.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 5 от 25 июня 2012 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Александровна Бочарова
ул. Сумская, д. 45а, г. Курск, 305007; y_u_l_i_a_03@mail.ru

Статья получена: 21.01.2021 **Статья принята к печати:** 06.02.2021 **Опубликована онлайн:** 23.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.007

ASSOCIATIONS BETWEEN GLUTAMATE CYSTEINE LIGASE CATALYTIC SUBUNIT GENE POLYMORPHISMS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF ISCHEMIC STROKE

Bocharova YA^{1,2} ✉

¹ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

² Kursk Regional Clinical Hospital, Kursk, Russia

An imbalance between the production of reactive oxygen species and their neutralization lies at the core of oxidative stress implicated in ischemic stroke (IS) and the subsequent brain tissue damage. The aim of this study was to investigate the effects of common polymorphic variants of the glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene on the extent of brain damage and clinical manifestations in patients with ischemic stroke. A total of 589 ischemic stroke survivors were genotyped for 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *GCLC* gene, including rs12524494, rs17883901, rs606548, rs636933, rs648595 and rs761142, using a MassARRAY-4 analyzer. The study found that genotypes rs636933-G/A-A/A ($p = 0.009$) and rs761142-A/C-C/C ($p = 0.015$) were associated with an enlargement of the cerebral lesion size. Genotypes rs12524494-G/G ($p = 0.05$) and rs606548-T/T ($p = 0.003$) were associated with a risk of 2 or more IS episodes. Genotype rs17883901-G/A was associated with early onset of IS ($p = 0.004$). The study revealed multiple associations of *GCLC* SNPs with the clinical manifestations of ischemic stroke. Thus, *GCLC* polymorphisms are important DNA markers affecting the size of the cerebral lesion in patients with ischemic stroke and are associated with age at onset, the number of past strokes and the clinical manifestations of the disease.

Keywords: ischemic stroke, cerebral infarction, redox homeostasis, glutathione, glutamate cysteine ligase, single nucleotide polymorphism

Acknowledgements: the author thanks Polonikov AV, Azarova YuE, Klyosova EYu, Bykanova MA and Bushueva OYu of the Research Institute of Genetic and Molecular Epidemiology (Kursk State Medical University) for their help in conducting molecular genetic studies.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kursk State Medical University (Protocol № 5 dated June 25, 2012); all study participants gave voluntary informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yulia A. Bocharova
Sumskaia, 45a, Kursk, 305007; y_u_l_i_a_03@mail.ru

Received: 21.01.2021 **Accepted:** 06.02.2021 **Published online:** 23.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.007

Цереброваскулярная патология и в первую очередь ишемический инсульт (ИИ) представляют одну из ведущих причин смертности и инвалидизации трудоспособного населения в экономически развитых странах мира [1]. Этиология ишемического инсульта имеет мультифакторную природу, т. е. развитие болезни обусловлено сложным взаимодействием генетических и средовых факторов [2]. В многочисленных исследованиях показано, что нарушения

редокс-гомеостаза, проявляющиеся дисбалансом между образованием активных форм кислорода и их обезвреживанием, лежат в основе окислительного стресса — патологического процесса, патогенетически связанного с развитием ИИ, а также последующими этапами постишемического повреждения тканей головного мозга [3]. Хорошо известно, что окислительный стресс играет важную роль в патогенезе ИИ, особенно в его острой

фазе [4, 5], а нарушение метаболизма глутатиона — одного из самых мощных антиоксидантов организма — нередко служит причиной изменения редокс-гомеостаза и формирования окислительного стресса, что может иметь большое значение для формирования постиншемического поражения мозга [6, 7]. Дефицит глутатиона у пациентов, предрасположенных к ИИ, может быть связан с генетически детерминированными изменениями активности ферментов, вовлеченных в биосинтез глутатиона [8, 9]. Ключевым ферментом первого этапа биосинтеза глутатиона является глутаматцистеинлигаза. Она состоит из каталитической и модифицирующей субъединиц, кодируемых различными генами, полиморфные варианты которых оказывают влияние на активность фермента и соответственно уровень глутатиона. Однако до настоящего времени исследований по оценке влияния полиморфных вариантов генов метаболизма глутатиона на степень ишемического поражения головного мозга и клинические проявления инсульта не проводилось. Целью настоящего исследования было изучить влияние частых полиморфных вариантов гена каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы (*GCLC*) на степень поражения головного мозга и клинические проявления у больных с ИИ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужила выборка, включающая 589 пациентов (средний возраст больных ИИ составил 61,1 — 9,8 лет (330 мужчин и 270 женщин), перенесших ИИ и находившихся на стационарном лечении в Курской областной клинической больнице в период с 2007 по 2017 г. Критерии включения пациентов в основную группу: наличие диагноза ИИ, подтвержденного клиническими и инструментальными методами; славянское происхождение; наличие подписанного добровольного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие у пациента геморрагического инсульта; неславянское происхождение; отсутствие добровольного согласия на участие в исследовании. В исследование включали пациентов славянского происхождения (более 75% пациентов были русской национальности согласно анамнестическим данным о хотя бы двух предшествующих поколениях родственников пробандов). Диагноз ИИ был подтвержден на базе стационаров квалифицированными врачами-неврологами на основании данных неврологического статуса пациентов и результатов инструментального обследования: компьютерной томографии головного мозга и магнитно-резонансной томографии головного мозга.

Для генотипирования было отобрано шесть частых полиморфных вариантов rs12524494, rs17883901, rs606548, rs636933, rs648595 и rs761142 гена *GCLC*. Для отбора SNP на основании референтной гаплотипической структуры европеоидной популяции проекта HarMap использовали биоинформатический инструмент GenePipe [10]. Отбирали только tagSNP с частотой минорного аллеля не менее 5% и находящиеся в неравновесии по сцеплению с двумя и более SNP. Функциональную значимость SNP оценивали с помощью биоинформатической программы FuncPred (SNPinfo Web Server) [11].

Образцы ДНК пациентов были выделены из замороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции и преципитации этанолом. Молекулярно-генетические исследования, включая генотипирование SNP, были выполнены на

базе НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ в 2016–2017 гг. Определение SNP проводили с помощью технологии iPLEX посредством мультиплексного генотипирования на генетическом анализаторе MALDI-TOF MassARRAY 4 (Agena Bioscience; CLIA).

Влияние SNP на клинические проявления ИИ оценивали посредством расчета отношения шансов и 95%-х доверительных интервалов (95% CI) методом логистического регрессионного анализа с коррекцией по полу и возрасту с использованием онлайн-статистической программы SNPStats (Каталонский институт онкологии; Испания). Оценку влияния SNP на размер зоны поражения головного мозга (размер зоны инфаркта, выраженный в миллиметрах) у больных ИИ, измеренной с помощью магнитно-резонансной томографии, а также на возраст дебюта первого случая инсульта, число перенесенных инсультов, проводили с использованием программы SNPStats. Функциональное аннотирование полиморфных вариантов гена *GCLC* и оценку их регуляторного потенциала осуществляли с использованием различных биоинформатических инструментов, таких как GTEx portal [12] и eQTLGen [13], по тканеспецифичной экспрессии и регуляции генов. Эти ресурсы включают геномные и транскриптомные данные, которые можно использовать для оценки влияния анализируемых SNP на уровни экспрессии гена *GCLC* в головном мозге, артериях и крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ распределения частот генотипов SNP гена *GCLC* позволил установить статистически значимое отклонение от равновесия Харди–Вайнберга только одного полиморфизма rs648595 за счет снижения уровня фактической гетерозиготности ($p < 0,05$). Распределение частот (%) генотипов исследованных полиморфных вариантов гена *GCLC* в группе больных ИИ были следующими (в порядке: гомозиготы по референсному аллелю, гетерозиготы, гомозиготы по минорному аллелю): 93,5, 5,8 и 0,7 (rs12524494); 85,4, 13,7 и 1,0 (rs17883901); 93,7, 6,0 и 0,3 (rs606548); 63,5, 31,6 и 4,8 (rs636933); 16,3, 52,1 и 31,6 (rs648595) и 57,2, 37,8 и 4,9 (rs761142). С клинической точки зрения интерес представлял анализ потенциальной вовлеченности исследуемых полиморфных вариантов гена *GCLC* в патологические процессы, которые происходят после возникновения окклюзии мозговой артерии: формирование очага инфаркта мозга, зоны некроза и воспаления, а также процессы, имеющие отношение к репаративным изменениям постишемического повреждения мозговой ткани. В этой связи методом линейного регрессионного анализа нами были проанализированы взаимосвязи полиморфных вариантов гена *GCLC* с размером очага поражения мозга (S, мм) у больных с ИИ. Установлено, что SNP rs636933 и rs761142 гена *GCLC* статистически значимо ассоциированы с размером зоны поражения головного мозга у пациентов с ишемическим инсультом независимо от пола и возраста пациентов. В частности, носительство генотипов rs636933 G/A-A/A *GCLC* (доминантный эффект SNP), в сравнении с генотипом по аллелям дикого типа (G/G), было сопряжено со статистически значимым ($p = 0,009$) увеличением зоны инфаркта мозга на 196,36 мм. Генотипы A/C-C/C SNP rs761142 гена *GCLC* также характеризовались значимым влиянием ($p = 0,015$) на размер поражения головного мозга — увеличением S на 173,92 мм в сравнении с генотипом A/A (доминантный эффект SNP).

Затем мы проанализировали ассоциации полиморфных вариантов гена *GCLC* с числом перенесенных ИИ (табл. 1). Для этой цели группа больных была подразделена на две подгруппы: в 1-ю вошли пациенты с одним эпизодом ИИ, во 2-ю — пациенты с двумя и более эпизодами ИИ в анамнезе. Установлены статистически значимые ассоциации двух SNP с числом эпизодов перенесенного пациентами инсульта. Носители генотипов rs12524494-G/G и rs606548-T/T гена *GCLC* имели более высокий риск возникновения двух и более эпизодов ИИ, чем носители альтернативных генотипов (см. табл. 1).

Известно, что более ранний возрастной дебют любого мультифакторного заболевания может быть связан с влиянием генетических факторов [14]. Нами было исследовано, определяют ли полиморфные варианты гена *GCLC* возрастную манифестацию ИИ. С помощью метода линейного регрессионного анализа с поправкой на пол и возраст было установлено, что полиморфный вариант rs17883901 *GCLC* статистически значимо связан с возрастным дебютом ИИ. Так, полиморфизм rs17883901 гена *GCLC*, а именно генотип G/A был ассоциирован с более ранним ($56,8 \pm 1,65$ против $60,52 \pm 0,42$ года) дебютом первого эпизода ИИ ($p = 0,0038$; см. рисунок).

Затем методом логистического регрессионного анализа были проанализированы ассоциации полиморфных вариантов гена *GCLC* с клиническими проявлениями, развивающимися на фоне ИИ, включая нарушения двигательных функций и расстройства чувствительности. Установлены многочисленные статистически значимые ассоциации полиморфных вариантов гена *GCLC* с клиническими проявлениями ИИ. Нарушение чувствительности было ассоциировано с rs636933 *GCLC* (OR = 2,72; 95% CI: 1,01–7,33, $p = 0,032$). Нарушение температурной чувствительности у пациентов с ИИ было связано с полиморфными вариантами rs17883901 (OR = 0,27; 95% CI: 0,09–0,86; $p = 0,006$) и rs12524494 (OR = 2,25; 95% CI: 1,13–4,46; $p = 0,032$) гена *GCLC*. Нарушение тактильной чувствительности ассоциировалось с SNP rs12524494 (OR = 2,51; 95% CI: 1,27–4,99; $p = 0,016$) и rs606548 (OR = 2,36; 95% CI: 1,08–5,16; $p = 0,04$) гена *GCLC*. Нарушение движения мимических мышц ассоциировалось с SNP rs648595 (OR = 0,53; 95% CI: 0,34–0,81; $p = 0,0029$). Нарушение походки было связано с эффектами трех

SNP: rs648595 (OR = 1,67; 95% CI: 1,03–2,71; $p = 0,039$), rs761142 (OR = 1,50; 95% CI: 1,11–2,01; $p = 0,007$), rs636933 (OR = 1,39; 95% CI: 1,03–1,88; $p = 0,03$) гена *GCLC*. Мышечная слабость ассоциировалась с SNP rs761142 *GCLC* (OR = 1,46; 95% CI: 1,02–2,10; $p = 0,037$). Диплопия ассоциировалась с rs17883901 (OR = 0,12; 95% CI: 0,02–0,88; $p = 0,0028$). Косоглазие было связано с эффектами двух SNP: rs606548 (OR = 7,68; 95% CI: 1,32–44,56; $p = 0,04$) и rs12524494 (OR = 6,67; 95% CI: 1,23–36,24; $p = 0,05$) гена *GCLC*. Дизартрия ассоциировалась с SNP rs636933 (OR = 0,69; 95% CI: 0,48–0,99; $p = 0,04$). Нарушение зрения было связано с эффектом полиморфного варианта rs636933 гена *GCLC* (OR = 0,61; 95% CI: 0,39–0,94; $p = 0,023$).

Использование геномно-транскриптомных данных портала GTEx по гену *GCLC* позволило выявить статистически значимые cis-eQTLs (expression Quantitative Trait Loci) — локусы генома, ассоциированные с изменением его транскрипционной активности. В табл. 2 представлены результаты оценки влияния полиморфных вариантов на экспрессию гена *GCLC* в различных отделах мозга и артериях), а также в цельной крови. Установлено, что аллель rs648595-G ассоциирован со снижением экспрессии гена *GCLC* в базальных ганглиях ($p = 0,00002$) и коре головного мозга ($p = 0,000001$), а также в крови ($p = 1,2 \times 10^{-70}$). Аллель rs636933-A был ассоциирован со снижением экспрессии гена *GCLC* в базальных ганглиях головного мозга ($p = 0,00005$) и крови ($p = 2,1 \times 10^{-26}$). Аллель rs761142-C ассоциировался со снижением экспрессии гена *GCLC* в крови ($p = 5,2 \times 10^{-52}$), базальных ганглиях ($p = 0,000002$) и коре головного мозга ($p = 0,000004$). Однако SNP rs17883901 *GCLC* не был ассоциирован с экспрессией гена ни в одном из проанализированных видов тканей, имеющих отношение к патогенезу ИИ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках настоящего пилотного исследования проведена оценка влияния полиморфных вариантов гена ключевого фермента биосинтеза глутатиона — каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы на степень выраженности поражений головного мозга и клинические проявления ИИ. Установлено, что SNP rs636933 и rs761142 гена *GCLC* являются значимыми ДНК-маркерами,

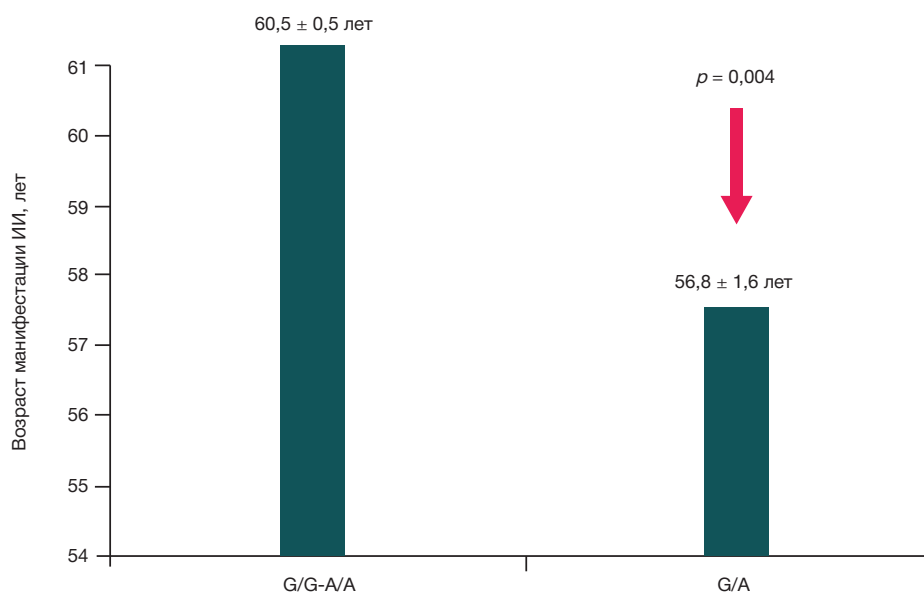


Рис. Ассоциация полиморфного варианта rs17883901 гена *GCLC* с возрастом манифестации ишемического инсульта

Таблица 1. Сводные данные по выявленным ассоциациям полиморфных вариантов гена *GCLC* с числом перенесенных ишемических инсультов

Ген (SNP ID)	Генотип, аллель	n (%)		<i>P</i> ¹	OR (95%CI) ²
		Больные с одним ИИ	Больные с двумя и более ИИ		
<i>GCLC</i> A>G (rs12524494)	A/A-A/G	518 (99,6)	65 (97)	0,05	1,00
	G/G	2 (0,4)	2 (3,0)		7,78 (1,07–56,42)
<i>GCLC</i> C>T (rs606548)	C/C-C/T	470 (100,0)	58 (96,7)	0,003	1,00
	T/T	0 (0,0)	2 (3,3)		40,2 (1,91–847,9)

Примечание: ¹ — уровень значимости ассоциации с риском развития двух и более ИИ с коррекцией по полу и возрасту; ² — отношения шансов и 95% доверительные интервалы ассоциаций SNP с риском развития двух и более ИИ с коррекцией по полу и возрасту.

ассоциированными с увеличением зоны инфаркта мозга у пациентов с ИИ. Кроме того, показано, что полиморфные варианты rs12524494 и rs606548 гена *GCLC* ассоциируются с увеличением частоты возникновения случаев ИИ. Полиморфизм rs17883901 гена *GCLC* статистически значимо ассоциирован с более ранним дебютом первого эпизода ИИ. Биоинформатический анализ выявил функциональную значимость отдельных полиморфных локусов, ассоциированных с исследуемыми фенотипами. Примечательно, что для описанных выше SNP обнаружен loss-of-function-эффект альтернативных аллелей на уровень экспрессии гена *GCLC* по результатам оценки геномно-транскриптомных данных портала GTEx, что свидетельствует о возможной связи увеличения зоны поражения со снижением экспрессии данных генов в данном отделе головного мозга. Таким образом, полученные данные указывают на тот факт, что полиморфные варианты гена фермента биосинтеза глутатиона — каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы являются значимыми ДНК-маркерами, определяющими объем ишемического поражения головного мозга и формирование клинической картины болезни. Действительно, выявление взаимосвязей полиморфных вариантов гена *GCLC* с клиническими проявлениями и течением болезни представляет собой важный аспект генетико-эпидемиологических исследований и позволяет представить дополнительные подтверждения патофизиологической причастности исследуемого гена к патологии, глубже проникнуть в понимание молекулярных механизмов ее развития [15].

По данным литературы, дефицит глутатиона в головном мозге может иметь непосредственное отношение к увеличению восприимчивости мозговых тканей к окислительному повреждению при окклюзии мозговых артерий. Так, эксперименты, выполненные на культуре астроцитов, показали, что истощение пула глутатиона в клетках не влияет на жизнеспособность клеток, по крайней мере, в первые 24 ч, но значительно

увеличивает восприимчивость их к воздействию оксида азота или пероксинитрита [7]. *In vivo* избирательная частичная потеря глутатиона развивается во время очаговой церебральной ишемии и сохраняется во время реперфузии [7]. Причем время и степень истощения глутатиона ассоциируются с вероятностью последующего развития инфаркта ткани. Кроме того, установлено, что объем инфаркта мозга значительно уменьшается при интрацеребровентрикулярной инфузии моноэтилового эфира глутатиона — соединения, которое способно увеличить уровень митохондриального глутатиона [7]. Экспериментально доказано, что моноэтиловый эфир глутатиона обладает нейропротекторными свойствами при очаговой церебральной ишемии [16]. Таким образом, изменения глутатиона могут способствовать тяжести повреждения тканей при инсульте. Предполагается, что образующийся при окислительном повреждении мозговой ткани акролеин (высокотоксичный α , β -ненасыщенный альдегид) является одним из факторов повреждения нейронов, связанных с истощением внутриклеточных запасов восстановленного глутатиона у пациентов с инсультом [17].

ВЫВОДЫ

Полиморфные варианты rs636933 и rs761142 гена *GCLC* являются значимыми маркерами, определяющими увеличение зоны инфаркта мозга у больных с ИИ. Носительство генотипов rs12524494-G/G и rs606548-T/T сопряжено с увеличением частоты возникновения случаев ИИ, генотип rs17883901-G/A *GCLC* связан с более ранним дебютом первого эпизода ИИ. Все исследованные нами SNP гена *GCLC* были статистически значимо ассоциированы с клиническими проявлениями ИИ, включая нарушения двигательных функций и расстройства чувствительности, что демонстрирует причастность SNP гена *GCLC* к патогенезу болезни. Выявленные биоинформатическими методами loss-of-function-эффекты аллелей могут указывать

Таблица 2. Влияние полиморфных вариантов на экспрессию *GCLC* в мозге, артериях и крови (<https://www.gtportal.org>)

Ген	Эффект. аллель ¹	SNP ID	Цельная кровь*		Артерии		Базальные ганглии		Мозжечок		Кора головного мозга	
			<i>p</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>beta</i>	<i>p</i>	<i>beta</i>	<i>p</i>	<i>beta</i>	<i>p</i>	<i>beta</i>
<i>GCLC</i>	A>G	rs12524494	$8,5 \times 10^{-18}$	-8,59	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>GCLC</i>	G>A	rs17883901	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>GCLC</i>	C>T	rs606548	$8,8 \times 10^{-16}$	-8,04	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>GCLC</i>	G>A	rs636933	$2,1 \times 10^{-26}$	-10,63	—	—	0,00005	-0,25	—	—	—	—
<i>GCLC</i>	T>G	rs648595	$1,2 \times 10^{-70}$	-17,77	—	—	0,00002	-0,24	—	—	0,000001	-0,21
<i>GCLC</i>	A>C	rs761142	$5,2 \times 10^{-52}$	-15,04	—	—	0,000002	-0,27	—	—	0,000004	-0,23

Примечание: ¹ — аллель, эффект которого оценивался на уровень экспрессии гена, выделен жирным шрифтом. Статистически значимые влияния SNP на экспрессию гена *GCLC* ($p \leq 0,05$) выделены жирным шрифтом. * — p — уровень значимости и Z — балл оценки влияния SNP на уровень экспрессии гена в крови (eQTLGen, www.eqtngen.org).

на то, что увеличение зоны поражения головного мозга связано именно со снижением экспрессии гена *GCLC* и формирующийся при этом дефицит глутатиона представляет собой тот неблагоприятный фактор, который способствует увеличению степени поражения головного мозга. В этой связи результаты исследования обосновывают необходимость организации и проведения клинических испытаний новой стратегии в лечении острого ИИ и профилактики тяжелых поражений головного мозга — внутривенного введения восстановленной формы

глутатиона, что может стать эффективным способом защиты нейронов от ишемических повреждений, вызванных окислительным стрессом. Кроме того, установленные клинико-генетические корреляции открывают возможности использовать данные ДНК-маркеры для индивидуальной оценки характера течения патологии и прогнозирования ее возможных исходов, подобрать персонализированные способы фармакологического лечения и профилактики осложнений, в том числе с учетом этногенетических особенностей пациентов [18].

Литература

1. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003 Jan; 2 (1): 43–53.
2. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. *Brain*. 2000 Sep; 123 (Pt 9): 1784–812.
3. Ciancarelli I, Di Massimo C, De Amicis D, Carolei A, Tozzi Ciancarelli MG. Evidence of redox unbalance in post-acute ischemic stroke patients. *Curr Neurovasc Res*. 2012 May; 9 (2): 85–90.
4. Chehaibi K, Trabelsi I, Mahdouani K, Slimane MN. Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016 Nov; 25 (11): 2585–93.
5. Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med*. 1998 Oct; 21 (4): 309–34.
6. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, Feuerhake W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Aug; 12 (5): 698–714.
7. Sims NR, Nilsson M, Muyderman H. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr*. 2004 Aug; 36 (4): 329–33.
8. Bocharova IA. An association study of three polymorphisms in the glutathione synthase (GSS) gene with the risk of ischemic stroke. *Research Results in Biomedicine*. 2020; 6 (4): 476–87.
9. Бочарова Ю. А., Азарова Ю. Э., Клёсова Е. Ю., Дроздова Е. Л., Солодилова М. А., Полоников А. В. Ген гамма-глутамилциклотрансферазы — ключевого фермента катаболизма глутатиона и предрасположенность к ишемическому инсульту: анализ ассоциаций с болезнью и функциональное аннотирование ДНК-полиморфизмов. *Медицинская генетика*. 2020; 19 (10): 32–39.
10. Биоинформатический инструмент GenePipe. Доступно по ссылке: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/selegene.html>.
11. Биоинформатическая программа FuncPred. Доступно по ссылке: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>.
12. Биоинформатический инструмент GTEx portal. Доступно по ссылке: <https://gtexportal.org>.
13. Биоинформатический инструмент eQTLGen. Доступно по ссылке: www.eqtlgen.org.
14. Ruse CE, Parker SG. Molecular genetics and age-related disease. *Age Ageing*. 2001 Nov; 30 (6): 449–54.
15. Janssens AC, van Duijn CM. Genome-based prediction of common diseases: advances and prospects. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 15; 17 (R2): R166–73.
16. Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 9; 354 (2): 163–5.
17. Liu JH, Wang TW, Lin YY, Ho WC, Tsai HC, Chen SP, et al. Acrolein is involved in ischemic stroke-induced neurotoxicity through spermidine/spermine-N1-acetyltransferase activation. *Exp Neurol*. 2020 Jan; 323: 113066.
18. Mirzaev K, Abdullaev S, Akmalova K, Sozaeva J, Grishina E, Shuev G, et al. Interethnic differences in the prevalence of main cardiovascular pharmacogenetic biomarkers. *Pharmacogenomics*. 2020; 21 (10): 677–94.

References

1. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003 Jan; 2 (1): 43–53.
2. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. *Brain*. 2000 Sep; 123 (Pt 9): 1784–812.
3. Ciancarelli I, Di Massimo C, De Amicis D, Carolei A, Tozzi Ciancarelli MG. Evidence of redox unbalance in post-acute ischemic stroke patients. *Curr Neurovasc Res*. 2012 May; 9 (2): 85–90.
4. Chehaibi K, Trabelsi I, Mahdouani K, Slimane MN. Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016 Nov; 25 (11): 2585–93.
5. Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med*. 1998 Oct; 21 (4): 309–34.
6. Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, Feuerhake W. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Aug; 12 (5): 698–714.
7. Sims NR, Nilsson M, Muyderman H. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr*. 2004 Aug; 36 (4): 329–33.
8. Bocharova IA. An association study of three polymorphisms in the glutathione synthase (GSS) gene with the risk of ischemic stroke. *Research Results in Biomedicine*. 2020; 6 (4): 476–87.
9. Bocharova YuA, Azarova YuE, Klesova EYu, Drozdova EL, Solodilova MA, Polonikov AV. Gen gamma-glutamylcyclotransferazy — ključevogo fermenta katabolizma glutationa i predraspolzozhennost' k ishemicheskomu insul'tu: analiz asociacij s bolezni'ju i funkcional'noe annotirovanie DNK-polimorfizmov. *Medicinskaja genetika*. 2020; 19 (10): 32–39. Russian.
10. Bioinformaticeskij instrument GenePipe. Available from: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/selegene.html>.
11. Bioinformaticeskaja programma FuncPred. Available from: <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>.
12. Bioinformaticeskij instrument GTEx portal. Available from: <https://gtexportal.org>.
13. Bioinformaticeskij instrument eQTLGen. Available from: www.eqtlgen.org.
14. Ruse CE, Parker SG. Molecular genetics and age-related disease. *Age Ageing*. 2001 Nov; 30 (6): 449–54.
15. Janssens AC, van Duijn CM. Genome-based prediction of common diseases: advances and prospects. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 15; 17 (R2): R166–73.

- 2008 Oct 15; 17 (R2): R166–73.
16. Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett*. 2004 Jan 9; 354 (2): 163–5.
 17. Liu JH, Wang TW, Lin YY, Ho WC, Tsai HC, Chen SP, et al. Acrolein is involved in ischemic stroke-induced neurotoxicity through spermidine/spermine-N1-acetyltransferase activation. *Exp Neurol*. 2020 Jan; 323: 113066.
 18. Mirzaev K, Abdullaev S, Akmalova K, Sozaeva J, Grishina E, Shuev G, et al. Interethnic differences in the prevalence of main cardiovascular pharmacogenetic biomarkers. *Pharmacogenomics*. 2020; 21 (10): 677–94.

ХАРАКТЕРИСТИКА *BRCA*-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Е. И. Новикова , Е. А. Кудинова, В. К. Боженко, В. А. Солодкий


Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия

Использование «стандартных» диагностических панелей, дающих возможность определять лишь несколько наиболее распространенных в популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, может приводить к появлению ложноотрицательных результатов из-за наличия других повреждений в кодирующих областях данных генов, что, в свою очередь, может привести к неадекватному выбору тактики лечения у больных раком молочной железы (РМЖ). Целью работы было выявить особенности *BRCA*-ассоциированного рака молочной железы в российской популяции. В исследование вошли пациенты с диагнозом РМЖ ($n = 4440$). На первом этапе методом ПЦР в реальном времени проведено скрининговое исследование всех пациентов на наличие восьми наиболее распространенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Далее при наличии у пациентов клинических признаков наследственного заболевания (КПНЗ) и отсутствии распространенных мутаций ($n = 290$) проводили исследование всей кодирующей части генов *BRCA1* и *BRCA2* методом секвенирования нового поколения (NGS). В 169 случаях (3,8%) были выявлены «стандартные» мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. В группе пациентов с КПНЗ частота выявленных «стандартных» мутаций составила 15,4%. Методом NGS у 40 из 290 больных РМЖ (13,8%) были обнаружены 33 редкие патогенные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Сделан вывод, что *BRCA*-ассоциированный РМЖ в российской популяции характеризуется широким спектром патогенных вариантов, который не ограничен мутациями, включенными в «стандартные» клинико-диагностические панели. Анализ всей кодирующей части генов *BRCA1* и *BRCA2* позволяет повысить эффективность выявления герминальных мутаций у больных РМЖ по крайней мере в 2 раза.

Ключевые слова: мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, секвенирование нового поколения, NGS, наследственный рак молочной железы

Вклад авторов: Е. И. Новикова — сбор клинического материала, проведение молекулярно-генетических исследований, анализ и статистическая обработка результатов, подготовка и написание текста статьи; Е. А. Кудинова — анализ литературы, анализ результатов исследования; В. К. Боженко — анализ результатов, редактирование текста статьи; В. А. Солодкий — планирование и анализ результатов исследования, редактирование текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНЦРП (протокол № 3 от 27 марта 2020 г.); все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие на его проведение.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Ивановна Новикова
ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997; e.novikova.mcrr@mail.ru

Статья получена: 02.01.2021 **Статья принята к печати:** 15.02.2021 **Опубликована онлайн:** 22.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.006

CHARACTERISTICS OF *BRCA*-ASSOCIATED BREAST CANCER IN THE POPULATION OF THE RUSSIAN FEDERATION

Novikova EI , Kudinova EA, Bozhenko VK, Solodkiy VA


Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (RSCR) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

"Standard" diagnostic panels allow identification of only a few of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations most common in a population. Therefore, tests relying on such panels may return false negative results, since the coding regions of these genes may have other defects. For breast cancer (BC) patients, false negative test results may translate into selection of inadequate therapy by their doctors. This study aimed to identify the features of *BRCA*-associated breast cancer in the population of the Russian Federation. The study included breast cancer patients ($n = 4440$). At the first stage, all patients were screened for the eight most common *BRCA1* and *BRCA2* genes mutations with the help of real-time PCR. Next, patients that exhibited clinical signs of a hereditary disease (CSHD) in the absence of common mutations ($n = 290$) had the entire coding regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes studied with next generation sequencing (NGS). "Standard" mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes were identified in 169 (3.8%) cases. In the CSHD group, such mutations were revealed in 15.4% of cases. NGS uncovered 33 rare pathogenic *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in 40 out of 290 breast cancer patients (13.8%). It was concluded that among the residents of the Russian Federation, the range of pathogenic variants of *BRCA*-associated breast cancer is wide, and it stretches beyond the mutations considered by the "standard" diagnostic panels. Analysis of the entire coding regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes allows increasing efficiency of detection of germline mutations in breast cancer patients at least twofold.

Keywords: *BRCA1* and *BRCA2* mutations, next-generation sequencing, NGS, hereditary breast cancer

Author contribution: Novikova EI — collection of clinical material, conducting molecular genetic studies, analysis and statistical processing of the results, preparation and writing of the article; Kudinova EA — analysis of literature, analysis of the research results; Bozhenko VK — analysis of the results, article text editing; Solodkiy VA — planning and analysis of the research results, article text editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the RSCR (minutes #3 of March 27, 2020); all patients included in the study signed a voluntary informed consent.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina I. Novikova
Profsoyuznaya, 86, Moscow, 117997; e.novikova.mcrr@mail.ru

Received: 02.01.2021 **Accepted:** 15.02.2021 **Published online:** 22.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.006

Главными факторами, влияющими на развитие рака молочной железы (РМЖ), являются гормональный статус и генетическая предрасположенность [1].

Большинство всех случаев заболевания приходится на спорадический (ненаследственный) РМЖ. Его отмечают у 90–95% заболевших. Наследственные формы,

характеризующиеся различными мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBN*, *ATM*, *PALB2* и др. [2, 3], выявляют у 5–10% пациентов с диагнозом РМЖ [2].

Наиболее часто наследственный характер РМЖ обусловлен наличием мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Эти гены кодируют белки, которые отвечают за процессы

репарации двунитевых разрывов ДНК, контролируют прохождение клеточного цикла, регулируют транскрипцию и апоптоз, поддерживая геномную стабильность [4]. Повреждения в данных генах увеличивают вероятность развития онкологических заболеваний, большая часть из которых возникает в молодом возрасте [5, 6]. Наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* во многом определяет выбор тактики лечения, а также профилактических мероприятий [7].

В настоящее время в России определение наследственных форм РМЖ осуществляют с помощью «стандартных» диагностических панелей, которые методом ПЦР позволяют быстро и сравнительно недорого обнаружить наиболее характерные для нашей популяции повреждения в генах *BRCA1* и *BRCA2* [8]. Однако ряд проведенных исследований указывает на наличие других клинически значимых мутаций, которые не определяются «стандартной» панелью, но также увеличивают онкологический риск, а, следовательно, их наличие требует специализированного подхода при лечении и профилактике заболеваний [9].

Целью работы было исследовать особенности *BRCA*-ассоциированного РМЖ в российской популяции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 4440 пациентов, которые проходили обследование и лечение в Российском научном центре рентгенорадиологии с 2010 по 2019 г. Критерий включения: наличие у пациента диагноза РМЖ. Критерий исключения: отказ пациента от участия в исследовании. Возраст манифестации заболевания пациентов варьировал от 20 до 90 лет (табл. 1). Всем пациентам проведено гистологическое исследование тканей опухоли, а также выполнен иммуно-гистохимический анализ (ИГХ) опухолевых образцов. При сборе анамнеза особое внимание уделяли факторам, указывающим на возможный наследственный характер заболевания.

На основании данных анамнеза, согласно рекомендациям Национальной онкологической сети США (NCCN) [7], была сформирована группа повышенного риска (с клиническими признаками наследственного заболевания (КПНЗ)), в которую вошли 1026 больных РМЖ в возрасте 20–90 лет. Пациента включали в группу повышенного риска, если он имел хотя бы один КПНЗ: молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет), наличие первично-множественных опухолей (РМЖ и/или рак яичников (РЯ)), онкологически отягощенный семейный анамнез (РМЖ и/или РЯ у родственников первой и/или второй степени родства), трижды негативный молекулярный подтип опухоли.

На первом этапе исследования у всех 4440 пациентов методом ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР) определяли наличие наиболее распространенных в российской популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*: 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*). Для выделения ДНК использовали наборы «М-Сорб» («Синтол»; Россия). Постановку РТ-ПЦР проводили с использованием панели реагентов «ОнкоГенетика BRCA» («ДНК-Технология»; Россия), включающей специфичные праймеры для детекции восьми исследуемых мутаций.

На втором этапе были обследованы 290 пациентов из группы повышенного риска возникновения РМЖ, у которых не были выявлены «стандартные» мутации на первом этапе исследования. Им проводили анализ

всей кодирующей части генов *BRCA1* и *BRCA2* методом высокопроизводительного секвенирования (NGS).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови с использованием реактивов «QIAamp DNA Blood Mini Kit» (Qiagen; Германия) по протоколу производителя. Рабочая концентрация ДНК составляла не менее 10 нг/мкл. Подготовку библиотек для секвенирования проводили по протоколу фирмы-производителя с использованием методики селективного захвата таргетных участков ДНК с помощью панели «TruSight Cancer» (Illumina; США) и набора реагентов «TruSight Rapid Capture» (Illumina; США).

Секвенирование подготовленных библиотек проводили на приборе «MiSeq» (Illumina; США) с использованием наборов реагентов «MiSeq Reagent Kits v2» (Illumina; США) методом парно-концевого чтения (2 × 151 пар оснований). Среднее покрытие исследуемых таргетных участков ДНК составило не менее 100×.

Обработка полученных после секвенирования данных, осуществленная с помощью стандартного программного обеспечения «MiSeq Reporter v2.5» (Illumina; США), позволила выявить в ряде образцов генетические нарушения в исследуемых регионах. Для снижения вероятности появления ошибок риды с низким качеством прочтения исключали из анализа. Аннотацию и классификацию выявленных генетических вариантов проводили с использованием программного обеспечения «Variant Studio 2.2» (Illumina; США).

Клиническую значимость выявленных генетических нарушений оценивали на основании критериев оценки «патогенности» генетических вариантов, предложенной Американским колледжем медицинской генетики (ACMG) [10], с учетом информации в доступных базах данных: «dbSNP» («The Single Nucleotide Polymorphism database»), «ClinVar» («Clinical Variation»), «HGMD» («Human Gene Mutation Database»), «BIC» («Breast Cancer Information Core»), «OMIM» («Online Mendelian Inheritance in Man»), «ExAC» («Exome Aggregation Consortium»), «1000G» («1000 Genomes Project») и программ предсказания патогенности «CADD» («Combined Annotation Dependent Depletion»), «PolyPhen» («Polymorphism Phenotyping») и «Sift» («Sorting Intolerant from Tolerant»). Генетические варианты, не имеющие клинического значения, а также имеющие неизвестное клиническое значение, в данной работе не рассматривали.

Для верификации выявленных изменений нуклеотидной последовательности использовали метод секвенирования по Сэнгеру. Анализ проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе «ABI PRISM 3100» (Applied Biosystems; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В общей группе пациентов с установленным диагнозом РМЖ ($n = 4440$) методом РТ-ПЦР у 169 человек, что составило 3,8%, были выявлены мутации, входящие в «стандартные» диагностические панели, в генах *BRCA1* и *BRCA2* (табл. 2). При анализе частоты «стандартных» мутаций в группе пациентов с КПНЗ отмечено, что частота данных генетических изменений в этой группе в 4 раза превысила уровень в общей группе и составила 15,4%. Показано, что наиболее распространенным вариантом была мутация 5382insC в гене *BRCA1*. Частота встречаемости данного варианта в общей группе составила 2,9%, а в группе пациентов с КПНЗ — 11,5%, т. е. он был обнаружен примерно у каждого девятого пациента

Таблица 1. Клиническая характеристика обследованной группы больных РМЖ

Характеристика	Больные РМЖ (n = 4440)
Возраст	
Средний возраст манифестации заболевания, лет	52 (20–90)
До 50 лет, чел. (%)	1332 (30)
51 год и старше, чел. (%)	3108 (70)
Семейный онкологический анамнез	
Отягощен, чел. (%)	533 (12)
Не отягощен, чел. (%)	3907 (88)
Диагноз	
ПМЗН (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ), чел. (%)	313 (7)
РМЖ, чел. (%)	4127 (93)
Молекулярный подтип опухоли	
ER(+) и/или PR(+)Her2(-), чел. (%)	2930 (66)
ER(+) и/или PR(+)Her2(+), чел. (%)	888 (20)
ER(-)PR(-)Her2(+), чел. (%)	222 (5)
ER(-)PR(-)Her2(-), чел. (%)	400 (9)
Гистологический тип опухоли	
Инвазивный протоковый РМЖ, чел. (%)	3330 (75)
Инвазивный дольковый РМЖ, чел. (%)	577 (13)
Другие, чел. (%)	533 (12)

Примечание: ПМЗН — первично-множественные злокачественные новообразования.

из группы повышенного риска. Среди выявленных «стандартных» мутаций вариант 5382insC обнаружен в 75% случаев. Остальные генетические варианты из «стандартной» диагностической панели встретились по крайней мере на порядок реже (табл. 2).

Анализ всей кодирующей области, а также регионов сплайсинга генов *BRCA1* и *BRCA2* методом высокопроизводительного секвенирования позволил выявить 33 клинически значимых генетических варианта у 40 из 290 (13,8%) больных РМЖ из группы повышенного риска. В 18 случаях мутации были обнаружены в гене *BRCA1* и представлены девятью вариантами нонсенс-мутаций, тремя вариантами делеций со сдвигом рамки считывания и двумя нарушениями в сайтах сплайсинга. В гене *BRCA2* патогенные варианты нуклеотидной последовательности были обнаружены у 22 пациентов и представляли собой семь вариантов нонсенс-мутаций, восемь вариантов делеций и инсерций со сдвигом рамки считывания и два нарушения в сайтах сплайсинга (табл. 3).

Среди выявленных генетических нарушений наиболее частым вариантом изменения нуклеотидной последовательности была мутация с.3607C>T в гене

BRCA1, обнаруженная в 7,5% случаев (у трех пациентов). Частота в спектре выявленных патогенных вариантов на уровне 5% была обнаружена для мутаций с.4689C>G и с.5224C>T — в гене *BRCA1*, с.1301_1304delAAAG, с.9089_9090insA и с.3283C>T — в гене *BRCA2*.

Частота встречаемости каждого из выявленных методом NGS патогенных вариантов сопоставима с частотой распространенных «стандартных» мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* (статистически значимые различия не обнаружены, $p > 0,05$), за исключением мутации 5382insC в гене *BRCA1*.

Учитывая имеющиеся сведения об особенностях *BRCA*-ассоциированного РМЖ, провели анализ некоторых клинических характеристик пациентов — носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* и морфологических характеристик опухоли (табл. 4). У 94% больных *BRCA1*-ассоциированным и у всех больных *BRCA2*-ассоциированным РМЖ наблюдали один или несколько признаков наследственного заболевания (возраст до 50 лет, онкологически отягощенный семейный анамнез, первично-множественные злокачественные новообразования, трижды негативный молекулярный подтип опухоли). У 6% пациентов клинические признаки наследственного заболевания отсутствовали.

Таблица 2. Частота встречаемости наиболее распространенных в популяции мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ

Ген	Название мутации (номенклатура BIC)	Число пациентов с мутацией в обследованной группе, чел.	Частота мутации, %	Число пациентов с мутацией в группе с КПНЗ, чел.	Частота мутации, %
<i>BRCA1</i>	5382insC	127	2,9	118	11,5
<i>BRCA1</i>	4153delA	5	0,1	4	0,4
<i>BRCA1</i>	300T>G	10	0,2	10	1,0
<i>BRCA1</i>	2080delA	8	0,2	8	0,8
<i>BRCA1</i>	185delAG	10	0,2	9	0,9
<i>BRCA1</i>	3819delGTAAA	8	0,2	8	0,8
<i>BRCA1</i>	3875delGTCT	–	–	–	–
<i>BRCA2</i>	6174delT	1	0,02	1	0,1
Всего		169	3,8	158	15,4

Таблица 3. Характеристика и частота редких патогенных вариантов нуклеотидной последовательности в генах *BRCA1* и *BRCA2* в группе больных РМЖ с признаками наследственного заболевания

Ген	Название генетического варианта (номенклатура HGVS)	Идентификационный номер (dbSNP)	Характеристика варианта	Число больных, чел.
<i>BRCA1</i>	c.4327C>T (p.Arg1443Ter)	rs41293455	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA1</i>	c.4689C>G (p.Tyr1563Ter)	rs80357433	нонсенс-мутация	2
<i>BRCA1</i>	c.5531-1G>A	rs80358048	мутация в сайте сплайсинга	1
<i>BRCA1</i>	c.3607C>T (p.Arg1203Ter)	rs62625308	нонсенс-мутация	3
<i>BRCA1</i>	c.5224C>T (p.Gln1721Ter)	rs878854957	нонсенс-мутация	2
<i>BRCA1</i>	c.4258C>T (p.Gln1420Ter)	rs80357305	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA1</i>	c.1687C>T (p.Gln563Ter)	rs80356898	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA1</i>	c.4165_4166delAG (p.Ser1389Terfs)	rs80357572	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA1</i>	c.3257T>G (p.Leu1086Ter)	rs80357006	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA1</i>	c.5152+1G>T	rs80358094	мутация в сайте сплайсинга	1
<i>BRCA1</i>	c.1510delC (p.Arg504Valfs)	rs80357908	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA1</i>	c.83_84delTG (p.Leu28Argfs)	rs80357728	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA1</i>	c.5314C>T (p.Arg1772Ter)	rs80357123	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA1</i>	c.763G>T (p.Glu255Ter)	rs80357009	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	8002A>T (p.Arg2668Ter)	rs276174900	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	6070C>T (p.Gln2024Ter)	rs80358844	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.6997_6998insT (p.Pro2334Thrfs)	rs754611265	инсерция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.3748_3749insA (p.Thr1251Asnfs)	rs397507683	инсерция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.5718_5719delCT (p.Leu1908Argfs)	rs80359530	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.1301_1304delAAAG (p.Lys437Ilefs)	rs80359277	делеция со сдвигом рамки считывания	2
<i>BRCA2</i>	c.9117G>A (p.Pro3039=)	rs28897756	мутация в сайте сплайсинга	1
<i>BRCA2</i>	c.9089_9090insA (p.Thr3033Asnfs)	rs397507419	инсерция со сдвигом рамки считывания	2
<i>BRCA2</i>	c.632-1G>A	rs81002820	мутация в сайте сплайсинга	1
<i>BRCA2</i>	c.4111C>T (p.Gln1371Ter)	rs80358659	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.7254_7255delAG (p.Arg2418Serfs)	rs80359644	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.3881T>A (p.Leu1294Ter)	rs80358632	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.8909G>A (p.Trp2970Ter)	–	нонсенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.8168A>G (p.Asp2723Gly)	rs41293513	миссенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.5633delA (p.Asn1878ThrfsTer31)	–	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.7007G>A (p.Arg2336His)	rs28897743	миссенс-мутация	1
<i>BRCA2</i>	c.658_659delGT (p.Val220Ilefs)	rs80359604	делеция со сдвигом рамки считывания	1
<i>BRCA2</i>	c.3283C>T (p.Gln1095Ter)	rs397507662	нонсенс-мутация	2
<i>BRCA2</i>	c.8437G>T (p.Gly2813Ter)	–	нонсенс-мутация	1

Сравнение групп пациентов с выявленными мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* показало, что в группе больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ средний возраст манифестации заболевания составил 42 года (20–82 года), а группа больных *BRCA2*-ассоциированным РМЖ характеризовалась более высоким средним возрастом начала заболевания — 44 года (25–79 лет). При этом в группе носителей мутаций в гене *BRCA2* у 87% пациентов установлена манифестация заболевания в молодом возрасте (до 50 лет), в то время как в группе больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ молодой возраст начала заболевания отмечен в 81% случаев.

Больше половины больных — носителей мутаций в генах *BRCA1* (63%) и *BRCA2* (74%) отметили наличие онкологических заболеваний (РМЖ/РЯ) у кровных родственников. Для носителей мутаций как в гене *BRCA1*, так и в гене *BRCA2* зафиксирована довольно высокая частота первично-множественных злокачественных

новообразований (в 22 и 30% случаев соответственно) (табл. 4).

Результаты исследования показали, что большая часть как *BRCA1*-ассоциированных (91%), так и *BRCA2*-ассоциированных опухолей (61%) относилась к инвазивному протоковому типу РМЖ (табл. 4). Однако при сравнении данных групп было отмечено преобладание инвазивного протокового гистологического типа опухоли у носителей мутаций в гене *BRCA1* (91%) по сравнению с носителями мутаций в гене *BRCA2* (61%) ($p = 0,0003$). Для *BRCA2*-ассоциированных опухолей, напротив, наблюдалось преобладание инвазивного долькового РМЖ (30%) по сравнению с *BRCA1*-ассоциированными опухолями (5%) ($p = 0,0005$).

Современная классификация молекулярных подтипов РМЖ основана на определении с помощью ИГХ уровней экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и эпидермального фактора роста (Her2). Данные

Таблица 4. Сравнение *BRCA1*- и *BRCA2*-ассоциированного РМЖ по основным клиничко-морфологическим характеристикам

Характеристика	<i>BRCA1</i> -ассоциированный РМЖ (n = 187)	<i>BRCA2</i> -ассоциированный РМЖ (n = 23)
Возраст		
Средний возраст манифестации заболевания, лет	42 (20–82)	44 (25–79)
До 50 лет, чел. (%)	152 (81)	20 (87)
51 год и старше, чел. (%)	35 (19)	3 (13)
Семейный онкологический анамнез		
Отягощен, чел. (%)	118 (63)	17 (74)
Не отягощен, чел. (%)	69 (37)	6 (26)
Диагноз		
ПМЗН (РМЖ/РМЖ или РМЖ/РЯ), чел. (%)	41 (22)	7 (30)
РМЖ, чел. (%)	146 (78)	16 (70)
Молекулярный подтип опухоли		
ER(+) и/или PR(+)Her2(-), чел. (%)	122 (65)	22 (96)*
ER(+) и/или PR(+)Her2(+), чел. (%)	9 (5)	0
ER(-)PR(-)Her2(+), чел. (%)	2 (1)	0
ER(-)PR(-)Her2(-), чел. (%)	54 (29)	1 (4)*
Гистологический тип опухоли		
Инвазивный протоковый РМЖ, чел. (%)	171 (91)	14 (61)*
Инвазивный дольковый РМЖ, чел. (%)	9 (5)	7 (30)*
Другие, чел. (%)	7 (4)	2 (9)
Наличие клинических признаков РМЖ		
С клиническими признаками заболевания, чел. (%)	176 (94)	23 (100)
Без клинических признаков заболевания, чел. (%)	11 (6)	0

Примечание: * — статистически значимые различия с группой больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ ($p < 0,05$); ПМЗН — первично-множественные злокачественные новообразования.

показатели, определенные в баллах, позволяют отнести РМЖ к одному из молекулярных подтипов, что, в свою очередь, во многом определяет тактику лечения и прогноз заболевания. В проведенном исследовании трижды негативный рак молочной железы (ТНПМЖ) был выявлен в 29% случаев (у 54 человек) *BRCA1*-ассоциированного РМЖ и лишь в 4% случаев (у одного человека) *BRCA2*-ассоциированного РМЖ. В настоящем исследовании почти все *BRCA2*-ассоциированные опухоли (96%) относились к люминальному подтипу и характеризовались экспрессией рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования согласуются с данными ранее опубликованных работ и подтверждают достаточно высокую частоту мутантных вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2* в российской популяции, наиболее распространенным из которых является мутация 5382insC в гене *BRCA1*, встречающаяся на порядок чаще остальных мутаций в данных генах [2, 3, 8]. Данный факт подтверждает предположение о славянском происхождении этого генетического варианта [2].

Среди редких патогенных мутаций, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования, наиболее частым вариантом изменения нуклеотидной последовательности была мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*. Данный генетический вариант описан в литературе и характеризуется высоким риском развития как РМЖ, так и рака яичника [11, 12].

Проведенный анализ международных и российских публикаций и баз данных показал, что в российских

исследованиях описано лишь несколько из выявленных редких генетических вариантов. Мутация с.3607C>T в гене *BRCA1* описана у пациентки из Санкт-Петербурга с диагнозом РМЖ, семейный анамнез которой онкологически отягощен [13]. Мутации с.5224C>T и с.5314C>T в гене *BRCA1* обнаружены в татарской популяции у пациентов с наследственным РМЖ и РЯ [14]. Мутации с.4689C>G, с.5152+1G>T — в гене *BRCA1*, с.6997_6998insT, с.7254_7255delAG и с.658_659delGT — в гене *BRCA2* были найдены у жителей Сибири и Дальнего Востока с наследственным РМЖ и РЯ [15]. Остальные выявленные методом NGS генетические варианты описаны лишь в зарубежных публикациях и базах данных.

Результаты проведенного исследования подтверждают, что для больных РМЖ — носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* характерно наличие КПНЗ, которые включают: молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет), наличие первично-множественных опухолей (РМЖ и/или РЯ), онкологически отягощенный семейный анамнез (РМЖ и/или РЯ у родственников первой и/или второй степени родства), трижды негативный молекулярный подтип опухоли. Отсутствие КПНЗ у 6% больных с мутациями в гене *BRCA1* может быть связано как с отсутствием у пациента данных об онкологических заболеваниях родственников, так и с возможностью появления этих мутаций *de novo*.

Для группы больных *BRCA2*-ассоциированным РМЖ был характерен более высокий средний возраст начала заболевания (44 года) по сравнению с группой больных РМЖ с мутациями в гене *BRCA1* (42 года), что согласуется с литературными данными. По результатам объединенного исследования, включившего в себя анализ патоморфологических характеристик опухоли и

клинических данных 3797 носителей мутаций в гене *BRCA1* и 2392 носителей мутаций в гене *BRCA2*, медиана возраста манифестации заболевания для *BRCA1*-ассоциированного РМЖ составила 40 лет, для *BRCA2*-ассоциированного РМЖ — 43 года [16].

Полученные в настоящем исследовании данные подтверждают, что большинство *BRCA*-ассоциированных опухолей относится к инвазивному протоковому гистологическому подтипу, однако среди *BRCA2*-ассоциированных опухолей преобладает инвазивный дольковый РМЖ по сравнению с *BRCA1*-ассоциированными опухолями [16].

Для носителей мутаций в гене *BRCA1* показано, что опухоль наиболее часто характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и эпидермального фактора роста (Her2), т. е. относится к ТНРМЖ по сравнению с большими РМЖ без повреждений в данном гене [16, 17]. В проведенном исследовании ТНРМЖ был выявлен в 29% случаев *BRCA1*-ассоциированного РМЖ, что статистически значимо различается с числом случаев ТНРМЖ у пациентов с мутацией в гене *BRCA2*. В настоящем исследовании почти все *BRCA2*-ассоциированные опухоли (96%) относились к

люминальному подтипу и характеризовались экспрессией рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR), что также свойственно для спорадического РМЖ [18].

ВЫВОДЫ

Таким образом, *BRCA*-ассоциированный РМЖ в российской популяции характеризуется широким спектром патогенных вариантов, который не ограничен мутациями, включенными в «стандартные» клинико-диагностические панели, подходящие скорее для первичного скрининга. Полученные результаты указывают на необходимость анализа всей кодирующей части генов *BRCA1* и *BRCA2*, что позволит повысить эффективность выявления герминальных мутаций у больных РМЖ по крайней мере в 2 раза. В связи с наличием определенных клинико-морфологических особенностей у *BRCA*-ассоциированного РМЖ в первую очередь такое исследование необходимо проводить пациентам, имеющим ранний возраст развития заболевания (до 50 лет), кровных родственников с онкологическими заболеваниями в анамнезе (РМЖ и РЯ), первично-множественные злокачественные новообразования (РМЖ и РМЖ и/или РЯ), трижды негативный молекулярный подтип опухоли.

Литература

1. Соухами Р. Л., Тобайас Дж. Рак и его лечение. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014; 440 с.
2. Имянитов Е. Н. Наследственный рак молочной железы. Практическая Онкология. 2010; 11 (4): 258–66.
3. Бит-Сава Е. М. Молекулярно-биологическое обоснование лечения *BRCA1/CHEK2/BLM*-ассоциированного и спорадического рака молочной железы [диссертация]. С-П., 2015; 237 с.
4. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of *BRCA1* and *BRCA2* and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006; 25 (43): 5864–74.
5. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopperet JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 1117–30.
6. Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al. Cancer risks for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105: 812–22.
7. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017; 15 (1): 9–20.
8. Батенева Е. И. Новая диагностическая панель для выявления наследственной предрасположенности к развитию рака молочной железы и рака яичников [диссертация]. М., 2015; 125 с.
9. Новикова Е. И., Снигирева Г. П., Солодкий В. А. Редкие мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у российских больных раком молочной железы. Медицинская генетика. 2017; 16 (9): 25–30.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17 (5): 405–24.
11. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, et al. Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994; 8: 399–404.
12. Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, et al. Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. 2003; 21 (4): 444–5.
13. Грудина Н. А., Голубков В. И., Тихомирова О. С. и др. Преобладание широко распространенных мутаций в гене *BRCA1* у больных семейными формами рака молочной железы Санкт-Петербурга. Генетика. 2005; 41: 405–10.
14. Бровкина О. И., Гордиев М. Г., Еникеев Р. Ф., Дружков М. О., Шигапова Л. Х., Шагимарданова Е. И. и др. Гены системы репарации: популяционные различия наследственных типов рака яичников и молочной железы, выявляемые методом секвенирования нового поколения. Опухоли женской репродуктивной системы. 2017; 3 (13): 61–67.
15. Кечин А. А. Разработка и применение метода определения мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы и раком яичников [диссертация]. Н., 2018; 118 с.
16. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2* (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21 (1): 134–47.
17. Любченко Л. Н., Батенева Е. И., Абрамов И. С., Емельянова М. А., Будик Ю. А., Тюляндина А. С. и др. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли. 2013; (2): 53–61.
18. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jocelyne Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *J Clin Oncol*. 2002. 20 (9): 2310–8.

References

1. Souhami RL, Tobajas Dzh. Rak i ego lechenie. M.: Binom. Laboratorija znaniy, 2014; 440 s. Russian.
2. Imyaninov EN. Nasledstvennyy rak molochnoj zhelezy. Prakticheskaja Onkologija. 2010; 11 (4): 258–66. Russian.

3. Bit-Sava EM. Molekularno-biologicheskoe obosnovanie lechenija BRCA1/SNEK2/BLM-associirovannogo i sporadicheskogo raka molochnoj zhelezy [dissertacija]. S-P., 2015; 237 s. Russian.
4. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006; 25 (43): 5864–74.
5. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopperet JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 1117–30.
6. Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105: 812–22.
7. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017; 15 (1): 9–20.
8. Bateneva EI. Novaja diagnosticheskaja panel' dlja vyjavlenija nasledstvennoj predispozitsionnosti k razvitiyu raka molochnoj zhelezy i raka jaichnikov [dissertacija]. M., 2015; 125 c. Russian.
9. Novikova EI, Snigireva GP, Solodkij VA. Redkie mutacii v genah BRCA1 i BRCA2 u rossijskih bol'nyh rakom molochnoj zhelezy. *Medicinskaja genetika*. 2017; 16 (9): 25–30. Russian.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17 (5): 405–24.
11. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994; 8: 399–404.
12. Manguoglu AE, Lülecı G, Özçelik T, Colak T, Schayek H, Akaydin M, et al. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Turkish breast/ovarian cancer patients. 2003; 21 (4): 444–5.
13. Grudinina NA, Golubkov VI, Tihomirova OS, i dr. Preobladanie shiroko rasprostranennyh mutacij v gene BRCA1 u bol'nyh semejnymi formami raka molochnoj zhelezy Sankt-Peterburga. *Genetika*. 2005; 41: 405–10. Russian.
14. Brovkina OI, Gordiev MG, Enikeev RF, Druzhkov MO, Shigapova LH, Shagimardanova EI, i dr. Geny sistemy reparacii: populacionnye razlichija nasledstvennyh tipov raka jaichnikov i molochnoj zhelezy, vyjavljaemye metodom sekvenirovanija novogo pokolenija. *Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy*. 2017; 3 (13): 61–67. Russian.
15. Kechin AA. Razrabotka i primenenie metoda opredelenija mutacij v genah BRCA1 i BRCA2 u bol'nyh rakom molochnoj zhelezy i rakom jaichnikov [dissertacija]. N., 2018; 118 c. Russian.
16. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21 (1): 134–47.
17. Ljubchenko LN, Bateneva EI, Abramov IS, Emelyanova MA, Budik YuA, Tjulandina AS, i dr. Nasledstvennyj rak molochnoj zhelezy i jaichnikov. *Zlokachestvennye opuholi*. 2013; (2): 53–61.
18. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jocelyne Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002. 20 (9): 2310–8.

АНАЛИЗ ЧАСТОТ 13 ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ *TP53* И *WRAP53* В РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХМ. В. Олькова^{1,2} ✉, В. С. Петрушенко², Г. Ю. Пономарев²¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова, Москва, Россия² Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия

В последнее десятилетие поиск и аннотация ассоциированных с фенотипом геномных полиморфизмов человека, а также изучение их популяционных частот стали особенно актуальными в связи с возможностью их применения в медицинской и популяционной генетике, фармакогеномике и эволюционной биологии. Целью исследования было рассчитать частоту и проанализировать распространенность в 28 российских популяциях 13 герминальных полиморфизмов двух генов — *TP53*, матрицы «хранителя генома» белка p53 и гена *WRAP53*, влияющего на производство белка p53. Были получены данные для 9 экзонных вариантов гена *TP53* (rs587781663, rs17882252, rs150293825, rs112431538, rs149633775, rs144340710, rs1042522, rs1800371, rs201753350), одного интронного полиморфизма (rs17881850), а также трех вариантов гена *WRAP53* (rs17880282, rs2287499, rs34067256). Для большинства популяций выборка была представлена числом более 50 человек (за исключением пяти популяций, в которых было обследовано от 30 до 49 человек). Популяционные частоты альтернативных аллелей изученных генных вариантов в большинстве российских популяций оказались близки к значениям частот этих аллелей в соответствующей их происхождению европейской или азиатской популяции из мировых баз данных. Исключение составили шесть популяций («Центральный Кавказ», «Дагестан», «северные русские», «юго-восточные русские», «татары» и «Закавказье»), в которых популяционные частоты альтернативных аллелей для большинства маркеров оказались повышенными. Для всех вышеперечисленных популяций, кроме «юго-восточных русских», характерно несоответствие аллелей полиморфизмов с повышенными частотами равновесию Харди–Вайнберга.

Ключевые слова: p53, TP53, WRAP53, онкомаркер, полиморфизм, популяционная частота, генетическая эпидемиология

Благодарности: О. П. Балановскому, заведующему лабораторией геномной географии Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, за руководство исследованием и правку статьи, всем донорам ДНК и АНО «Биобанк Северной Евразии» за предоставленную коллекцию образцов, а также Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия) за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Финансирование: исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (работы по фенотипированию образцов, созданию базы данных, анализу данных).

Вклад авторов: М. В. Олькова — дизайн, статистический анализ, написание текста статьи; В. С. Петрушенко — биоинформатический анализ, Г. Ю. Пономарев — экспериментальные работы.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Все образцы для исследования получены из «Биобанка Северной Евразии». От всех доноров получено добровольное информированное согласие.

✉ Для корреспонденции: Марина Викторовна Олькова
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; genetics@inbox.ru

Статья получена: 26.11.2020 Статья принята к печати: 12.12.2020 Опубликована онлайн: 12.01.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.001

ANALYSIS OF 13 *TP53* AND *WRAP53* POLYMORPHISM FREQUENCIES IN RUSSIAN POPULATIONSOlkova MV^{1,2} ✉, Petrushenko VS², Ponomarev GYu²¹ Research Centre of Medical Genetics (RCMG), Moscow, Russia² Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

In the last decade the search for and annotation of human genome polymorphisms associated with phenotype have become particularly important concerning the opportunity of their use in medical and population genetics, pharmacogenomics and evolutionary biology. The study was aimed to calculate the frequencies and analyze the prevalence of 13 germline polymorphisms of two genes, *TP53* encoding the genome-keeper p53 protein and *WRAP53* involved in regulation of p53 production, in 28 Russian populations. We obtained data on 9 exonic *TP53* variants (rs587781663, rs17882252, rs150293825, rs112431538, rs149633775, rs144340710, rs1042522, rs1800371, rs201753350), one intronic polymorphism (rs17881850), and three variants of *WRAP53* (rs17880282, rs2287499, rs34067256). In the majority of populations the sample size was over 50 people (except five populations with 30–49 surveyed people). The alternative alleles' population frequencies for studies genetic variants in most Russian populations were close to appropriate allele frequencies in European and Asian populations of similar origin taken from global databases. The exceptions were six populations ("Central Caucasus", "Dagestan", "northern Russians", "southeastern Russians", "Tatars" and "Transcaucasia") with increased alternative alleles' population frequencies. All listed populations except the population of "southeastern Russians" are characterized by polymorphisms with high allele frequencies not satisfying the Hardy–Weinberg principle.

Keywords: p53, TP53, WRAP53, tumor marker, polymorphism, population frequency, genetic epidemiology

Acknowledgement: we would like to express our appreciation to Oleg Balanovsky, head of the Genome Geography Laboratory of the Vavilov Institute of General Genetics for study management and manuscript editing, to all DNA donors and Biobank of North Eurasia for provided collection of samples, as well as 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 carried out as part of the public contract between the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the Research Centre of Medical Genetics (phenotyping of samples, database construction, data analysis).

Author contribution: Olkova MV — study design, statistical analysis, manuscript writing; Petrushenko VS — bioinformatics analysis, Ponomarev GYu — experiments.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. All samples were obtained from Biobank of North Eurasia. The informed consent was obtained from all donors.

✉ Correspondence should be addressed: Marina V. Olkova
Gubkina 3, Moscow, 119991; genetics@inbox.ru

Received: 26.11.2020 Accepted: 12.12.2020 Published online: 12.01.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.001

Ген *TP53* отвечает за синтез одного из самых известных опухолевых супрессоров — белка *p53*, играющего ключевую роль в поддержании генетической стабильности клетки и предотвращении развития рака. Однажды активированный в процессе повреждения клетки, *p53* запускает ряд клеточных реакций, направленных на восстановление и выживание клеток или, если восстановительный этап невозможен, на запрограммированную гибель клеток. Столь разнообразный плейотропный тканевый эффект белка *p53* обусловлен суммарным влиянием клеточных коэкспрессированных изоформ *p53*. К настоящему моменту описаны по меньшей мере 12 изоформ *p53*, образуемых путем альтернативной инициации трансляции, использования альтернативных промоторов и альтернативного сплайсинга [1]. Все изоформы белка *p53* содержат общий домен связывания с молекулой ДНК, но различные транс-активационный и ингибиторный домены, позволяющие им по-разному воздействовать на генную экспрессию [2].

Наследование в гене *TP53* аутосомно-доминантное, клинически связанное с риском развития синдрома Ли–Фраумени и других наследственных опухолевых синдромов. Подтверждено изменение чувствительности человека к определенным лекарственным препаратам при наличии ряда полиморфизмов этого гена (табл. 1).

Область гена *WRAP53*, содержащая как минимум три альтернативных промотора, располагается в регионе 13.1 короткого плеча 17-й хромосомы, частично перекрывая 5'-область гена *TP53*, по отношению к *WRAP53* расположенного на противоположно направленной цепи по принципу «голова к голове» [3]. Функция гена *WRAP53* двойственна. Во-первых, он кодирует антисмысловую РНК (*WRAP53α*), которая, воздействуя на первый экзон *TP53*, регулирует уровни мРНК *p53*, а также участвует в стимуляции выработки белка *p53* за счет воздействия на 5'-нетранслируемую область мРНК *p53* [4, 5]. Во-вторых, *WRAP53* отвечает за синтез белка *WRAP53β* (также называемого *WDR79* и *TCAB1*), который принадлежит к семейству *WD40*-протеинов. Этот белок обеспечивает целостность и нормальное функционирование телец Кахаля, необходимых для процесса созревания аппарата сплайсинга и биогенеза теломер [6–8]. *WRAP53β* также способствует накоплению фактора репарации *53BP1* в местах двухцепочечных разрывов ДНК, стимулируя восстановление структуры ДНК [9]. Белок *WRAP53β* предположительно обладает онкогенными свойствами, на что указывает его сверхэкспрессия в различных линиях раковых клеток, отсутствующая в норме [7, 8]. Следует отметить, что в настоящее время причастность этого белка к процессам онкогенеза подвергают сомнению: есть мнение, что сверхэкспрессия может быть вызвана участием *WRAP53β* в механизмах репарации ДНК при множественных разрывах ДНК, возникающих в случае развития в ткани онкологического процесса [7].

Для мутаций гена *WRAP53* характерен аутосомно-рецессивный тип наследования. Гомозиготное состояние по мутациям в этом гене может провоцировать развитие врожденного дискератоза, синдрома Ли–Фраумени.

Важная клиническая значимость генов *TP53* и *WRAP53* и частое обнаружение герминальных дефектов этих генов при различных распространенных онкопатологиях [10] объясняют необходимость изучения частот их распространения в популяциях разных стран. Частоты полиморфизмов указанных генов уже достаточно детально изучены в некоторых европейских странах и

США: подробную информацию о частотах как клинически значимых полиморфизмов, так и маркеров с пока еще неясным биологическим значением можно найти на сайтах таких проектов, как ClinVar [11] Национального центра биотехнологической информации США, Ensembl (совместный научный проект Европейского института биоинформатики и Института Сенгера) [12], Genome Aggregation Database (gnomAD) [13]. В России активно развивают сайт генетической энциклопедии, созданной сотрудниками Новосибирского государственного университета, «Генокарта» [14]. Наше исследование, посвященное изучению распространения и частот 13 полиморфизмов генов *TP53* и *WRAP53* в российских популяциях, направлено на расширение научных знаний в этой области применительно к популяциям, проживающим в нашей стране.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов ДНК

Образцы ДНК для исследования были предоставлены «Биобанком Северной Евразии» [15]. ДНК была выделена по стандартной методике фенол-хлороформного выделения из крови и слюны. В работу было включено 1785 образцов ДНК добровольцев, принадлежащих к 28 российским популяциям, которые по географическому положению проживания охватывают основные регионы России (табл. 2). Критерии включения в исследование: принадлежность добровольцев к определенной этнической группе (самоидентификация добровольцев и их предков с данной этнической группой на протяжении четырех и более поколений). Критерии исключения: образцы, не соответствующие критерию принадлежности к этнической группе. Так как работа предполагала изучение аутосомных маркеров, распределение по полу при подборе образцов не учитывали.

Каждая популяция насчитывала от 30 до 87 человек. Состав обследованных популяций представлен в табл. 2. Следует учитывать, что в связи с тем, что изучаемые гены *TP53* и *WRAP53* являются аутосомными, фактическое число включенных в работу аллелей было в два раза больше — от 60 до 174 аллелей для каждой популяции.

Отбор полиморфизмов для исследования

Список полиморфизмов в генах *TP53* и *WRAP53* был составлен на основе генных вариантов, входящих в базу данных ClinVar и имеющих подтвержденную клиническую значимость (за исключением интронного варианта гена *TP53* — rs17881850). Интронный вариант rs17881850 был включен в исследование для сравнения частот аллелей в популяционно-нейтральном полиморфизме с популяционными частотами генных вариантов с подтвержденной клинической значимостью. К сожалению, значительную часть полиморфизмов из первоначального списка пришлось исключить после генотипирования, т. е. в расчет частот в популяциях были включены только те маркеры, для которых генотипирование во всех популяциях прошло успешно.

Генотипирование

Все индивидуумы были генотипированы по девяти экзонным полиморфизмам гена *TP53* (rs587781663, rs17882252, rs150293825, rs112431538, rs149633775, rs144340710, rs1042522, rs1800371, rs201753350) и

Таблица 1. Основная информация о включенных в исследование маркерах, по данным ClinVar (NCBI)

Ген	Маркер	GRCh38.p12	Участок гена	Референс-нуклеотид	Альтернативный нуклеотид	Тип варианта полиморфизма	Аминокислотная замена	Клиническое значение полиморфизма (ClinVar)	Результат анализа в FATHMM	Проверенность маркера	Предрасположенность к заболеваниям
TP53	rs17881850	chr17:7669739	10-й интрон	G	A	Интронный	Нет	Нет информации	Нет расчета	Нет	Нет
	rs587781663	chr17:7670627	10-й экзон	C	T	Миссенс	Glu361Glu	Неясное значение	Нет расчета	Подтвержден	Синдром Ли-Фраумени и другие наследственные синдромы предрасположенности к онкологическим заболеваниям
	rs17882252	chr17:7670694	10-й экзон	C	T	Миссенс	Glu339Lys	Вероятно доброкачественный/неясный	CANCER	Подтвержден. Конфликтная интерпретация	
	rs150293825	chr17:7670695	10-й экзон	G	A	Сайленс	Phe338=	Доброкачественный/вероятно доброкачественный	CANCER	Подтвержден. Нет конфликтной интерпретации	
	rs112431538	chr17:7673767	7-й экзон	C	T	Миссенс	Glu285Lys	Патогенный/вероятно патогенный	CANCER	Подтвержден. Нет конфликтной интерпретации	
	rs149633775	chr17:7673773	7-й экзон	G	A	Миссенс	Arg283Cys	Неясное значение	CANCER	Проверен экспертами FDA	
	rs144340710	chr17:7674259	6-й экзон	T	C	Миссенс	Asp235Ser	Доброкачественный	CANCER	Проверен экспертами FDA	
	rs1042522	chr17:7676154	3-й экзон	G	C	Миссенс	Pro72Arg	Доброкачественный	CANCER	Находится в экспертной панели PharmacoGenomics Knowledgebase (PharmGKB)	
	rs1800371	chr17:7676230	3-й экзон	G	A	Миссенс	Pro47Ser	Доброкачественный	CANCER	Проверен экспертами FDA	
	rs201753350	chr17:7676387	2-й экзон	C	T	Миссенс	Val31Ile	Доброкачественный/вероятно доброкачественный/конфликтная интерпретация	CANCER	Подтвержден. Конфликтная интерпретация	
	rs17880282	chr17:7688679	2-й экзон	C	T	Миссенс	Pro11Ser	Доброкачественный/вероятно доброкачественный	PASSANGER/OTHER	Подтвержден. Нет конфликтной интерпретации	Синдром Ли-Фраумени, врожденный дискератоз
	rs2287499	chr17:7688850	2-й экзон	C	G	Миссенс	Arg68Gly	Доброкачественный	PASSANGER/OTHER	Подтвержден. Нет конфликтной интерпретации	
	rs34067256	chr17:7689055	2-й экзон	C	G	Миссенс	Pro136Arg	Доброкачественный/вероятно доброкачественный	PASSANGER/OTHER	Подтвержден. Нет конфликтной интерпретации	

Таблица 2. Частоты полиморфизмов генов *TP53* и *WRAP53* в исследуемых российских популяциях и референсных мировых популяциях

Популяция	Численность	rs17881850	rs587781663	rs17882252	rs150293825	rs112431538	rs149633775	rs144340710	rs1042522	rs1800371	rs201753350	rs17880282	rs2287499	rs34067256
Алтайцы	77	0,026	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,766	0,000	0,000	0,006	0,156	0,000
Башкиры	43	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,720	0,000	0,000	0,000	0,116	0,000
Белорусы и русские северо-западные	30	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,650	0,000	0,000	0,000	0,117	0,033
Буряты, хамнигане, якуты	57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,772	0,000	0,000	0,000	0,158	0,000
Центральный Кавказ	64	0,071	0,048	0,063	0,047	0,032	0,032	0,000	0,697	0,032	0,032	0,047	0,125	0,016
Чукчи и коряки	67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,657	0,000	0,000	0,000	0,313	0,000
Дагестан	79	0,025	0,013	0,019	0,013	0,013	0,013	0,000	0,643	0,019	0,025	0,013	0,165	0,025
Дальний Восток (народы Амура)	84	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,690	0,000	0,000	0,012	0,208	0,000
Карелы и вепсы	59	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,717	0,000	0,000	0,000	0,113	0,000
Казахи, каракалпаки, уйгуры, ногайцы	44	0,025	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,797	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000
Ханты, манси, ненцы	53	0,034	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,727	0,011	0,000	0,000	0,216	0,000
Коми и удмурты	84	0,006	0,006	0,006	0,000	0,012	0,000	0,000	0,645	0,006	0,000	0,006	0,232	0,000
Мари и чуваш	53	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,651	0,000	0,000	0,000	0,264	0,009
Монголы (халха)	49	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,688	0,000	0,000	0,000	0,198	0,020
Монголы (прочие группы) и калмыки	78	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,654	0,000	0,000	0,000	0,231	0,000
Мордва	40	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,700	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000
Русские северные	83	0,060	0,025	0,018	0,018	0,018	0,024	0,006	0,756	0,024	0,018	0,030	0,120	0,012
Русские юго-востока Центральной России	51	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,039	0,622	0,020	0,000	0,029	0,127	0,059
Русские юго-запада Центральной России	50	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,796	0,000	0,000	0,000	0,140	0,010
Русские севера Архангельской области	70	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,766	0,000	0,000	0,000	0,093	0,000
Сибирские татары	68	0,007	0,000	0,015	0,015	0,007	0,000	0,000	0,684	0,009	0,000	0,007	0,184	0,000
Таджики, памирские народы, ягнобцы	72	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,681	0,007	0,000	0,000	0,208	0,000
Татары	52	0,102	0,160	0,143	0,140	0,130	0,120	0,031	0,717	0,127	0,100	0,135	0,225	0,039
Закавказье	77	0,059	0,034	0,040	0,032	0,020	0,019	0,000	0,669	0,027	0,026	0,026	0,125	0,007
Туvinцы и тофалары	55	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,764	0,000	0,000	0,000	0,236	0,000
Украинцы	79	0,019	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,753	0,000	0,000	0,000	0,152	0,000
Узбеки, туркмены, киргизы	80	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,700	0,000	0,000	0,000	0,156	0,000
Западный Кавказ	87	0,012	0,006	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,622	0,000	0,000	0,000	0,149	0,011
Европа	Данные из NCBI, gnomAD	0,013	0,000	0,000	0,0005	0,00001	0,0003	0,0004	0,717	0,00	0,00001	0,0006	0,120	0,0001
Африка		0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,571	0,013	0,000	0,076	0,422	0,000
Азия		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,600	0,000	0,010	0,000	0,250	0,030

одному его интронному варианту (rs17881850), а также по трем полиморфизмам гена *WRAP53* (rs17880282, rs2287499, rs34067256). Генотипирование проводили с использованием технологии геномного анализа Illumina (Illumina Inc.; CLIA) на основе биочиповых тест-систем. Для исключения некачественно типированных образцов использовали стандартное пороговое значение GenCall score, равное 0,15.

Основные данные по включенным в исследование полиморфизмам

Вся информация по изучаемым полиморфизмам была получена с сайта Национального центра биотехнологической информации США [16], в частности, из публичного архива ClinVar [17] и базы данных Genome Aggregation Database (gnomAD) [18]. Положение полиморфизма в геноме человека было указано исходя из GRCh38.p12 версии сборки референсного генома (табл. 1).

Так как для некоторых полиморфизмов информация в открытых источниках была неполной, все маркеры были дополнительно исследованы методом функционального анализа с помощью скрытых марковских моделей для прогнозирования функциональных эффектов миссенс-вариантов белка на сайте fathmm (functional analysis through hidden Markov models) [19]. Для минимизации количества ложных срабатываний в анализе был выбран консервативный порог, равный $-3,0$. Полученные данные были внесены в табл. 1.

Математическая и статистическая обработка данных

Расчет популяционных частот альтернативных аллелей исследуемых полиморфизмов, расчет критерия χ^2 и p -значения для оценки равновесия частот генотипов в популяциях, согласно правилу Харди–Вайнберга, оценка нормальности распределения частот альтернативных аллелей в исследуемых популяциях были произведены с использованием среды RStudio R, версия 4.0.2 (RStudio; CLIA) и Microsoft Excel (Microsoft Corp.; CLIA). Различия считали значимыми при $p < 0,01$.

Многомерное шкалирование

Для двумерного представления взаиморасположения популяций в пространстве на основе полученных частот альтернативных аллелей изучаемых генетических маркеров *TP53* и *WRAP53* в статистическом пакете STATISTICA10 (StatSoft; CLIA) был проведен анализ методом многомерного шкалирования с применением генетических расстояний Нея, рассчитанных в программе DJ genetic (ФГБНУ «МГНЦ»; Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Расчет частот альтернативных аллелей исследуемых маркеров в российских популяциях

На основе данных генотипирования 28 российских популяций были рассчитаны частоты альтернативных аллелей по девяти экзонным полиморфизмам гена *TP53* (2-й экзон — rs201753350; 3-й экзон — rs1042522, rs1800371; 6-й экзон — rs144340710; 7-й экзон — rs112431538, rs149633775; 10-й экзон — rs587781663, rs17882252, rs150293825), одному интронному варианту *TP53*

(rs17881850), а также по трем полиморфизмам второго экзона гена *WRAP53* (rs17880282, rs2287499, rs34067256). Данные по полученным частотам альтернативных аллелей данных маркеров в популяциях отражены в табл. 2.

Взаимосвязь частот альтернативных аллелей и равновесия Харди–Вайнберга

Для оценки равновесия Харди–Вайнберга по изучаемым маркерам *TP53* и *WRAP53* в популяциях были произведены расчеты критерия χ^2 с учетом существующего соотношения аллелей и их рассчитанных по правилу Харди–Вайнберга частот в популяции. Для визуализации взаимосвязи частот альтернативных аллелей и равновесия Харди–Вайнберга была составлена табл. 3. В пяти из 28 исследованных популяций («Центральный Кавказ», «Дагестан», «северные русские», «татары» и «Закавказье») по большинству маркеров наблюдается сочетание повышенных (по сравнению с указанными в табл. 2 соответствующими им по происхождению референсными частотами в мировых популяциях) частот альтернативных аллелей и их неравновесного состояния в популяциях (оранжевые ячейки). Это позволяет предположить, что на состояние исследуемых аллелей в этих популяциях могли оказать влияние внешние факторы — например, случайный инбридинг. Ошибки при генотипировании также могут сказываться на полученных результатах.

В популяции «юго-восточные русские» наличие альтернативных аллелей было обнаружено для многих маркеров, их частоты также были выше, чем в референсной европейской популяции, однако состояние аллелей в популяции не отклонялось от равновесия Харди–Вайнберга.

В нескольких популяциях («коми и удмурты», «сибирские татары», «западный Кавказ») разнообразие найденных маркеров было выше, чем в соответствующих им по происхождению референсных популяциях, однако при этом их частоты были низкими, близкими к референсным, и подчинялись правилу Харди–Вайнберга. Среди исследуемых маркеров два (rs1042522, находящийся в третьем экзоне *TP53*, и rs2287499, принадлежащий второму экзону гена *WRAP53*) отличались высокими частотами и соответствием правилу Харди–Вайнберга во всех популяциях.

Оценка нормальности распределения частот альтернативных аллелей в популяциях

Так как нейтральные аллели теоретически не должны подвергаться воздействию отбора и их частоты в популяциях могут подчиняться закону нормального распределения, для дополнительной оценки нейтральности изучаемых альтернативных аллелей была выполнена оценка нормальности распределения частот маркеров в популяциях с помощью теста Шапиро–Уилка. Результаты теста позволили подтвердить гипотезу о нормальном распределении для двух маркеров — rs1042522 ($W = 0,95$, $p = 0,18$) и rs2287499 ($W = 0,97$, $p = 0,46$). Для остальных маркеров нормальность распределения не подтвердилась.

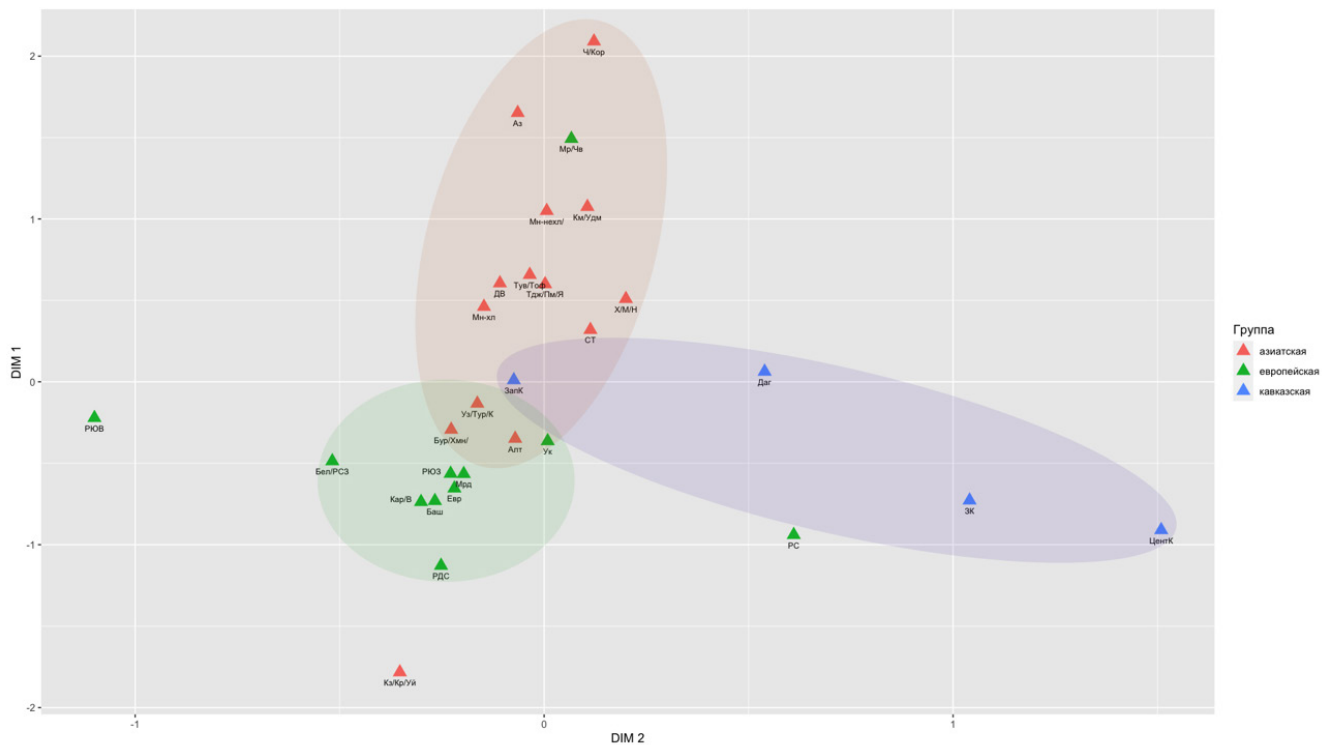
Анализ популяционных частот маркеров методом многомерного шкалирования (ММШ)

В нашем случае многомерное шкалирование — это способ наиболее эффективного размещения изучаемых

Таблица 3. Взаимоналожение частот маркеров в популяциях и оценка равновесия Харди-Вайнберга

Популяция	TP53										WPA53		
	rs17881850	rs587781663	rs17882252	rs150293825	rs112431538	rs149633775	rs144340710	rs1042522	rs1800371	rs201753350	rs17880282	rs2287499	rs34067256
Алтайцы	0,026	0	0,007	0	0	0	0	0,766	0	0	0,006	0,156	0
Башкиры	0	0,01	0	0	0	0	0	0,720	0	0	0	0,116	0
Белорусы и русские северо-западные	0,017	0	0	0	0	0	0,017	0,650	0	0	0	0,117	0,033
Буряты, хантгане, якуты	0	0	0	0	0	0	0	0,772	0	0	0	0,158	0
Центральный Кавказ	0,071	0,048	0,063	0,047	0,032	0,032	0	0,697	0,032	0,032	0,047	0,125	0,016
Чукчи и коряки	0	0	0	0	0	0	0	0,657	0	0	0	0,313	0
Дагестан	0,025	0,013	0,019	0,013	0,013	0,013	0	0,643	0,019	0,025	0,013	0,165	0,025
Дальний Восток (народы Амура)	0	0	0	0	0,006	0	0	0,690	0	0	0,012	0,208	0
Карелы и вепсы	0,025	0	0,008	0	0	0	0	0,797	0	0	0	0,042	0
Казахы, каракалпаки, уйгуры, ногайцы	0,034	0,011	0	0	0	0	0	0,727	0,011	0	0	0,216	0
Ханты, манси, ненцы	0	0	0	0	0	0	0	0,717	0	0	0	0,113	0
Коми и удмурты	0,006	0,006	0,006	0	0,012	0	0	0,645	0,006	0	0,006	0,232	0
Мари и чувашы	0	0	0	0	0	0	0	0,651	0	0	0	0,264	0,01
Монголы (халха)	0,010	0	0	0	0	0	0	0,688	0	0	0	0,198	0,02
Монголы (прочие группы) и калмыки	0	0	0	0	0	0	0	0,654	0	0	0	0,231	0
Мордва	0,013	0	0	0	0	0	0	0,700	0	0	0	0,125	0
Русские северные	0,060	0,025	0,018	0,018	0,018	0,024	0,01	0,756	0,024	0,018	0,030	0,120	0,012
Русские юго-востока Центральной России	0,010	0	0	0	0	0,010	0,039	0,622	0,02	0	0,029	0,127	0,059
Русские юго-запада Центральной России	0,020	0	0	0	0	0	0,01	0,796	0	0	0	0,140	0,010
Русские севера Архангельской области	0,029	0	0	0	0	0	0	0,766	0	0	0	0,093	0
Сибирские татары	0,007	0	0,015	0,015	0,007	0	0	0,664	0,009	0	0,007	0,184	0
Таджики, ламирские народы, ягнобцы	0,014	0	0	0	0	0	0	0,681	0,007	0	0	0,208	0
Татары	0,102	0,160	0,143	0,140	0,130	0,120	0,031	0,717	0,127	0,100	0,135	0,225	0,039
Закавказье	0,059	0,034	0,040	0,032	0,020	0,019	0	0,669	0,027	0,026	0,026	0,125	0,007
Туvinцы и тофалары	0,009	0	0	0	0	0	0	0,764	0	0	0	0,236	0
Украинцы	0,019	0	0,026	0	0	0	0	0,753	0	0	0	0,152	0
Узбеки, туркмены, киргизы	0,006	0	0	0	0	0	0	0,700	0	0	0	0,156	0
Западный Кавказ	0,012	0,006	0	0,006	0	0	0	0,622	0	0	0	0,149	0,011

Примечание: равновесие Харди-Вайнберга оценивали на основании значения p теста χ^2 ($p < 0,01$). Оранжевые ячейки — гипотеза о равновесии Харди-Вайнберга для альтернативного аллеля отвергается, зеленый — гипотеза не отвергается.



Алт	Алтайцы
Баш	Башкиры
Бел/РСЗ	Белорусы и русские северо-западные
Бур/Хмн/	Буряты, хамнигане, якуты
ЦентК	Центральный Кавказ
Ч/Кор	Чукчи и коряки
Даг	Дагестан
ДВ	Дальний Восток (народы Амура)
Кар/В	Карелы и вепсы
Кз/Кр/Уй	Казахи, каракалпаки, уйгуры, ногайцы
Х/М/Н	Ханты, манси, нэнцы
Км/Удм	Коми и удмурты
Мр/Чв	Мари и чуваш
Мн-хл	Монголы (халха)
Мн-нехл/	Монголы (прочие группы) и калмыки
Мрд	Мордва
РС	Русские северные
РЮВ	Русские юго-востока Центральной России
РЮЗ	Русские юго-запада Центральной России
РДС	Русские севера Архангельской области
СТ	Сибирские татары
Тдж/Пм/Я	Таджики, памирские народы, ягнобцы
ЗК	Закавказье
Тув/Тоф	Тувинцы и тофалары
Ук	Украинцы
Уз/Тур/К	Узбеки, туркмены, киргизы
ЗапК	Западный Кавказ
Евр	Европа
Аз	Азия

Рис. График многомерного шкалирования, основанный на матрице генетических расстояний Нея для 29 популяций (татарская и африканская были исключены из анализа из-за чрезмерно больших частотных различий с остальными популяциями). Уровень стресса составляет 0,068, алиенации — 0,058. Популяции разделены на три группы: азиатскую (красный треугольный значок), европейскую (зеленый треугольник) и кавказскую (синий значок). Соответственно группам популяций выделены кластеры: оранжевый — азиатские популяции, зеленый — европейские, синий — кавказские

популяций в пределах плоскости, позволяющий приблизительно оценить генетические расстояния между ними. ММШ выполнили для 29 популяций (татарская и африканская популяции были исключены ввиду резкого отличия частот их маркеров от данных для основного пула популяций) (см. рисунок). Для выполненного ММШ уровень стресса составил 0,068, а алиенации — 0,058.

Популяции были предварительно помечены как принадлежащие к одной из трех групп: азиатской, европейской и кавказской. Следует отметить группировку популяций на графике (см. рисунок) в зависимости от происхождения, позволившую выделить три соответствующих кластера — азиатский, европейский и кавказский. При этом в азиатском и европейском кластерах, имеющих значительную область пересечения, популяции расположены ближе друг к другу по значениям частот полиморфизмов, а в кавказском наблюдается большой разброс по частотам между популяциями.

Азиатский кластер имеет достаточно четкие границы. Единственное исключение — объединенная популяция, в состав которой входят казахи, каракалпаки, уйгуры и ногайцы; локация этой популяции вне кластера обусловлена более высоким содержанием в ней некоторых равновесных маркеров по сравнению с остальными азиатскими популяциями (табл. 3).

Европейский кластер имеет более компактную форму с высокой плотностью популяций вокруг центральной референсной европейской популяции, значения частот маркеров которой взяты из открытых источников. Три европейские популяции оказались вынесены далеко за пределы кластера — «северные русские», «юго-восточные русские» и объединенная популяция мари и чувашей. «Северные русские» — единственная европейская популяция, в которой наблюдались повышенные частоты многих маркеров, отсутствующих в других европейских популяциях, находящиеся при этом в неравновесном состоянии (табл. 3). Популяция «юго-восточные русские», для которой характерны повышенные частоты некоторых нетипичных для европейских популяций полиморфизмов, большинство из которых находится в равновесии Харди–Вайнберга (табл. 3), вынесена за пределы европейского кластера в противоположную сторону графика, по сравнению с популяцией «северные русские». «Мари и чувашей» оказались в глубине азиатского кластера, что, возможно, обусловлено антропологическим составом чувашей, в котором помимо индивидов европеоидного типа в значительной мере присутствуют индивиды монголоидного типа и смешанные формы.

Для всех популяций кавказского кластера, кроме популяции «Западный Кавказ», оказавшейся в области пересечения с азиатским кластером и поблизости от европейского кластера, характерно присутствие повышенных частот большинства анализируемых полиморфизмов в сочетании с их неравновесным состоянием в популяциях (табл. 3), что сближает их по указанным параметрам с «северными русскими» (см. рис.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполненное исследование полиморфизмов генов *TP53* и *WRAP53* в 28 популяциях, охватывающих все основные регионы России, позволило оценить частоту и распространенность включенных в исследование маркеров в разных российских регионах и народах.

Оценка частот альтернативных аллелей исследуемых маркеров в российских популяциях позволила выявить две основные тенденции:

- для двух из 13 исследованных маркеров (*rs1042522*, находящегося в третьем экзоне *TP53*, и *rs2287499*, принадлежащего второму экзону гена *WRAP53*) характерны высокие частоты во всех популяциях, нормальное распределение частот маркера в популяциях и соответствие аллелей равновесию Харди–Вайнберга;

- для пяти популяций («Центральный Кавказ», «Дагестан», «северные русские», «татары» и «Закавказье») частоты большинства маркеров (кроме упомянутых *rs1042522* и *rs2287499*, а также клинически доброкачественного *rs144340710* из 6-го экзона гена *TP53*) оказались повышенными, при этом аллели этих маркеров находились в неравновесном состоянии. В татарской популяции наличие, частоты и распространенность альтернативных аллелей изучаемых полиморфизмов оказались значительно выше референсных мировых значений, а также заметно отличались в большую сторону от частот и представленности этих полиморфизмов в основном пуле российских популяций (табл. 2). Указанный факт требует дальнейшего изучения.

Два широко распространенных и равновесных маркера, *rs1042522* в гене *TP53* и *rs2287499* во *WRAP53*, указаны в базе данных ClinVar как доброкачественные. Это значит, что частота маркера слишком высока, чтобы он мог быть патогенной мутацией; он встречается в гетеро- и гомозиготном состоянии в отсутствие тяжелого заболевания по этому гену; отсутствует ассоциация с заболеванием в исследованиях «положительный/отрицательный контроль» при статистически оптимальной выборке [20]. Тот факт, что альтернативный аллель полиморфизма *rs1042522*, входящего в состав ДНК-связывающего домена p53 [21], во всех популяциях доминирует по частоте по сравнению с референсным, может говорить о том, что в референсном геноме случайным образом оказался зафиксирован минорный аллель. Это предположение косвенно подтверждает упоминание о том, что альтернативный вариант Arg72 белка p53 обладает лучшей функциональной способностью индуцировать апоптоз и предупреждать развитие рака по сравнению с референсным Pro72 вариантом [22].

Несмотря на определение *rs1042522* и *rs2287499* в научных базах данных как клинически доброкачественных маркеров, в литературе встречается множество данных об их участии в онкогенезе. В частности, для полиморфизма p53 Pro72Arg (табл. 1) было показано, что гетерозиготный вариант Arg/Pro связан с повышенным риском развития меланомы по сравнению с гомозиготным вариантом Pro/Pro [23]; в другой работе была показана связь генотипа Pro/Pro данного маркера с повышенным риском немелкоклеточного рака легких у пациентов из Московской области [21].

Существует множество литературных источников, посвященных изучению выживаемости пациентов с онкологическими заболеваниями при гомо- и гетерозиготном состоянии по Pro72Arg, однако они также содержат противоречивую информацию. Есть свидетельства повышения среднего времени выживания у пациентов с раком шейки матки с генотипом Arg/Pro по сравнению с пациентами с генотипами Arg/Arg и Pro/Pro [24], однако обширное исследование датских ученых [25] показало отсутствие связи указанного полиморфизма с более низкой смертностью от рака и более низкой заболеваемостью раком в общей популяции.

Однако rs1042522 в большей степени известен как маркер, входящий в состав экспертной панели фармакогенетической базы данных Pharmacogenomics Knowledgebase, который связан с измененной реакцией организма на некоторые противоопухолевые препараты [26]. Есть данные о высокой корреляции аллеля p53 Pro с токсичностью при химиотерапии [27], а также о том, что генотипы Pro/Pro коррелируют с более низкой скоростью ответа на химиотерапию фторурацилом у пациентов с раком желудка по сравнению с генотипом Arg/Arg [28].

Клиническое значение маркера rs2287499 гена *WRAP53* менее изучено, однако есть свидетельства существования умеренного неравновесия по сцеплению между исследуемыми маркерами rs1042522 и rs2287499. Сочетание их гаплотипов CA/GC связано с повышенным риском рака молочной железы, а сочетание GA/CC, напротив, играет протективную роль при этом заболевании [29].

Представленность и частоты других исследованных полиморфизмов в российских популяциях достаточно сильно варьируют, но для большинства из них рассчитанные частоты соответствуют референсным значениям частот этих маркеров для азиатской и европейской популяций, в соответствии с происхождением рассмотренных российских популяций. Исключение составляют пять перечисленных выше популяций, в которых частоты этих маркеров повышены. Клиническое значение некоторых

изученных полиморфизмов (например, интронного варианта rs17881850) остается неясным, однако недавно появились сведения о том, что интронные полиморфизмы гена *TP53* также могут иметь клиническую значимость [30].

ВЫВОДЫ

Исследование позволило получить данные по частотам герминальных полиморфизмов генов *TP53* (10 маркеров из пяти экзонов и одного интрона) и *WRAP53* (три маркера из второго экзона) для 28 популяций России. Для большинства популяций полученные значения частот полиморфизмов близки к таковым в соответствующей их происхождению референсной мировой популяции (азиатской или европейской). Шесть популяций отличаются повышенными относительно референсных частотами маркеров («Центральный Кавказ», «Дагестан», «северные русские», «юго-восточные русские», «татары» и «Закавказье»), при этом во всех указанных популяциях, кроме «юго-восточных русских», аллели маркеров с повышенными частотами не подчиняются правилу Харди–Вайнберга. Для татарской популяции характерны особенно высокие частоты неравновесных аллелей полиморфизмов, что говорит о необходимости их более глубокого изучения в данной популяции для выяснения причины таких различий.

Литература

- Jorui SM, Bourdon JC. P53 isoforms: Key regulators of the cell fate decision. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2016; 6: 8.
- Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. OncoTargets and Therapy. 2013; 7: 57–68.
- Rassoolzadeh H. Unwrapping the role of WRAP53β in DNA damage response [Internet]. [Solna]; 2016. Available from: <http://ceder.graphics>.
- Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. Molecular Cell. 2009; 33 (4): 462–71.
- Farnebo M. Wrap53, a novel regulator of p53. Cell Cycle. 2009; 8 (15): 2343–6. DOI: 10.4161/cc.8.15.9223.
- Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53β: guardian of Cajal bodies and genome integrity. Front Genet. 2015; 6: 91. doi: 10.3389/fgene.2015.00091.
- Bergstrand S, O'Brien EM, Farnebo M. The Cajal body protein WRAP53β prepares the scene for repair of DNA double-strand breaks by regulating local ubiquitination. Front Mol Biosci. 2019; 6: 51. Published 2019 Jul 4. DOI:10.3389/fmolb.2019.00051.
- Mahmoudi S. WRAP53 unwrapped; roles in nuclear architecture and cancer. 2011.
- Coucoravas C, Dhanjal S, Henriksson S, Böhm S, Farnebo M. Phosphorylation of the Cajal body protein WRAP53β by ATM promotes its involvement in the DNA damage response. RNA Biol. 2017; 14(6): 804–13. DOI:10.1080/15476286.2016.1243647.
- Rogoża-Janiszewska E, Malińska K, Górski B, Scott RJ, Cybulski C, Kluźniak W, et al. Prevalence of germline TP53 variants among early-onset breast cancer patients from Polish population. Breast Cancer. 2020.
- rs2287499 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2287499#frequency_tab.
- rs2287499 (SNP) — Population genetics — Homo_sapiens — Ensembl genome browser 101 [Internet]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:7688350-7689350;v=rs2287499;vdb=v ariation;vf=87573072
- rs2287499 | gnomAD v2.1.1 | gnomAD [Internet]. Available from: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/rs2287499?dataset=gnomad_r2_1
- rs2287499 C>G | Генокарта — генетическая энциклопедия [Internet]. Available from: https://genokarta.ru/snp/rs2287499_CG.
- 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.
- National Center for Biotechnology Information [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- What is ClinVar? [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>.
- gnomAD [Internet]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
- fathmm — Home [Internet]. Available from: <http://fathmm.biocompute.org.uk/>.
- Pesaran T, Karam R, Huether R, Li S, Farber-Katz S, Chamberlin A, et al. Beyond DNA: an integrated and functional approach for classifying germline variants in breast cancer genes. Int J Breast Cancer. 2016; 2016: 2469523. DOI: 10.1155/2016/2469523.
- Zavarykina T, Byrdenny A, Loginov V, Atkarskaya M, Zhizhina G. A84: Polymorphic markers Arg72Pro and Gln157Lys of TP53 gene in nonsmall cell lung cancer. European Journal of Cancer Supplements [Internet]. 2015; 13 (1): 69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359634915001238>.
- Желтухин А. О., Чумаков П. М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53. 2010; 50: 447–516.
- Geng P, Liao Y, Ruan Z, Liang H. Increased risk of cutaneous melanoma associated with p53 Arg72pro polymorphism. PLoS ONE [Internet]. 2015; 10 (3): e0118112. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0118112>.
- Coelho A, Nogueira A, Soares S, Assis J, Pereira D, Bravo I, et al. TP53 Arg72Pro polymorphism is associated with increased overall survival but not response to therapy in Portuguese/Caucasian patients with advanced cervical cancer. Oncology

- Letters [Internet]. 2018; 15 (5): 8165–71. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8354/abstract>.
25. Kodal JB, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Nordestgaard BG, Bojesen SE. TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): rs1042522 - Clinical Annotations [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155173/clinicalAnnotation>.
 26. rs1042522 - Clinical Annotations [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155173/clinicalAnnotation>.
 27. Henríquez-Hernández LA, Murias-Rosales A, González-Hernández A, de León AC, Díaz-Chico N, Fernández-Pérez L. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Epidemiology*. 2010; 34 (5): 634–8. DOI: 10.1016/j.canep.2010.06.013.
 28. Huang ZH, Hua D, Li LH, Zhu J De. Prognostic role of p53 codon 72 polymorphism in gastric cancer patients treated with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134 (10): 1129–34. DOI: 10.1007/s00432-008-0380-8.
 29. Pouladi N, Abdolahi S, Farajzadeh D, Feizi MAH. Haplotype and linkage disequilibrium of TP53-WRAP53 locus in Iranian-Azeri women with breast cancer. Roemer K, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2019; 14 (8): e0220727. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220727>.
 30. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI, Mabimov N. Changes in non-coding sequences of the tp53 gene in diffuse large b-cell lymphoma. *Gematologiya i Transfusiologiya*. 2018; 63 (3): 239–49.
- ## References
1. Joruz SM, Bourdon JC. P53 isoforms: Key regulators of the cell fate decision. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016; 6: 8.
 2. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Oncotargets and Therapy*. 2013; 7: 57–68.
 3. Rassoolzadeh H. Unwrapping the role of WRAP53 β in DNA damage response [Internet]. [Solna]; 2016. Available from: <http://ceder.graphics>.
 4. Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Molecular Cell*. 2009; 33 (4): 462–71.
 5. Farnebo M. Wrap53, a novel regulator of p53. *Cell Cycle*. 2009; 8 (15): 2343–6. DOI: 10.4161/cc.8.15.9223.
 6. Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53 β : guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet*. 2015; 6: 91. doi: 10.3389/fgene.2015.00091.
 7. Bergstrand S, O'Brien EM, Farnebo M. The Cajal body protein WRAP53 β prepares the scene for repair of DNA double-strand breaks by regulating local ubiquitination. *Front Mol Biosci*. 2019; 6: 51. Published 2019 Jul 4. DOI:10.3389/fmolb.2019.00051.
 8. Mahmoudi S. WRAP53 unwrapped; roles in nuclear architecture and cancer. 2011.
 9. Coucoravas C, Dhanjal S, Henriksson S, Böhm S, Farnebo M. Phosphorylation of the Cajal body protein WRAP53 β by ATM promotes its involvement in the DNA damage response. *RNA Biol*. 2017; 14(6): 804–13. DOI:10.1080/15476286.2016.1243647.
 10. Rogoża-Janiszewska E, Malińska K, Górski B, Scott RJ, Cybulski C, Kluźniak W, et al. Prevalence of germline TP53 variants among early-onset breast cancer patients from Polish population. *Breast Cancer*. 2020.
 11. rs2287499 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2287499#frequency_tab.
 12. rs2287499 (SNP) — Population genetics — Homo_sapiens — Ensembl genome browser 101 [Internet]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:7688350-7689350;v=rs2287499;vdb=variation;vf=87573072
 13. rs2287499 | gnomAD v2.1.1 | gnomAD [Internet]. Available from: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/rs2287499?dataset=gnomad_r2_1.
 14. rs2287499 C>G | Genokarta — geneticheskaja enciklopedija [Internet]. Available from: https://genokarta.ru/snps/rs2287499_CG.
 15. Balanovskaya EV, Zhabagin MK, Agdzhoyan AT, Chukhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA et al. Populyacionnye biobanki: principy organizatsii i perspektivy primeneniya v genogeografii i personalizirovannoj mediczine. *Genetika*. 2016; 52 (12): 1371–87.
 16. National Center for Biotechnology Information [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
 17. What is ClinVar? [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>.
 18. gnomAD [Internet]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
 19. fathmm — Home [Internet]. Available from: <http://fathmm.biocompute.org.uk/>.
 20. Pesaran T, Karam R, Huether R, Li S, Farber-Katz S, Chamberlin A, et al. Beyond DNA: an integrated and functional approach for classifying germline variants in breast cancer genes. *Int J Breast Cancer*. 2016; 2016: 2469523. DOI: 10.1155/2016/2469523.
 21. Zavarykina T, Byrdennyy A, Loginov V, Atkarskaya M, Zhizhina G. A84: Polymorphic markers Arg72Pro and Gln157Lys of TP53 gene in nonsmall cell lung cancer. *European Journal of Cancer Supplements* [Internet]. 2015; 13 (1): 69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359634915001238>.
 22. Zheltuhin AO, Chumakov PM. Povsednevnye i inducirovemye funktsii gena p53. 2010; 50: 447–516.
 23. Geng P, Liao Y, Ruan Z, Liang H. Increased risk of cutaneous melanoma associated with p53 Arg72pro polymorphism. *PLoS ONE* [Internet]. 2015; 10 (3): e0118112. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0118112>.
 24. Coelho A, Nogueira A, Soares S, Assis J, Pereira D, Bravo I, et al. TP53 Arg72Pro polymorphism is associated with increased overall survival but not response to therapy in Portuguese/Caucasian patients with advanced cervical cancer. *Oncology Letters* [Internet]. 2018; 15 (5): 8165–71. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8354/abstract>.
 25. Kodal JB, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Nordestgaard BG, Bojesen SE. TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): rs1042522 - Clinical Annotations [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155173/clinicalAnnotation>.
 26. rs1042522 - Clinical Annotations [Internet]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166155173/clinicalAnnotation>.
 27. Henríquez-Hernández LA, Murias-Rosales A, González-Hernández A, de León AC, Díaz-Chico N, Fernández-Pérez L. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Epidemiology*. 2010; 34 (5): 634–8. DOI: 10.1016/j.canep.2010.06.013.
 28. Huang ZH, Hua D, Li LH, Zhu J De. Prognostic role of p53 codon 72 polymorphism in gastric cancer patients treated with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134 (10): 1129–34. DOI: 10.1007/s00432-008-0380-8.
 29. Pouladi N, Abdolahi S, Farajzadeh D, Feizi MAH. Haplotype and linkage disequilibrium of TP53-WRAP53 locus in Iranian-Azeri women with breast cancer. Roemer K, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2019; 14 (8): e0220727. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220727>.
 30. Voropaeva EN, Pospelova TI, Voevoda MI, Mabimov N. Changes in non-coding sequences of the tp53 gene in diffuse large b-cell lymphoma. *Gematologiya i Transfusiologiya*. 2018; 63 (3): 239–49.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОГО РУБЦА НА КОЖЕ У ПОВТОРНОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО РОДРАЗРЕШЕНИЯ

Е. С. Мишина¹✉, М. А. Затолокина¹, М. В. Мнихович², В. В. Харченко¹

¹ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Нарушение целостности кожного покрова под действием различных факторов неизбежно приводит к образованию соединительнотканного рубца. Под воздействием динамических факторов (растяжение, давление, повторно проведенные операции) рубец подвергается деформации, вследствие чего возможна дезорганизация его структурных компонентов и последующая его несостоятельность. Наиболее частой проблемой такого плана является несостоятельность рубцов у повторнородящих женщин, в анамнезе которых имеется хирургическое родоразрешение путем кесарева сечения. В литературе представлены результаты комплексного изучения рубцов на матке после операции кесарева сечения, в то время как морфологическое исследование кожного рубца у этих же беременных не проводилось. Целью работы было изучить морфофункциональные особенности соединительнотканного рубца на коже у повторнородящих женщин после оперативного родоразрешения. Исследовали фрагмент кожного рубца у 30 женщин после кесарева сечения. У женщин в одной возрастной группе утолщение волокон было прямопропорционально числу родов. При сравнении разных возрастных групп с одинаковым числом родов наблюдали истончение коллагеновых волокон, а также увеличение плотности волокон коллагена 3-го типа. Наиболее выраженные изменения выявлены у женщин с тремя и более родоразрешениями. Можно предположить, что под влиянием кратности растяжений кожи происходит структурная перестройка соединительнотканного рубца в виде истончения и дезорганизации волокнистых структур, что может косвенно говорить о несостоятельности послеоперационного рубца.

Ключевые слова: соединительнотканый рубец, кожа, коллагеновые волокна, регенерация, растяжение, кесарево сечение

Вклад авторов: Е. С. Мишина — дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; М. А. Затолокина, М. В. Мнихович, В. В. Харченко — концепция и редактирование текста; все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 10 июня 2019 г.), выполнено с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека; все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Мишина
ул. Карла Маркса, д. 3, г. Курск, 305041; katusha100390@list.ru

Статья получена: 11.12.2020 **Статья принята к печати:** 12.01.2021 **Опубликована онлайн:** 22.01.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.002

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CUTANEOUS CONNECTIVE TISSUE SCARS IN WOMEN WITH PAST HISTORY OF CHILDBIRTH AFTER CESARIAN DELIVERY

Mishina ES¹✉, Zatolokina MA¹, Mnikhovich MV², Kharchenko VV¹

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

The inevitable outcome of skin injuries caused by a variety of external factors is the formation of a connective tissue scar. A scar can deform when exposed to stretching, pressure or repeat surgeries and undergo structural changes leading to its dehiscence. Scar dehiscence is a common problem seen in women with a past history of cesarean delivery. There have been comprehensive studies of uterine scars formed after the C-section, but the morphology of cutaneous C-section scars has not yet been investigated. The aim of this study was to look into the morphology of connective tissue scars in multiparas with a past history of cesarean delivery. Specimens of cutaneous scars were collected from 30 women after the C-section. Within one age group, fiber thickness was directly proportional to the number of previous deliveries. Comparison of different age groups with the same number of previous deliveries revealed the thinning of collagen fibers and the increased density of type III collagen fibers. The most pronounced changes were observed in women with a history of 3 or more deliveries. We hypothesize that a connective tissue scar undergoes structural transformation, becomes thinner, and its fibers dissociate due to repeated skin stretching, which might indirectly suggest the dehiscence of the postoperative scar.

Keywords: connective tissue scar, skin, collagen fibers, regeneration, stretching, cesarean section

Author contribution: Mishina ES — study design; collection and processing of specimens; data analysis; manuscript preparation; Zatolokina MA, Mnikhovich MV, Kharchenko VV — study concept; manuscript editing. The final version of the manuscript was approved by all the authors.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Regional Ethics Committee of Kursk State Medical University (Protocol № 4 dated June 10, 2019). The study complied with the ethical standards for medical research studies involving humans. Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Mishina
Karl Marx, 3, Kursk, 305041; katusha100390@list.ru

Received: 11.12.2020 **Accepted:** 12.01.2021 **Published online:** 22.01.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.002

При различных повреждениях кожи неизбежно происходит формирование соединительнотканного рубца [1–3]. Некоторые виды рубцов, такие как гипертрофические или келлоидные, могут вызывать эстетический дискомфорт, а незрелость рубцовой ткани может приводить к более тяжелым хирургическим осложнениям. Организация и морфологическая структура новообразованной ткани

зависит не только от вида повреждающего фактора, но и от длительности и кратности его воздействия [4–10]. Этим может быть обусловлена несостоятельность швов, образование послеоперационных грыж и развитие других патологических процессов [11, 12]. Расширение показаний к кесареву сечению неизбежно ведет и к увеличению числа женщин репродуктивного возраста с рубцом на

матке, что является частым показанием для повторного родоразрешения оперативным путем [13]. В ряде случаев подобные хирургические вмешательства сопровождаются дополнительными манипуляциями, такими как укрепление брюшной полости или пластика женских половых органов, так как наиболее распространенным осложнением является несостоятельность рубца [14–17]. В связи с вышеизложенным актуальным становится изучение морфологических особенностей соединительнотканых рубцов кожи у повторнородящих женщин и особенностей их перестройки.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняло участие 30 пациенток Курского городского родильного дома. Критерии включения в исследование: отсутствие у женщины акушерской и гинекологической патологии; родоразрешение путем кесарева сечения. Критерии исключения: преждевременные роды, наличие у женщин системных заболеваний соединительной ткани. Распределение женщин по возрасту представлено на рис. 1.

Средний возраст пациенток составил $33,1 \pm 3,93$ лет, средний рост — $164,3 \pm 6,47$ см, вес — $74,57 \pm 3,13$ кг, средний ИМТ — $0,28 \pm 0,05$ кг/м². При изучении акушерского анамнеза женщин было установлено, что общее число беременностей составило 89 случаев, общее число родов — 77 случаев (из них 23 женщины (76,67%) имели по два хирургических родоразрешения; 6 женщин (20%) — по три хирургических родоразрешения, 1 женщина (3,33%) — четыре оперативных родоразрешения).

В зависимости от возраста и числа родоразрешений женщины были разделены на пять групп, по 1–12 женщин в каждой группе (табл. 1).

У всех 30 женщин после оперативного родоразрешения путем кесарева сечения производили забор кожного соединительнотканного рубца с прилегающим участком интактной кожи размером 3×6 см. Для световой микроскопии материал фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина. Заливку в парафин и микротомирование осуществляли по стандартным прописям. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гемаксином и эозином по методу Маллори. Для верификации в тканях коллагеновых волокон выполняли иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием специфичных кроличьих моноклональных антител к коллагену 1-го и 3-го типов (Novocastra; Германия). Окрашивание производили в гистостейнере LICA BOND MAX (Leica; Германия). На оцифрованных изображениях после их геометрической и оптической калибровки с помощью программы ImageJ 14,7a (National Institutes of Health; США) в каждом случае в 30 полях зрения ($\times 10$) измеряли толщину волокон, площадь, занимаемую коллагеновыми волокнами каждого типа, площадь межволоконных промежутков и затем вычисляли коэффициент плотности рубца по предложенной нами методике:

$$K = (S_{\text{к.в.}} / S_{\text{м.п.}}) \cdot 100\%,$$

где K — коэффициент плотности рубца;

$S_{\text{к.в.}}$ — площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами;

$S_{\text{м.п.}}$ — площадь, занимаемая межволоконными промежутками.

Далее анализировали клеточный состав соединительнотканного рубца. По кариологическим признакам ($\times 40$) дифференцировали клетки фибробластического

дифферона и клетки воспалительного ряда. Иммунофенотипирование клеток не проводили. Подсчет осуществляли на 100 клеток в нескольких непересекающихся полях зрения (не менее 10), с последующим расчетом средних значений. Статистический анализ проводили в лицензионной программе Statistika 10.0 (Stat Soft; Россия). Нормальность распределения определяли, используя критерии Колмагорова и Смирнова, а также критерий Шапиро–Уилка. О значимости различий судили по величине критерия Манна–Уитни для независимых выборок и считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ состояния волокнистых структур показал, что все соединительнотканые структуры состоят из зрелой грануляционной ткани. В группах I и III (см. табл. 1) волокна наиболее плотно расположены друг к другу, имеют равнонаправленную ориентацию. Во всех группах волокна достаточно толстые с плотными внутрифибриллярными структурами. Однако в функциональных группах II и V (см. табл. 1) основные волокна имеют большое количество более тонких ветвящихся волокон. На поперечном срезе все волокна имеют преимущественно округлую форму. При морфометрическом исследовании толщина коллагеновых волокон соединительнотканного рубца достоверно различалась. Наиболее толстые волокна имеют рубцы у женщин с тремя родоразрешениями в молодом репродуктивном возрасте. У женщин того же возраста, но с двумя родами толщина коллагеновых волокон в 1,2 раза меньше и составила $7,8 \pm 0,11$ мкм. Если рассматривать организацию рубцов, взятых у

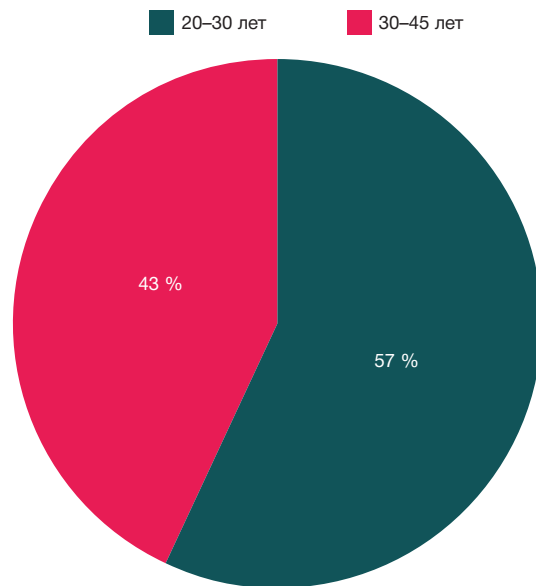


Рис. 1. Распределение рожениц по возрасту

Таблица 1. Распределение женщин по возрастным группам и числу оперативных родоразрешений

Возраст женщин	Число родов		
	2	3	4
20–30 лет	I группа	III группа	
31–40 лет	II группа	IV группа	V группа

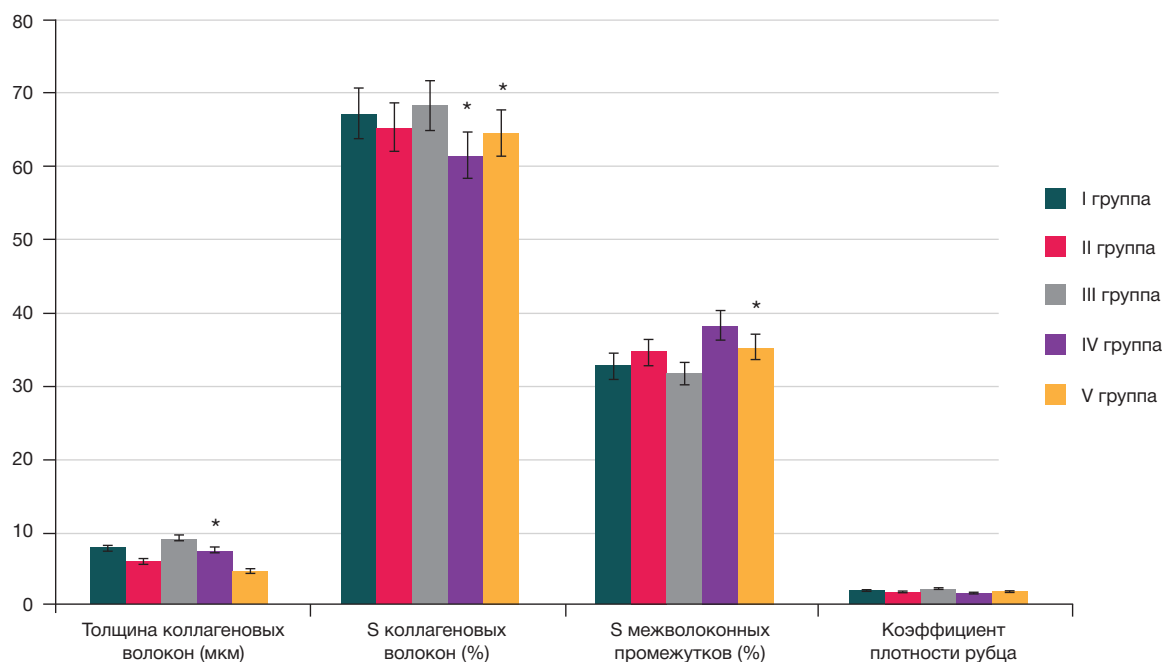


Рис. 2. Динамика морфометрических показателей волокнистого компонента. * — статистически значимые отличия от предыдущей функциональной группы ($p \leq 0,05$)

женщин позднего репродуктивного возраста, здесь наблюдается прямопропорциональное уменьшение толщины коллагеновых волокон в зависимости от числа родоразрешений — от $6,1 \pm 0,12$ до $4,7 \pm 0,1$ мкм.

При морфометрическом изучении соотношения площади коллагеновых волокон к площади межволоконных промежутков в послеоперационном рубце была определена более плотная организация соединительнотканых волокнистых структур у женщин после второго хирургического родоразрешения в раннем репродуктивном возрасте. Наименьший показатель наблюдали у женщин с тремя и четырьмя родоразрешениями в анамнезе. Вышеописанные морфометрические характеристики всех функциональных групп представлены на рис. 2.

При изучении фрагментов рубцов с помощью ИГХ-исследования выявлено уменьшение коллагена у пациенток со вторым и третьим родоразрешениями в позднем возрастном периоде. Преобладание коллагена 1-го типа определяется у женщин более молодого возраста (табл. 2).

При оценке динамики репаративных и воспалительных процессов в соединительнотканном рубце путем подсчета клеточного компонента соединительнотканного рубца можно говорить о том, что у всех женщин в рубце к окончанию срока гестации преобладают репаративные процессы коллагенообразования. Однако преобладание незрелых клеток фибробластического дифферона у женщин позднего репродуктивного возраста позволяет предположить, что процесс коллагеногенеза не завершен. Динамика изменений качественного состава клеточного

компонента соединительнотканного рубца представлена на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируя изменения структурных компонентов кожного соединительнотканного рубца, можно говорить об огрубении и утолщении коллагеновых волокон, которое прямопропорционально числу родов (группы I и III). При этом самый плотный рубец с наименьшими межволоконными промежутками был выявлен именно у молодых женщин с тремя родоразрешениями. При сравнении разных возрастных групп с одинаковым числом родов было отмечено истончение коллагеновых волокон. Наиболее выраженными оказались изменения в группах IV и V, т. е. у женщин с тремя и более родоразрешениями. При анализе состоятельности рубца на матке одними из важных показателей являются его толщина и однородность структуры [18]. Приведенный нами коэффициент плотности рубца включает в себя два важных показателя — это толщина самых волокон и межволоконные промежутки. Поэтому, чем больше величина данного показателя, тем больше толщина самого рубца и меньше, например, явление интерстициального отека, который и может увеличивать площадь между волокнами. Сопоставляя наши данные, можно косвенно судить о несостоятельности рубцовой ткани после третьего родоразрешения в молодом возрасте. Анализ распределения типов коллагена показал, что наибольшее количество волокнистых структур,

Таблица 2. Распределение типов коллагена соединительнотканного рубца

Группа наблюдения	Плотность коллагена 1-го типа	Плотность коллагена 3-го типа	Соотношение коллагенов 1-го и 3-го типов
I	$23,4 \pm 1,1^*$	$20,7 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,32$
II	$19,6 \pm 0,76$	$18,9 \pm 1,3$	$1,03 \pm 0,1$
III	$23,4 \pm 1,1$	$25,9 \pm 1,2^*$	$0,9 \pm 0,07$
IV	$14,9 \pm 1,3^*$	$10,7 \pm 0,4^*$	$1,4 \pm 0,05$
V	$17,9 \pm 1,3$	$16,6 \pm 0,5$	$1,07 \pm 0,05$

Примечание: * — статистически значимые отличия от предыдущей функциональной группы ($p \leq 0,05$).

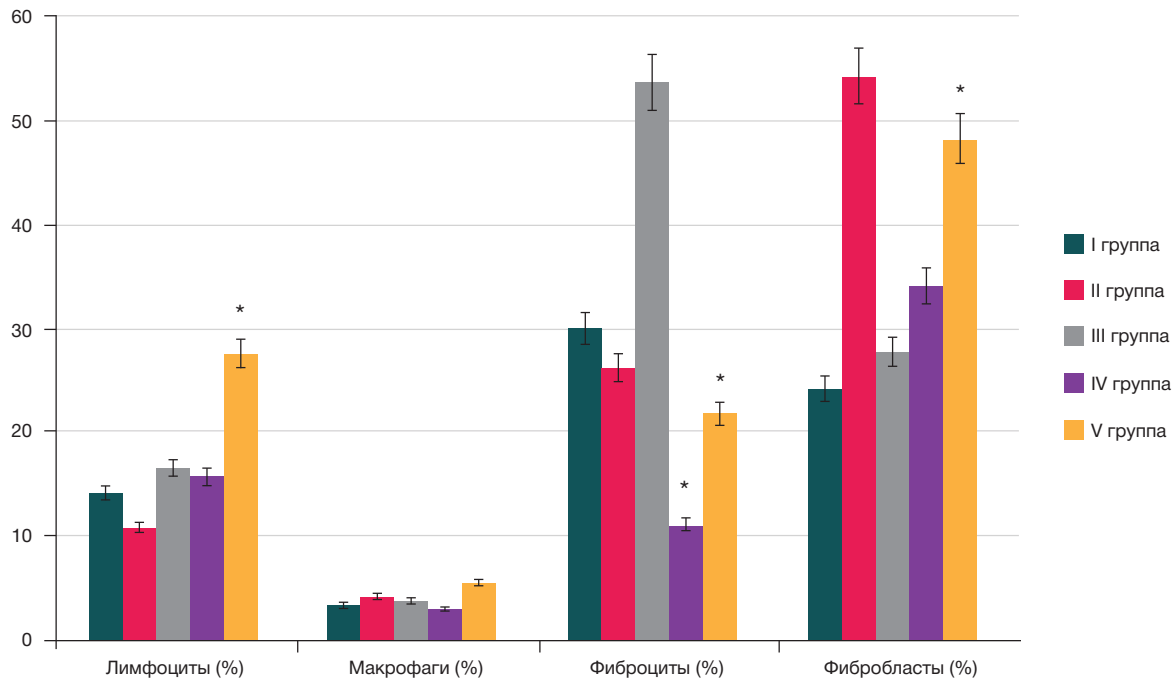


Рис. 3. Динамика изменения клеточного состава соединительнотканного рубца. * — статистически значимые отличия от предыдущей функциональной группы ($p \leq 0,05$)

состоящих из коллагена 3-го типа, можно наблюдать у женщин в молодом возрасте, а у более возрастных женщин соединительнотканый рубец состоит преимущественно из коллагена 1-го типа. Эти данные сопоставимы с данными о механизмах коллагенообразования в рубце на матке. При ИГХ-исследовании показано, что для соединительной ткани характерна умеренно выраженная экспрессия коллагена 1-го типа и более выраженная экспрессия коллагена 3-го типа [19]. Важную роль в формировании полноценного и состоятельного рубца играют именно клеточные механизмы. Одним из важных критериев является завершение фазы воспаления, т. е. снижение клеток лимфоцитов и гранулоцитов [20]. При изучении динамики клеточного состава показано, что морфологическая картина полностью соответствует зрелой грануляционной ткани с преобладанием клеток фибробластического дифферона.

ВЫВОДЫ

Условиями для формирования состоятельного рубца служат минимальная воспалительная реакция и завершённые процессы коллагеногенеза с преобладанием клеток фибробластического дифферона. На микроскопическом уровне о состоятельности послеоперационных рубцов может свидетельствовать наличие плотно расположенных пучков коллагеновых волокон с небольшими межволоконными промежутками. Под влиянием растяжения и с увеличением кратности его действия волокнистые структуры истончаются, происходит их разволокнение. С точки зрения клинической практики данная морфологическая картина может стать косвенным показанием к укреплению брюшной стенки и швов на женских половых органах после оперативных вмешательств дополнительными синтетическими материалами.

Литература

1. Духанин А. С., Малкин П. А., Шимановский Н. Л. Внутриклеточный pH как ранний дифференциальный маркер глюкокортикоид-индуцированного апоптоза фибробластов кожи. Вестник российского государственного медицинского университета. 2013; 1: 54–57.
2. Ляховецкий Б. И., Глазкова Л. К., Перетолчина Т. Ф. Кожные признаки недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2012; 1 (20): 30–35.
3. Шишкина В. В., Атякшин Д. А. Тучные клетки и фибриллогенез коллагена в условиях невесомости. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8 (3): 79–88.
4. Мишина Е. С., Затолокина М. А., Сергеева С. Ю. Изучение факторов динамического структурирования коллагеновых волокон в эксперименте. Морфология. 2019; 11 (2): 199.
5. Омеляненко Н. П., Слуцкий Л. И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия, 2009; 1: 380.
6. Фетисов С. О., Алексеева Н. Т., Никиток Д. Б., Сереженко Н. П., Атякшин Д. А. Моделирование как метод оценки специфических морфофункциональных паттернов при регенерации. Журнал анатомии и гистопатологии. 2015; 4 (4): 49–55.
7. Rittie L, editor. Fibrosis: methods and protocols. Humana Press, 2017; 530 p.
8. Ghazanfari S, Khademhosseini A, Smit TH. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. Biomaterials. 2016; 97: 74–84.
9. Harris JR, Lewis RJ. The collagen type I segment long spacing (SLS) and fibrillar forms: Formation by ATP and sulphonated diazo dyes. Micron. 2016; 86: 36–47.
10. Lu Y, Zhou Q, Lu JW, Wang WS, Sun K. Involvement of STAT3 in the synergistic induction of 11 β -HSD1 by SAA1 and cortisol in human amnion fibroblasts. Am J Reprod Immunol. 2019 Aug; 82 (2): e13150. DOI: 10.1111/aji.13150.
11. Григорьева Ю. В., Суворова Г. Н., Бормотов А. В., Чемидронов С. Н. К вопросу о роли коллагена III типа в шейке матки крыс при беременности и родах. Журнал анатомии и

- гистопатологии. 2015; 4 (3): 29–39.
12. Мнихович М. В., Соколов Д. А., Загребин В. Л. От анатомии и гистологии к клинической патологии. Журнал анатомии и гистопатологии. 2017; 3: 29–30.
 13. Ji Won Kwon, Won-Jae Lee, Si-Bog Park. Generalized joint hypermobility in healthy female koreans: prevalence and age-related differences. Ann Rehabil Med. 2013; 37 (6): 832–8.
 14. Васин Р. В., Филимонов В. Б., Мнихович М. В., Каприн А. Д. Морфологическая структура и иммуногистохимический анализ стенок влагалища у женщин с пролапсом гениталий. Урология. 2019; 6: 12–20.
 15. Гаспаров А. С., Дубинская Е. Д., Бабичева И. А., Лаптева Н. В. Роль дисплазии соединительной ткани в акушерско-гинекологической практике. Казанский медицинский журнал. 2014; 95 (6): 897–904.
 16. Шевлюк Н. Н., Гатиатуллин И. З., Стадников А. А. Особенности репаративных гистогенезов при использовании биопластических материалов. Журнал анатомии и гистопатологии. 2020; 9 (1): 86–93.
 17. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM. Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. Obstet Gynecol. 2005; 106: 953–63.
 18. Айламазян Э. К., Кулаков В. И., Радзинский В. Е., Савельева Г. М., редакторы. Акушерство, национальное руководство. М., 2007; 1197 с.
 19. Казарян Р. М., Апресян С. В., Оразмурадов А. А., Князев С. А. Генетические и морфологические особенности рубца на матке после кесарева сечения. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2008; 1: 12–17.
 20. Телегина И. В., Павлов Р. В., Сельков С. А. Особенности формирования рубца на матке после кесарева сечения в зависимости от характера родоразрешения. Журнал акушерства и женских болезней. 2013; 4 (62): 61–66.
- ## References
1. Duhanin AS, Malkin PA, Shimanovskij NL. Vnutrikletochnyy ph kak rannij differencial'nyy marker gliukokortikoid-inducirovannogo apoptoza fibroblastov kozhi. Vestnik rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 2013; 1: 54–57. Russian.
 2. Lyahoveckij BI, Glazkova LK, Peretolchina TF. Kozhnye priznaki nedifferencirovannoj displazii soedinitel'noj tkani. Sovremennye problemy dermatovenerologii, immunologii i vrachebnoj kosmetologii. 2012; 1 (20): 30–35. Russian.
 3. Shishkina VV, Atjakshin DA. Tuchnye kletki i fibrillogenez kollagena v uslovijah nevesomosti. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2019; 8 (3): 79–88. Russian.
 4. Mishina ES, Zatolokina MA, Sergeeva SYu. Izuchenie faktorov dinamicheskogo strukturirovaniya kollagenovykh volokon v jeksperimente. Morfologija. 2019; 11 (2): 199. Russian.
 5. Omelyanenko NP, Sluckij LI. Soedinitel'naja tkan' (gistofiziologija i biohimija). M.: Izvestija, 2009; 1: 380. Russian.
 6. Fetisov SO, Alekseeva NT, Nikityuk DB, Serezhenko NP, Atjakshin DA. Modelirovanie kak metod ocenki specificheskikh morfofunkcional'nykh patternov pri regeneracii. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2015; 4 (4): 49–55. Russian.
 7. Rittie L, editor. Fibrosis: methods and protocols. Humana Press, 2017; 530 p.
 8. Ghazanfari S, Khademhosseini A, Smit TH. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. Biomaterials. 2016; 97: 74–84.
 9. Harris JR, Lewis RJ. The collagen type I segment long spacing (SLS) and fibrillar forms: Formation by ATP and sulphonated diazo dyes. Micron. 2016; 86: 36–47.
 10. Lu Y, Zhou Q, Lu JW, Wang WS, Sun K. Involvement of STAT3 in the synergistic induction of 11 β -HSD1 by SAA1 and cortisol in human amnion fibroblasts. Am J Reprod Immunol. 2019 Aug; 82 (2): e13150. DOI: 10.1111/aji.13150.
 11. Grigoreva YuV, Suvorova GN, Bormotov AV, Chemidronov SN. K voprosu o roli kollagena III tipa v shejke matki kryis pri beremennosti i rodah. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2015; 4 (3): 29–39. Russian.
 12. Mnihovich MV, Sokolov DA, Zagrebina VL. Ot anatomii i gistologii k klinicheskoi patologii. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2017; 3: 29–30. Russian.
 13. Ji Won Kwon, Won-Jae Lee, Si-Bog Park. Generalized joint hypermobility in healthy female koreans: prevalence and age-related differences. Ann Rehabil Med. 2013; 37 (6): 832–8.
 14. Vasin RV, Filimonov VB, Mnihovich MV, Kaprin AD. Morfologicheskaja struktura i immunogistohimicheskij analiz stenok vlagalishha u zhenshhin s prolapsom genitalij. Urologija. 2019; 6: 12–20. Russian.
 15. Gasparov AC, Dubinskaya ED, Babicheva IA, Lapteva NB. Rol' displazii soedinitel'noj tkani v akushersko-ginekologicheskoi praktike. Kazanskij medicinskij zhurnal. 2014; 95 (6): 897–904. Russian.
 16. Shevlyuk NN, Gatiatullin IZ, Stadnikov AA. Osobennosti reпаративnykh gistogenezov pri ispol'zovanii bioplasticheskikh materialov. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2020; 9 (1): 86–93. Russian.
 17. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM. Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. Obstet Gynecol. 2005; 106: 953–63.
 18. Ajlamazyan YeK, Kulakov VI, Radzinskij VE, Saveleva GM, redaktory. Akusherstvo, nacional'noe rukovodstvo. M., 2007; 1197 s. Russian.
 19. Kazaryan RM, Apresyan SV, Orazmuradov AA, Knyazev SA. Geneticheskie i morfologicheskie osobennosti rubca na matke posle kesareva sechenija. Vestnik Rossijskogo universiteta družby narodov. Serija: Medicina. 2008; 1: 12–17. Russian.
 20. Telegina IV, Pavlov RV, Selkov SA. Osobennosti formirovaniya rubca na matke posle kesareva sechenija v zavisimosti ot haraktera rodorazreshenija. Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. 2013; 4 (62): 61–66. Russian.

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

А. Г. Сыркашева [✉], В. Е. Франкевич, Н. В. Долгушина

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

В связи с активным изучением ассоциаций между уровнями микроэлементов, эндокринными заболеваниями и нарушением репродуктивной функции представляется актуальным изучение элементного статуса у пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Целью работы было проанализировать у пациенток с бесплодием содержание микроэлементов, связь между уровнем микроэлементов в их крови и параметрами программ ВРТ. В исследование включено 30 пациенток с бесплодием в возрасте 18–39 лет. Определяли концентрации 31 химического элемента в крови пациенток методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Два элемента из 31 (сурьма и бериллий) не были обнаружены ни в одном образце крови, 10 элементов (титан, хром, кобальт, никель, мышьяк, ртуть, барий, золото, ванадий) выявлены в части образцов крови, оставшиеся 19 элементов — во всех образцах. Возраст пациенток находился в отрицательной корреляционной связи с уровнем кремния ($r = -0,384$; $p = 0,036$) и в положительной — с уровнем молибдена ($r = 0,384$; $p = 0,036$). Уровень антимюллерова гормона находился в значимой отрицательной корреляционной связи с уровнем лития ($r = -0,367$; $p = 0,046$). Уровень свободного тироксина находился в значимой отрицательной корреляционной связи с уровнем бора ($r = -0,402$; $p = 0,028$) и положительной корреляционной связи с уровнем железа ($r = 0,410$; $p = 0,024$) и серебра ($r = 0,432$; $p = 0,017$). При оценке эмбриологического этапа отмечена положительная корреляционная связь между уровнем кремния и числом полученных blastocysts ($r = 0,387$; $p = 0,034$). Не выявлено статистической зависимости между элементным составом крови и частотой наступления беременности в циклах ВРТ.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, эмбрионы, беременность, тяжелые металлы, масс-спектрометрия, микроэлементы, элементный состав крови, АМГ

Вклад авторов: А. Г. Сыркашева — проведение клинического этапа исследования, статистическая обработка данных, написание текста статьи; В. Е. Франкевич — проведение масс-спектрометрических исследований, Н. В. Долгушина — написание текста статьи, финальное рецензирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 10 от 20 октября 2016 г.).

✉ Для корреспонденции: Анастасия Григорьевна Сыркашева
ул. Академика Опарина, г. Москва, 4117485; a_syrkasheva@oparina4.ru

Статья получена: 10.02.2021 Статья принята к печати: 24.02.2021 Опубликовано онлайн: 28.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.010

ELEMENTAL COMPOSITION OF BLOOD OF INFERTILE PATIENTS PARTICIPATING IN ASSISTED REPRODUCTION PROGRAMS

Syrkasheva AG [✉], Frankovich VE, Dolgushina NV

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

The association between levels of trace elements, endocrine diseases and reproductive impairments is actively investigated currently. In this connection, it seems relevant to study elemental status (elemental composition of blood and amounts of elements therein) of infertile patients enlisted in programs employing assisted reproductive technologies (ART). This study aimed to analyze trace elements in blood of infertile patients, relationship between the level of such trace elements and parameters of the ART programs they are in. The study included 30 infertile patients aged 18–39 years. Relying on inductively coupled plasma mass spectrometry, we identified concentrations of 31 chemical element in blood of the participants. Two elements out of 31 (antimony and beryllium) were not found in any blood sample; 10 elements (titanium, chromium, cobalt, nickel, arsenic, mercury, barium, gold, vanadium) were detected in some blood samples, the remaining 19 elements were found in all samples. Age of the patients correlated negatively with the level of silicon ($r = -0.384$; $p = 0.036$) and positively with the level of molybdenum ($r = 0.384$; $p = 0.036$). The level of anti-mullerian hormone was in a significant negative correlation with the level of lithium ($r = -0.367$; $p = 0.046$). The level of free thyroxine was in a significant negative correlation with the level of boron ($r = -0.402$; $p = 0.028$) and a positively correlated with the levels of iron ($r = 0.410$; $p = 0.024$) and silver ($r = 0.432$; $p = 0.017$). Considering the embryological cycle, we noted a positive correlation between the level of silicon and the number of blastocysts obtained ($r = 0.387$; $p = 0.034$). There was no statistical relationship registered between elemental composition of blood the frequency of pregnancy in ART cycles.

Keywords: assisted reproductive technologies, embryos, pregnancy, heavy metals, mass spectrometry, trace elements, blood elemental status, AMH

Author contribution: Syrkasheva AG — conducting the clinical stage of the study, statistical processing of data, article authoring; Frankovich VE — conducting mass spectrometric studies; Dolgushina NV — article authoring, final review.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the ethics committee of the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #10 of October 20, 2016).

✉ Correspondence should be addressed: Anastasia G. Syrkasheva
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; a_syrkasheva@oparina4.ru

Received: 10.02.2021 Accepted: 24.02.2021 Published online: 28.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.010

Термин «микроэлементы» появился в середине XX в. Согласно определению Медицинского энциклопедического словаря, микроэлементы — химические элементы, содержащиеся в тканях организма в концентрации 1 : 100 000 или менее. Выделяют эссенциальные (необходимые) микроэлементы — биоэлементы, для которых установлена их исключительная роль

в обеспечении жизнедеятельности, обязательные компоненты организма человека. К условно эссенциальным относят микроэлементы, в отношении которых накапливается все больше данных об их важной роли в обеспечении нормальной жизнедеятельности организма. Токсичные или потенциально токсичные микроэлементы — это группа элементов, которые в

небольших количествах присутствуют в организме, однако их роль и возможное негативное влияние недостаточно изучены [1].

Интерес мирового научного сообщества к микроэлементам начался с изучения специфических заболеваний, имеющих прямую связь с определенными элементами. Наиболее яркими примерами подобных заболеваний являются болезнь Минамата (отравление ртутью) и Итай-Итай (отравление кадмием).

Известна также роль дефицита железа в развитии анемии, дефицита йода в развитии патологии щитовидной железы, дефицита цинка в развитии кожных заболеваний и патологии нервной системы.

Однако данная область медицины остается одной из наиболее малоизученных. Во-первых, это связано с низкими концентрациями различных микроэлементов в организме человека, и для определения данных концентраций требуются сложные и дорогостоящие методики. Во-вторых, отсутствуют данные о метаболизме редких микроэлементов в организме — для их изучения в основном используют образцы крови и/или волос человека. В-третьих, изменения в составе микроэлементов хорошо изучены только для специфических заболеваний. Данное направление в настоящий момент активно развивается: к примеру, исследователи изучают связь между изменениями в составе микроэлементов и заболеваниями эндокринной системы [2, 3].

В 1984 г. было основано Международное общество по изучению микроэлементов у человека (от англ. The International Society for Trace Element Research in Humans), целями которого являются консолидация и распространение данных о биологической роли микроэлементов в различных патологических процессах у человека.

Изучение роли микроэлементов в нарушении репродуктивной функции — одна из сложных и перспективных задач. Пациентки в программах вспомогательных репродуктивных технологий (BPT) представляют собой интересную для изучения группу. Во-первых, это женщины молодого возраста, без хронических соматических заболеваний и имеющие хорошие результаты медицинского обследования (которое обязательно проводят перед BPT); во-вторых, возможно изучение эмбриологических параметров — качества ооцитов и эмбрионов, частоты фертилизации ооцитов. Поэтому для проведения исследования была выбрана данная категория пациенток.

Целью работы было проанализировать содержание микроэлементов у пациенток с бесплодием, связь между уровнем микроэлементов в крови пациенток с бесплодием и параметрами программ BPT.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 30 пациенток, обратившихся для лечения бесплодия с помощью BPT в период с 2017 г. по 2018 г.. Критерии включения: отсутствие противопоказаний к проведению BPT; нормальный кариотип обоих супругов; отсутствие выраженной патозооспермии (100% тератозооспермия, абсолютная астенозооспермия, все виды азооспермии); возраст женщины 18–39 лет включительно, индекс массы тела (ИМТ) женщины 19–25 кг/м² включительно. Все пациентки, включенные в исследование, постоянно проживали на территории города Москвы в течение последних 5 лет. Критерии исключения: использование донорских гамет

или суррогатного материнства; получение трех и менее ооцитов в день трансвагинальной пункции яичников.

Все включенные в исследование супружеские пары прошли необходимые обследования перед использованием BPT [3].

Овариальную стимуляцию проводили по протоколу с антагонистами гонадотропин рилизинг-гормона [4]. Трансвагинальную пункцию яичников, аспирацию ооцитов осуществляли по стандартной методике [4].

Забор венозной крови для проведения исследования производили в день трансвагинальной пункции, после чего образцы подвергали криоконсервации при температуре –70 °С. Количественное определение эссенциальных и токсичных микроэлементов в крови осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, при этом лаборатория не имела доступа к клиническим характеристикам пациенток. Определяли концентрации следующих микроэлементов: литий (Li), бор (B), натрий (Na), магний (Mg), алюминий (Al), кремний (Si), калий (K), кальций (Ca), титан (Ti), хром (Cr), марганец (Mn), железо (Fe), кобальт (Co), никель (Ni), медь (Cu), цинк (Zn), мышьяк (As), селен (Se), молибден (Mo), кадмий (Cd), сурьма (Sb), ртуть (Hg), свинец (Pb), барий (Ba), золото (Au), ванадий (V), серебро (Ag), бериллий (Be), висмут (Bi), вольфрам (W), галлий (Ga) (31 элемент).

Оплодотворение ооцитов осуществляли с помощью инсеминации ооцитов *in vitro* («классическое» экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), далее ЭКО — метод оплодотворения), или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Культивирование и перенос эмбриона проводили согласно принятым в клинической практике методикам [4].

Через 14 дней после переноса в полость матки определяли концентрацию β -ХГ в сыворотке крови пациентки. При визуализации сердцебиения эмбриона через пять недель после переноса эмбриона регистрировали клиническую беременность.

Для статистического анализа использовали пакет статистических программ SPSS 22 (IBM; США). Данные с нормальным распределением представляли как среднее значение (стандартное отклонение). Статистический анализ проводили с применением χ^2 -теста для сравнения категориальных переменных, теста Манна-Уитни для сравнения медиан. Данные с ненормальным распределением были представлены как медиана (интерквартильный размах). При проведении корреляционного анализа учитывали критерий Пирсона.

Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализирована концентрация 31 химического элемента в крови 30 пациенток. Два элемента (сурьма и бериллий) не были обнаружены ни в одном образце крови, 10 элементов (титан, хром, кобальт, никель, мышьяк, ртуть, барий, золото, ванадий) обнаружены в части образцов крови, оставшиеся 19 элементов — во всех образцах. Данные по распределению химических элементов у изученных пациенток представлены в табл. 1.

Возраст пациентки находился в отрицательной корреляционной связи с уровнем кремния ($r = -0,384$; $p = 0,036$) и в положительной связи с уровнем молибдена ($r = 0,384$; $p = 0,036$). Масса тела и ИМТ пациентки не имели связи с элементным составом крови пациенток.

Таблица 1. Концентрация эссенциальных и токсических микроэлементов у пациенток

Элемент	Частота определения	Медиана	Интерквартильный размах	Минимум–максимум
Литий (Li), мкг/л	100%	18,17	1,01–34,43	10,22–29,83
Бор (B), мкг/л	100%	141,6	84,0–165,7	68,6–206,5
Натрий (Na), мг/л	100%	3213,5	3070,0–3459,0	2946,0–3567,0
Магний (Mg), мг/л	100%	20,0	18,8–21,4	13,3–25,9
Алюминий (Al), мкг/л	100%	60,145	51,55–85,03	24,19–126,45
Кремний (Si), мкг/л	100%	493,200	179,9–636,9	38,5–892,1
Калий (K), мг/л	100%	165,5	152,0–190,0	136,0–210,0
Кальций (Ca), мг/л	100%	100,550	95,2–106,0	92,3–109,5
Титан (Ti), мкг/л	93,3% (n = 28)	2,745	1,88–3,56	0–4,95
Хром (Cr), мкг/л	26,7% (n = 8)	0	0–1,41	0–0,40
Марганец (Mn), мкг/л	80,0% (n = 24)	0,76	0,63–0,93	0–1,59
Железо (Fe), мкг/л	100%	1377,5	965,0–1754,0	401,0–2568,0
Кобальт (Co), мкг/л	76,7% (n = 23)	0,197	0,113–0,339	0–0,412
Никель (Ni), мкг/л	36,7% (n = 11)	0	0–0,61	0–6,18
Медь (Cu), мкг/л	100%	1401,5	1121,0–1740,0	788,0–2427,0
Цинк (Zn), мкг/л	100%	873,0	781,0–960,0	593,0–1150,0
Мышьяк (As), мкг/л	96,7% (n = 29)	0,41	0,23–0,80	0–3,20
Селен (Se), мкг/л	100%	85,3	76,5–95,6	55,0–119,5
Молибден (Mo), мкг/л	100%	0,705	0,640–0,860	0,400–1,150
Кадмий (Cd), мкг/л	100%	0,275	0,20–0,38	0,1–2,42
Сурьма (Sb), мкг/л	0	–	–	–
Ртуть (Hg), мкг/л	96,7% (n = 29)	0,19	0,14–0,41	0–0,70
Свинец (Pb), мкг/л	100%	8,970	7,43–12,98	4,80–17,86
Барий (Ba), мкг/л	40,0% (n = 12)	0	0–0,55	0–2,28
Золото (Au), мкг/л	96,7% (n = 29)	0,034	0,019–0,072	0–0,099
Ванадий (V), мкг/л	3,3% (n = 1)	0	0–0	0–0,278
Серебро (Ag), мкг/л	100%	0,270	0,160–0,760	0,030–3,410
Бериллий (Be), мкг/л	0	–	–	–
Висмут (Bi), мкг/л	100%	2,068	0,935–2,839	0,107–3,408
Вольфрам (W), мкг/л	100%	0,034	0,028–0,045	0,0015–0,050
Галлий (Ga), мкг/л	100%	0,007	0,005–0,009	0,001–0,010

У курящих пациенток ($n = 5$) медиана уровня кальция была значимо ($p = 0,02$) ниже по сравнению с некурящими ($n = 25$): 98,2 мг/л против 102,4 мг/л.

При оценке акушерского анамнеза отмечено, что число беременностей в анамнезе пациентки имело положительную корреляционную связь с уровнем натрия ($r = 0,455$; $p = 0,012$) и хрома ($r = 0,484$; $p = 0,007$).

При оценке гинекологического анамнеза не было выявлено связи между уровнем микро- и макроэлементов и наличием гинекологических заболеваний в анамнезе (наружным генитальным эндометриозом, миомой матки малых размеров, воспалительными заболеваниями органов малого таза), наличием первичного или вторичного бесплодия, а также длительностью бесплодия.

При оценке лабораторных показателей пациенток обнаружена связь между уровнем микроэлементов, уровнем антимюллерова гормона (АМГ) и свободного тироксина (Т4св). Уровень АМГ находился в значимой отрицательной корреляционной связи с уровнем лития ($r = -0,367$; $p = 0,046$). Уровень свободного тироксина — в значимой отрицательной корреляционной связи с уровнем бора ($r = -0,402$; $p = 0,028$) и положительной корреляционной связи с уровнем железа ($r = 0,410$; $p = 0,024$) и серебра ($r = 0,432$; $p = 0,017$) (табл. 2).

При оценке особенностей протокола овариальной стимуляции отмечена связь между суммарной дозой гонадотропинов, длительностью стимуляции, уровнем алюминия, цинка, селена и бария (табл. 3).

При оценке параметров оогенеза и раннего эмбриогенеза отмечена положительная корреляционная связь между числом полученных бластоцист и уровнем кремния ($r = 0,387$; $p = 0,034$). Других статистических различий между уровнем микроэлементов и параметрами оогенеза/раннего эмбриогенеза не отмечено.

Клиническая беременность наступила в 15 случаях (50%), уровень микроэлементов не различался статистически значимо у пациенток с различными результатами ВРТ ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы увеличивается число научных исследований, демонстрирующих связь между элементным составом организма человека и особенностями течения различных заболеваний [2, 5, 6]. В здоровом организме уровни микроэлементов находятся в пределах физиологических значений за счет гомеостатических механизмов. Однако при изменяющихся условиях внешней среды (как правило,

Таблица 2. Корреляционная связь между гормональными параметрами и элементным составом крови пациенток

	АМГ	T4 _{св}	Литий	Бор	Железо	Серебро
АМГ	1	$r = 0,130$	$r = -0,367$	$r = -0,055$	$r = 0,040$	$r = 0,253$
		$h = 0,495$	$p = 0,046$	$p = 0,773$	$p = 0,835$	$p = 0,177$
T4 _{св}	$r = 0,130$	1	$r = 0,183$	$r = -0,402$	$r = 0,410$	$r = 0,432$
	$h = 0,495$		$p = 0,334$	$p = 0,028$	$p = 0,024$	$p = 0,017$
Литий	$r = -0,367$	$r = 0,183$	1	$r = 0,104$	$r = 0,258$	$r = -0,281$
	$p = 0,046$	$p = 0,334$		$p = 0,583$	$p = 0,168$	$p = 0,133$
Бор	$r = -0,055$	$r = -0,402$	$r = 0,104$	1	$r = -0,074$	$r = -0,329$
	$p = 0,773$	$p = 0,028$	$p = 0,583$		$p = 0,698$	$p = 0,076$
Железо	$r = 0,040$	$r = 0,410$	$r = 0,258$	$r = -0,074$	1	$r = -0,59$
	$p = 0,835$	$p = 0,024$	$p = 0,168$	$p = 0,698$		$p = 0,758$
Серебро	$r = 0,253$	$r = 0,432$	$r = -0,281$	$r = -0,329$	$r = -0,59$	1
	$p = 0,177$	$p = 0,017$	$p = 0,133$	$p = 0,076$	$p = 0,758$	

к таким условиям относят экологические особенности и особенности рациона питания) могут возникать нарушения баланса микроэлементов, проявляющиеся в дефиците или, напротив, избытке определенных веществ [3]. Сложность диагностики подобных состояний обусловлена отсутствием характерной клинической картины и труднодоступностью лабораторных методов диагностики элементного состава организма человека. Продолжаются дискуссии о выборе идеальной матрицы для проведения микроэлементного анализа (кровь / моча / волосы) [1, 7]. Следует также учитывать, что роль многих микроэлементов в организме человека не изучена; так же, как не изучены процессы метаболизма микроэлементов. Элементный состав организма человека может зависеть от пола, возраста пациента, от других менее явных признаков [8]. Все эти факторы делают научные исследования в данной области крайне перспективными.

В данном исследовании оценивали элементный статус крови пациенток с бесплодием, обратившихся для проведения программ ВРТ. Критерием включения пациенток в исследование было проживание в благоприятном с точки зрения дисбаланса микроэлементов регионе России [9]. Отбор пациенток с определенными клиническими характеристиками снижает вероятность влияния известных факторов (ожирение, эндокринные заболевания, экологически неблагоприятный регион проживания) на элементный статус.

В результате проведенного исследования выявлена связь между элементным составом крови и клиническими характеристиками пациенток, но не выявлено связи между элементным составом организма пациенток и результатами ВРТ.

Возраст пациенток был негативно связан с уровнем кремния и позитивно с уровнем молибдена. Молибден — эссенциальный микроэлемент, кремний можно отнести к элементам «вероятно необходимым» для функционирования организма человека. Максимальное количество кремния содержится в соединительной ткани: стенках артерий, ткани сухожилий, коже. Предполагается изменение содержания кремния в организме человека с возрастом, однако механизмы точно не определены [10]. Роль молибдена в организме человека неоднозначна. Он является компонентом различных ферментов. Препараты молибдена традиционно используют для терапии болезни Вильсона, кроме того, описаны случаи эффективной терапии болезни Крона [11]. Проводятся доклинические исследования препаратов молибдена в

качестве противоопухолевых препаратов: показана их эффективность для подавления ангиогенеза [12]. В то же время при повышенных концентрациях этот металл обладает токсическими свойствами. Показана связь концентрации молибдена в крови с повышенным риском артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний [13]. Для оценки негативного влияния молибдена на здоровье человека необходимы дальнейшие исследования.

При развитии остеопороза и остеопении изучают влияние курения на метаболизм кальция [14]. В нашем исследовании пациентки, злоупотребляющие табакокурением, имели сниженный уровень кальция по сравнению с некурящими. Кальций является важным элементом в организме человека, во время беременности и лактации потребность данного элемента значительно увеличивается. Полученные данные можно использовать при консультировании пациенток, рекомендуя отказ от курения на этапе планирования беременности.

При оценке лабораторных показателей отмечена отрицательная корреляционная связь между уровнем лития и уровнем АМГ. АМГ — критерий овариального резерва, наиболее широко используемый в рутинной практике. Препараты лития длительное время применяют для терапии психиатрических заболеваний (в основном маниакально-депрессивных состояний), и в ряде случаев возникает необходимость продолжить прием препаратов лития во время беременности. Поэтому вопрос их негативного влияния на репродуктивную и эндокринную системы является объектом повышенного внимания ученых [15]. Группа исследователей из Ирана продемонстрировала снижение экспрессии генов стероидогенеза в яичниках крыс [16]. Связь между литием и показателями овариального резерва у человека требует дальнейшего изучения.

Уровень свободного тироксина связан с уровнем железа, бора и серебра. При этом не было отмечено связи между уровнями тиреотропного гормона и микроэлементов. Отрицательная связь между бором и уровнем тиреоидных гормонов у животных отмечена разными авторами [17, 18]. Воздействие препаратов бора связано с формированием гипотиреоза у лабораторных животных. Бор регулирует активность паратгормона, что может объяснять связь между бором и уровнем микроэлементов.

При анализе протокола стимуляции яичников выявлена связь между уровнями алюминия и цинка и суммарной дозой гонадотропинов, а также связь между селеном, бариумом и продолжительностью стимуляции

Таблица 3. Особенности протокола стимуляции суперовуляции и элементный состав крови пациенток

	Число дней стимуляции	Суммарная доза гонадотропинов	Алюминий	Цинк	Селен	Барий
Число дней стимуляции	1	$r = 0,318$ $p = 0,087$	$r = 0,209$ $p = 0,268$	$r = 0,296$ $p = 0,113$	$r = 0,409$ $p = 0,025$	$r = 0,562$ $p = 0,001$
Суммарная доза гонадотропинов	$r = 0,318$ $p = 0,087$	1	$r = 0,588$ $p = 0,001$	$r = 0,469$ $p = 0,009$	$r = 0,246$ $p = 0,190$	$r = 0,029$ $p = 0,881$
Алюминий	$r = 0,209$ $p = 0,268$	$r = 0,562$ $p = 0,001$	1	$r = 0,354$ $p = 0,055$	$r = 0,006$ $p = 0,977$	$r = -0,153$ $p = 0,420$
Цинк	$r = 0,296$ $p = 0,113$	$r = 0,469$ $p = 0,009$	$r = 0,354$ $p = 0,055$	1	$r = 0,351$ $p = 0,057$	$r = 0,175$ $p = 0,355$
Селен	$r = 0,409$ $p = 0,025$	$r = 0,246$ $p = 0,190$	$r = 0,006$ $p = 0,977$	$r = 0,351$ $p = 0,057$	1	$r = 0,492$ $p = 0,006$
Барий	$r = 0,562$ $p = 0,001$	$r = 0,029$ $p = 0,881$	$r = -0,153$ $p = 0,420$	$r = 0,175$ $p = 0,355$	$r = 0,492$ $p = 0,006$	1

яичников. В литературе нами не было найдено подобных корреляций. Число дней стимуляции в целом коррелирует с длительностью фолликулярной фазы собственного цикла, которая, в свою очередь, связана с показателями овариального резерва. Длительность собственного цикла может быть связана с повышенным уровнем селена, который представляет собой кофермент антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы. В то же время повышение уровня селена может стать компенсаторной реакцией в ответ на повышение уровня бария — тяжелого металла с известной токсичностью, а селен играет ключевую роль в детоксикации тяжелых металлов.

Была отмечена также положительная связь между суммарной дозой гонадотропинов и уровнями цинка и алюминия, при этом наблюдалась слабая положительная связь между данными элементами. Цинк — компонент как минимум 200 различных ферментов, и, возможно, часть из них играют роль в процессе синтеза стероидных гормонов и рецепторов к ним. Токсичное действие алюминия на оогенез в яичниках грызунов продемонстрировали биологи из Бразилии, они связывают негативный эффект

алюминия с прямым поражением тканей яичника и со снижением активности антиоксидантных ферментов [19].

При оценке параметров эмбриологического этапа отмечена положительная связь между уровнем кремния и числом полученных бластоцист, при этом связь между кремнием и числом ооцитов не зарегистрирована. Кремний необходим для формирования костной и соединительной ткани, однако его роль в процессах эмбриогенеза на сегодняшний день неизвестна.

ВЫВОДЫ

Проведено исследование элементного статуса пациенток с бесплодием в программах ВРТ. Большинство микроэлементов определяются в детектируемой концентрации в крови пациенток. Выявлена связь микроэлементов с возрастом пациентки, с лабораторными показателями (уровень АМГ и Т4св), с параметрами цикла овариальной стимуляции. Влияние элементного статуса пациенток на эффективность программ ВРТ требует проведения дальнейших исследования.

Литература

- Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементология — новый термин или новое научное направление? Вестник ОГУ. 2005; 2: 4–8.
- Talebi S, Ghaedi E, Sadeghi E, Mohammadi H, Hadi A, Clark CCT, et al. Trace Element Status and Hypothyroidism: A Systematic Review and Meta-analysis. Biol Trace Elem Res. 2020; 197 (1): 1–14.
- Sanjeevi N, Freeland-Graves J, Beretvas SN, Sachdev PK. Trace element status in type 2 diabetes: A meta-analysis. J Clin Diagn Res. 2018; 12 (5): OE01–8.
- Сыркашева А. Г., Долгушина Н. В., Макарова Н. П., Ковальская Е. В., Агаршева М. А. Исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с дисморфизмами ооцитов. Акушерство и гинекология. 2015; 7: 56–62.
- Sağlam HS, Altundağ H, Atik YT, Dündar MŞ, Adsan Ö. Trace elements levels in the serum, urine, and semen of patients with infertility. Turkish J Med Sci. 2015; 45 (2): 443–8.
- Zemrani B, Bines JE. Recent insights into trace element deficiencies: causes, recognition and correction. Curr Opin Gastroenterol. 2020; 36 (2): 110–7.
- Takeuchi H, Taki Y, Nouchi R, Yokoyama R, Kotozaki Y, Nakagawa S, et al. Association of iron levels in hair with brain structures and functions in young adults. J trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem. 2020; 58: 126436.
- Laue HE, Moroishi Y, Jackson BP, Palys TJ, Madan JC, Karagas MR. Nutrient-toxic element mixtures and the early postnatal gut microbiome in a United States longitudinal birth cohort. Environ Int. 2020; 138: 105613.
- Скальный А. В., Киселев М. Ф., редакторы. Элементный статус населения России. СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2014; 544 с.
- Вапиров В. В., Феоктистов В. М., Венскович А. А., Вапирова Н. В. К вопросу о поведении кремния в природе и его биологической роли. Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2017; 2 (163): 95–102.
- Novotny JA, Peterson CA. Molybdenum. Adv Nutr. 2018; 9 (3): 272–3.
- Llamas A, Chamizo-Ampudia A, Tejada-Jimenez M, Galvan A, Fernandez E. The molybdenum cofactor enzyme mARC: Moonlighting or promiscuous enzyme? Biofactors. 2017; 43 (4): 486–94.
- Shiue I. Higher urinary heavy metal, phthalate, and arsenic but not parabens concentrations in people with high blood pressure, U.S. NHANES, 2011–2012. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11 (6): 5989–99.

14. Breitling LP. Smoking as an effect modifier of the association of calcium intake with bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100 (2): 626–35.
15. Neri C, De Luca C, D'oria L, Licameli A, Nucci M, Pellegrino M, et al. Managing fertile women under lithium treatment: the challenge of a Teratology Information Service. *Minerva Ginecol.* 2018; 70 (3): 261–7.
16. Mirakhor F, Zeynali B, Tafreshi AP, Shirmohammadian A. Lithium induces follicular atresia in rat ovary through a GSK-3 β / β -catenin dependent mechanism. *Mol Reprod Dev.* 2013; 80 (4): 286–96.
17. Luca E, Fici L, Ronchi A, Marandino F, Rossi ED, Caristo ME,

- et al. Intake of Boron, Cadmium, and Molybdenum enhances rat thyroid cell transformation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017; 36 (1): 73.
18. Popova EV, Tinkov AA, Ajsuvakova OP, Skalnaya MG, Skalny AV. Boron — A potential goiterogen? *Med Hypotheses.* 2017; 104: 63–7.
19. da Silva Lima D, da Silva Gomes L, de Sousa Figueredo E, de Godoi MM, Silva EM, da Silva Neri HF, et al. Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils. *Exp Mol Pathol.* 2020; 116: 104486.

References

1. Skalny AV, Rudakov IA. Bioelementologija — novyj termin ili novoe nauchnoe napravlenie? *Vestnik OGU.* 2005; 2: 4–8. Russian.
2. Talebi S, Ghaedi E, Sadeghi E, Mohammadi H, Hadi A, Clark CCT, et al. Trace Element Status and Hypothyroidism: A Systematic Review and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* 2020; 197 (1): 1–14.
3. Sanjeevi N, Freeland-Graves J, Beretvas SN, Sachdev PK. Trace element status in type 2 diabetes: A meta-analysis. *J Clin Diagn Res.* 2018; 12 (5): OE01–8.
4. Syrkasheva AG, Dolgushina NV, Makarova NP, Kovalskaya EV, Agarsheva MA. Ishody programm vspomogatel'nyh reproduktivnyh tehnologij u pacientok s dismorfizmami oocitov. *Akusherstvo i ginekologija.* 2015; 7: 56–62. Russian.
5. Sağlam HS, Altundağ H, Atik YT, Dündar MŞ, Adsan Ö. Trace elements levels in the serum, urine, and semen of patients with infertility. *Turkish J Med Sci.* 2015; 45 (2): 443–8.
6. Zemrani B, Bines JE. Recent insights into trace element deficiencies: causes, recognition and correction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2020; 36 (2): 110–7.
7. Takeuchi H, Taki Y, Nouchi R, Yokoyama R, Kotozaki Y, Nakagawa S, et al. Association of iron levels in hair with brain structures and functions in young adults. *J trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem.* 2020; 58: 126436.
8. Laue HE, Moroishi Y, Jackson BP, Palys TJ, Madan JC, Karagas MR. Nutrient-toxic element mixtures and the early postnatal gut microbiome in a United States longitudinal birth cohort. *Environ Int.* 2020; 138: 105613.
9. Skalny AV, Kiselev MF, redaktory. *Jelementnyj status naselenija Rossii.* SPb.: Medkniga «JeLBI-SPb», 2014; 544 s. Russian.
10. Vapiron VV, Feoktistov VM, Venskovich AA, Vapirona NV. K voprosu o povedenii kremnija v prirode i ego biologicheskoy roli. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2017; 2 (163): 95–102. Russian.
11. Novotny JA, Peterson CA. Molybdenum. *Adv Nutr.* 2018; 9 (3): 272–3.
12. Llamas A, Chamizo-Ampudia A, Tejada-Jimenez M, Galvan A, Fernandez E. The molybdenum cofactor enzyme mARC: Moonlighting or promiscuous enzyme? *Biofactors.* 2017; 43 (4): 486–94.
13. Shiue I. Higher urinary heavy metal, phthalate, and arsenic but not parabens concentrations in people with high blood pressure, U.S. NHANES, 2011–2012. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11 (6): 5989–99.
14. Breitling LP. Smoking as an effect modifier of the association of calcium intake with bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100 (2): 626–35.
15. Neri C, De Luca C, D'oria L, Licameli A, Nucci M, Pellegrino M, et al. Managing fertile women under lithium treatment: the challenge of a Teratology Information Service. *Minerva Ginecol.* 2018; 70 (3): 261–7.
16. Mirakhor F, Zeynali B, Tafreshi AP, Shirmohammadian A. Lithium induces follicular atresia in rat ovary through a GSK-3 β / β -catenin dependent mechanism. *Mol Reprod Dev.* 2013; 80 (4): 286–96.
17. Luca E, Fici L, Ronchi A, Marandino F, Rossi ED, Caristo ME, et al. Intake of Boron, Cadmium, and Molybdenum enhances rat thyroid cell transformation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017; 36 (1): 73.
18. Popova EV, Tinkov AA, Ajsuvakova OP, Skalnaya MG, Skalny AV. Boron — A potential goiterogen? *Med Hypotheses.* 2017; 104: 63–7.
19. da Silva Lima D, da Silva Gomes L, de Sousa Figueredo E, de Godoi MM, Silva EM, da Silva Neri HF, et al. Aluminum exposure promotes histopathological and pro-oxidant damage to the prostate and gonads of male and female adult gerbils. *Exp Mol Pathol.* 2020; 116: 104486.

ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ВОСПРИЯТИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ МЛАДШИМИ ШКОЛЬНИКАМИ С ЛЕГКОЙ СТЕПЕНЬЮ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТИ

В. Б. Никишина¹, О. Ф. Природова¹, Е. А. Петраш¹ ✉, И. А. Севрюкова²

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

² Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Окуломоторная активность (глазодвигательные реакции) может быть необходимым компонентом психических процессов, связанных с получением, преобразованием и использованием зрительной информации. Целью работы было определить, каковы особенности глазодвигательных реакций при восприятии статичных изображений у младших школьников с легкой степенью умственной отсталости (УО). Объем выборки составил 49 человек: 23 человека с легкой степенью УО, 26 человек с нормативным типом психического развития. Оценку глазодвигательных реакций осуществляли с использованием программно-аппаратного комплекса GP3 Gazepoint. Стимульный материал представлял собой 15 статичных цветных изображений: картинки, содержащие только изображения (10 картинок); картинки, содержащие одновременно изображения и текст (5 картинок). В ходе исследования установлено, что число фиксаций у детей с легкой степенью УО значимо меньше ($p = 0,038$) по сравнению с детьми с нормативным развитием. Одновременное размещение картинки и текстовой информации неэффективно, поскольку текстовая часть остается проигнорированной в полном объеме. Общая длительность фиксаций значимо выше ($p = 0,029$) у детей с нормативным развитием по сравнению с детьми с легкой степенью УО. При этом средняя длительность единичной фиксации при УО выше. В практическом аспекте выявленные особенности глазодвигательных реакций у детей младшего школьного возраста с легкой степенью УО позволяют оптимизировать форму предъявления информации в процессе обучения.

Ключевые слова: глазодвигательные реакции, умственная отсталость, зрительные фиксации, латентное время фиксации, длительность фиксации

Вклад авторов: В. Б. Никишина — формирование концепции исследования, интерпретация и обобщение полученного эмпирического материала; О. Ф. Природова — формирование концепции исследования, интерпретация и обобщение полученного эмпирического материала; Е. А. Петраш — количественная и качественная обработка полученного эмпирического материала, интерпретация и обобщение результатов исследования; И. А. Севрюкова — проведение исследования, сбор первичного эмпирического материала.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 9 от 10 декабря 2019 г.); родители или законные представители детей подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Екатерина Анатольевна Петраш
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; petrash@mail.ru

Статья получена: 21.01.2021 Статья принята к печати: 15.02.2021 Опубликовано онлайн: 26.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.008

OCULOMOTOR RESPONSE TO IMAGES IN PRIMARY SCHOOL CHILDREN WITH MILD INTELLECTUAL DISABILITY

Nikishina VB¹, Prirodova OF¹, Petrash EA¹ ✉, Sevrukova IA²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Oculomotor activity (eye movements) is an essential component of visual data acquisition, analysis and use. The aim of this study was to determine the characteristics of oculomotor response to static images in primary school children with mild intellectual disability (ID). Our sample included a total of 49 schoolers (23 children with mild ID and 26 typically developing children). Oculomotor activity was evaluated using a GP3 Gazepoint eye tracker. The participants were presented with 15 visual stimuli: 10 pictorial and 5 mixed (pictures + text) static color images. Children with mild ID generated significantly fewer fixations ($p = 0.038$) than typically developing children. So, learning materials containing both pictorial and textual images are ineffective because textual elements are completely ignored by children with mild ID. The total duration of gaze fixations was significantly longer ($p = 0.029$) in typically developing children than in children with mild ID. However, the average duration of a single gaze fixation was longer in children with mild ID. The identified features of oculomotor response can help to optimize the format of instructional materials for primary school children with mild ID.

Keywords: oculomotor response, intellectual disability, gaze fixation, latency, fixation duration

Author contribution: Nikishina VB and Prirodova OF proposed the concept, interpreted and summarized the obtained data; Petrash EA performed qualitative and quantitative analysis of the obtained data; interpreted and summarized the results; Sevrukova IA conducted the study and performed data acquisition

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kursk Medical State University (Protocol № 9 dated December 10, 2019). Written informed consent was obtained from the children's parents or legal representatives.

✉ Correspondence should be addressed: Ekaterina A. Petrash
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; petrash@mail.ru

Received: 21.01.2021 Accepted: 15.02.2021 Published online: 26.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.008

Доля детей в возрасте от 0 до 14 лет с впервые выявленной умственной отсталостью (УО) от общего числа детей с психическими расстройствами и расстройствами поведения на 2019 г. составляет в России 4,8% [1]. Данная тенденция имеет криволинейную положительную динамику в течение последних 10 лет.

В младшем школьном возрасте школьное обучение является ведущей деятельностью (основным фактором

развития психики ребенка), а зрительное восприятие создает основу для формирования интеллектуальной деятельности. Недостаточность дифференцированности восприятия приводит к тому, что объект воспринимается без выделения его конкретных частей, а также к неспособности различить сходные предметы при попытке их узнать [2].

Изучение зрительного восприятия как функции, включающей кодирование и анализ свойств объекта, их

мультимодальную конвергенцию, идентификацию объекта и оценку его значимости, необходимо для решения проблем обучения и воспитания детей с нарушениями развития [3].

В категорию детей с умственным недоразвитием входят дети с диагнозом «умственная отсталость легкой степени» (F70 по МКБ-10). Характерные для него диффузное недоразвитие головного мозга, повышенная истощаемость психических процессов, замедление подвижности корковых процессов, нарушение анатомо-физиологических структур зрительного анализатора обуславливают отклонения в развитии познавательной деятельности, в частности ее сенсорно-перцептивной организации [4–10].

Зрительное восприятие определяют как совокупность процессов зрительного образа мира на основе сенсорной информации, получаемой с помощью зрительной системы [3].

У младших школьников с нарушением интеллекта отмечается нарушение обобщенности восприятия. Они склонны упускать из виду мелкие детали и объекты, замечают лишь явно выделенные характерные признаки и ограничиваются общим узнаванием предмета: не выделяют характерных для него частей, частиц и других особенностей его строения [4]. Школьникам с недостатками умственного развития свойственна узость зрительного восприятия. Ученики, обучающиеся в младших классах, могут отчетливо воспринимать одновременно не 8–12 небольших предметов, как это происходит в норме, а 4–6, т. е. гораздо меньшее число [10].

Установлено также, что у учащихся с УО константность восприятия величины отдаленного предмета выражена значительно меньше, чем у их нормально развивающихся сверстников [8].

Своеобразие восприятия учащихся младших классов с УО отчетливо проявляется и при рассматривании сюжетных картин. При восприятии сюжетных картин дети с легкой степенью УО не устанавливают действительные отношения между объектами и действующими лицами, а также не раскрывают необходимые связи [5]. Это может быть связано не только с замедленным мышлением, но и с последовательной обработкой изображения. Как показывает анализ траектории движений глаз при восприятии сюжетных изображений, взгляд чаще посещает одни, по-видимому, более информативные участки изображения, другие же участки рассматриваются отнюдь не столь внимательно [7].

Таким образом, у младших школьников с УО легкой степени нарушены следующие свойства восприятия: целостность, предметность, точность, полнота, константность, объем, обобщенность, избирательность, темп и дифференцированность. Глазодвигательные реакции (окуломоторная активность) являются необходимым компонентом психических процессов, связанных с получением, преобразованием и использованием зрительной информации.

Установлено, что дети с дислексией имеют большее число и диапазон саккад при восприятии статичных текстовых изображений, а также более трех саккад в задачах на фиксацию по сравнению с контрольной группой, что может быть связано с незрелостью структур коры, ответственных за подавление саккад у данной группы детей [11].

Изучение глазодвигательных реакций при восприятии изображений с социально-значимыми стимулами у детей с расстройствами аутистического спектра позволило выявить, что только в начале подачи изображения

происходит быстрая фиксация на лицах, затем внимание оказывается сниженным. Чем сильнее выражены нарушения развития, тем больше фиксация в центре изображений, что может быть связано с низкой общей скоростью саккады [12].

При сравнении детей с разной степенью УО было выявлено, что более низкий IQ связан с более медленным временем реакции и более низким качеством фиксации [13].

В работах отечественных специалистов изучалась проблема возрастной динамики проявления особенностей глазодвигательных реакций при восприятии текстовых изображений [14]. Статистический анализ данных, полученных при сравнении параметров глазодвигательных реакций младшей и старшей групп детей с дислексией, не выявил достоверных различий ни по одному из изучаемых показателей движений взора. Незрелость определенных мозговых структур может быть связана с нарушением процесса формирования основных операциональных элементов читательской деятельности, необходимых для успешного анализа и понимания письменного текста.

Для учащихся с легкой степенью УО по сравнению с учащимися без нарушений интеллекта характерны большая длительность чтения, увеличение числа фиксаций и их длительности, уменьшение амплитуды саккад. Данные показатели могут быть обусловлены нарушениями процессов фонематического анализа и поиска графемно-морфемных связей между визуальным представлением букв и их произношением [15].

Таким образом, у детей дошкольного возраста с легкой степенью УО особенности глазодвигательных реакций при восприятии статичных изображений проявляются значимо меньшим числом зрительных фиксаций при большей их длительности, что обусловлено узостью зрительного восприятия [10], а также замедлением темпа зрительного восприятия [4]. Недоразвитие мозговых структур у таких детей может влиять на особенности глазодвигательных реакций в процессе восприятия изображения.

Целью исследования было изучить особенности глазодвигательных реакций при восприятии статичных изображений у младших школьников с легкой степенью УО для формирования методических материалов при обучении данной категории детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

Объем выборки составил 49 человек в возрасте 7–9 лет. Все испытуемые — учащиеся первого класса (в первом классе обучаются впервые). Критерии включения: дети мужского и женского пола; отсутствие нарушений зрения (наличие заключения окулиста). Критерий исключения: наличие хронических соматических заболеваний.

Исследовательские группы формировали по типу психического развития. В экспериментальную группу вошли 23 учащихся специализированной коррекционной школы VIII вида (12 мальчиков и 11 девочек; средний возраст — $8,63 \pm 0,57$ года) с легкой степенью УО (имеющих диагноз «легкая УО» по ПМПК и F70.0 — «УО легкой степени» младшего школьного возраста по МКБ-10) показателем IQ, согласно данным медицинского заключения, — $63,57 \pm 3,24$.

В контрольную группу вошли 26 человек (11 мальчиков и 15 девочек; средний возраст — $8,12 \pm 0,81$ года) с нормативным типом психического развития, имеющих

заключение «здоров» по результатам профилактического медицинского осмотра.

Оборудование: технические требования, настройка, калибровка

Глазодвигательные реакции определяли с использованием программно-аппаратного комплекса GP3 Gazepoint (Gazepoint Research Inc.; Канада), включающего камеру машинного зрения 60 Гц в основе своей системы визуализации и обработки изображений. Данный айтрекер включает в себя набор программного обеспечения, управления и анализа, который позволяет совершать калибровку, построение эксперимента, сбор и анализ данных.

Регистрацию данных осуществляли одновременно с обоих глаз.

Технические характеристики: точность — 0,5–1 градус угла зрения; частота обновления — 60 Гц; калибровка — 5 и 9 точек; доступность в использовании открытого стандарта API (интерфейса прикладного программирования); движение — 25 × 11 см (по горизонтали и по вертикали); диапазон движения глубины — ±15 см; работает на USB.

Требования к компьютеру: процессор: современный процессор i5 на i7; рекомендуемая память — 2 Гб; ОС: Windows XP / Vista / 7/8, 32/64 бит. Диагональ экрана в дюймах — 15,6, разрешение экрана — 1920 × 1080.

Процедура обследования испытуемого: запуск Gazepoint Analysis — New project (создание нового проекта) — выбираем папку, в которой будет сохранен проект — вставляем стимульный материал в виде статичных изображений.

1. Выбор AOI (интересующие области) в режиме Data Analysis. В каждом изображении можно выделить те области, которые нас больше всего интересуют. По окончании эксперимента можно получить, а затем сравнить между собой следующие параметры: число зрителей, которые смотрели AOI; среднее время до первого просмотра AOI (латентный период фиксации); среднее время, потраченное на просмотр AOI (продолжительность фиксации); средний процент от общего времени, потраченного на просмотр AOI; число зрителей, которые смотрели на AOI более одного раза. В качестве интересующих областей были отмечены изображения отдельных объектов на картинке (экране), которые предъявлялись одновременно.

2. Запуск Gazepoint Control (управление), появление окна дисплея, которое показывает четыре набора информации: Calibrate — калибровка, Gaze pointer — указатель, Select screen — выбор экрана, Switch Tracker Type — переключатель типов айтрекеров.

В центре экрана включается вид камеры GP3, в которой оптимизируются расстояние от участника, захват левого и правого глаза. Информация обратной связи осуществляется через нижнюю строку состояния: временные рамки — 16,6 мс (60 Гц), сервер указывает, сколько участников связаны и есть ли передача данных.

Условия размещения: айтрекер GP3 должен быть расположен непосредственно под экраном компьютера, на котором предъявляются стимулы. Исключено попадание прямого или рассеянного солнечного света на лица участников, так как оно препятствует считыванию роговичных рефлексов. Расстояние составляет 65 см от глаз участника, айтрекер направлен на лицо.

Для более точной работы айтрекера необходимо провести калибровку, которая определяет различия между

глазами участника и модели глаза в GP3. В процессе калибровки айтрекер анализирует отблеск света от глаз испытуемого. В начале процесса калибровки экран гаснет и маркер перемещается по 5–9 позициям (на выбор) на экране. Испытуемому необходимо смотреть на маркер каждой позиции. После калибровки белая точка или точка-взгляд будет показана на экране. Чтобы зафиксировать точность взгляда, нужно снова смотреть на каждую из точек калибровки.

Инструкция на этапе калибровки: «Перед вами будут появляться белые точки. Вам необходимо смотреть только на них».

3. Режим сбора данных. Инструкция: «Перед вами сейчас будут появляться изображения. Ваша задача — внимательно их рассматривать и стараться оставаться в одном положении».

Export Data — после завершения сбора данных и желаемой настройки анализа данные могут быть экспортированы в различных форматах, включая неподвижные изображения, воспроизведение видео траектории взгляда, тепловые карты и числовые данные в формате CSV.

Подбор стимульного материала

Подбор стимульного материала осуществляли при помощи метода экспертных оценок. В качестве экспертов выступали учителя начальных классов общеобразовательных школ и специализированной коррекционной школы VIII вида. Критерии подбора стимульного материала: тип изображения (фотографии, рисунки, схемы, сюжетные изображения, отдельные объекты); качество и четкость изображения; контрастность. Из массива выбранных экспертами стимулов картинки для исследования подбирали по следующим характеристикам: растровая графика, статичные цветные изображения в формате 2D (так как дети с УО хорошо ориентируются в основных цветах и плохо различают слабонасыщенные цветовые оттенки).

Стимульный материал представлял собой 15 статичных цветных изображений (рис. 1). Между ними предъявляли фоновое интерферирующее изображение серого цвета.

Стимульный материал был сформирован в три группы: картинки, содержащие одновременно изображения шести объектов (две картинки, содержащие изображения отдельных объектов; три сюжетные картинки); картинки, содержащие одновременно изображения 12 объектов (две картинки, содержащие изображения отдельных объектов; три сюжетные картинки); картинки, содержащие одновременно изображения и текст (задание или описание изображения) — пять картинок. Последовательность предъявления картинок была идентичной для всех испытуемых: сначала предъявляли картинки с изображением шести отдельных объектов; далее сюжетные картинки с одновременным изображением шести объектов; далее в таком же порядке предъявляли картинки с одновременным изображением 12 объектов. На завершающем этапе предъявляли картинки, содержащие одновременно изображение и текст.

Разрешение предъявляемых изображений: вертикальные изображения — 1200 × 1373, горизонтальные — 1920 × 1080 (в соответствии с экраным разрешением исследовательского компьютера и сохранением пропорций изображений); формат изображения: jpg (JPEG). Испытуемым предъявляли

рисунки из учебников основной школьной программы и из программы для детей с ограниченными интеллектуальными возможностями. Время предъявления одного рисунка — 20 с. Время предъявления фонового изображения — 3 с. Общее время предъявления — 7 мин.

Оценку глазодвигательных реакций осуществляли по заранее выбранным областям — изображенным объектам (АОИ) по следующим параметрам: латентный период фиксации (среднее время до первого просмотра АОИ); продолжительность фиксации (среднее время, потраченное на просмотр АОИ); средний процент от общего времени, потраченного на просмотр АОИ; число фиксации на каждом АОИ; суммарное число фиксации на предъявляемой картинке (сумма фиксации на каждом АОИ, которые одновременно предъявляют предъявляемой

картинке). При этом каждый из выделенных параметров оценивали по предъявляемому изображению в целом.

Статистическую обработку осуществляли с использованием методов описательной (показатели средних значений, стандартное отклонение), сравнительной (непараметрические критерии: *U*-критерий Манна-Уитни; *T*-критерий Уилкоксона) статистики. Применение статистических методов оценки осуществляли с применением абсолютных статистических показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате исследования параметров глазодвигательных реакций у детей с легкой степенью УО и нормативным развитием выявлена гетерогенность показателей общего



Интерферирующий фон

Рис. 1. Примеры стимульного материала



Я пуговицу себе сам пришил!

Я пуговицу себе сам пришил. Правда, я её криво пришил, но ведь я её сам пришил! Меня мама просит убрать со стола, как будто бы я не помог своей маме, ведь пуговицу я сам пришил! А вчера вдруг дежурным назначили в классе. Очень мне нужно дежурным быть! Я ведь пуговицу себе сам пришил, а они кричат: «На других не надейся!» Я ни на кого не надеюсь. Я всё сам делаю — пуговицу себе сам пришил...

В. Галицкий



• Почему мальчик так гордится тем, что пришил пуговицу? Расскажи, какую домашнюю работу делаешь ты.

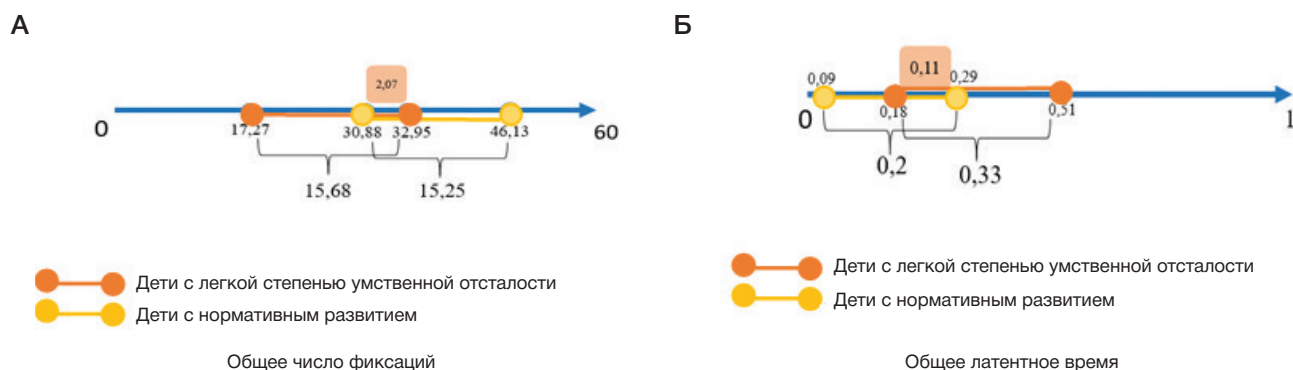


Рис. 2. Графики пересечения разброса средних значений показателей общего числа фиксаций (А) и общего латентного времени (Б) у детей с легкой степенью УО и у детей с нормативным развитием

числа фиксаций и общего латентного времени в обеих группах (рис. 2А, Б).

Общее число фиксаций в группе детей с нормативным развитием значимо выше по сравнению с детьми с легкой степенью УО ($p = 0,038$). При этом пересечение разброса средних значений у выборок минимально. Показатели разброса общего числа фиксаций в экспериментальной группе составили 15,68 (17,27; 32,95); в контрольной группе — 15,25 (30,88; 46,13). Показатель общего латентного времени значимо выше ($p = 0,044$) в группе детей с легкой степенью УО по сравнению с детьми с нормативным развитием. Разброс средних значений по показателю общего латентного времени в экспериментальной группе составляет 0,33 (0,18; 0,51); в контрольной группе — 0,2 (0,09; 0,29).

Полученные результаты позволяют выделить следующие тенденции: дети с легкой степенью УО фиксируют взглядом меньшее число объектов изображения (точек на изображении), при этом им требуется существенно больше времени для фиксации, чем детям с нормативным развитием (рис. 3).

При анализе числа фиксаций по группам стимульного материала (картинки с одновременным изображением шести или 12 объектов, картинки с содержанием текста) было выявлено увеличение числа фиксаций при увеличении числа объектов, одновременно представленных на стимульном изображении, у детей как с нормативным развитием, так и с легкой степенью УО (см. табл.).

Максимальное число фиксаций выявлено на картинках с одновременным изображением 12 объектов в обеих группах испытуемых. Среднее число фиксаций на изображениях с текстом и картинках с одновременным изображением шести объектов значимо не различаются (рис. 4).

При этом распределение фиксаций по изображению у детей с нормативным развитием и с легкой степенью УО существенно различается.

На рис. 5 представлены примеры тепловых карт распределения числа фиксаций по группам испытуемых с учетом предъявляемого стимульного материала. На рис. 5А даны примеры тепловых карт распределения фиксаций испытуемого с легкой степенью УО И. (возраст —

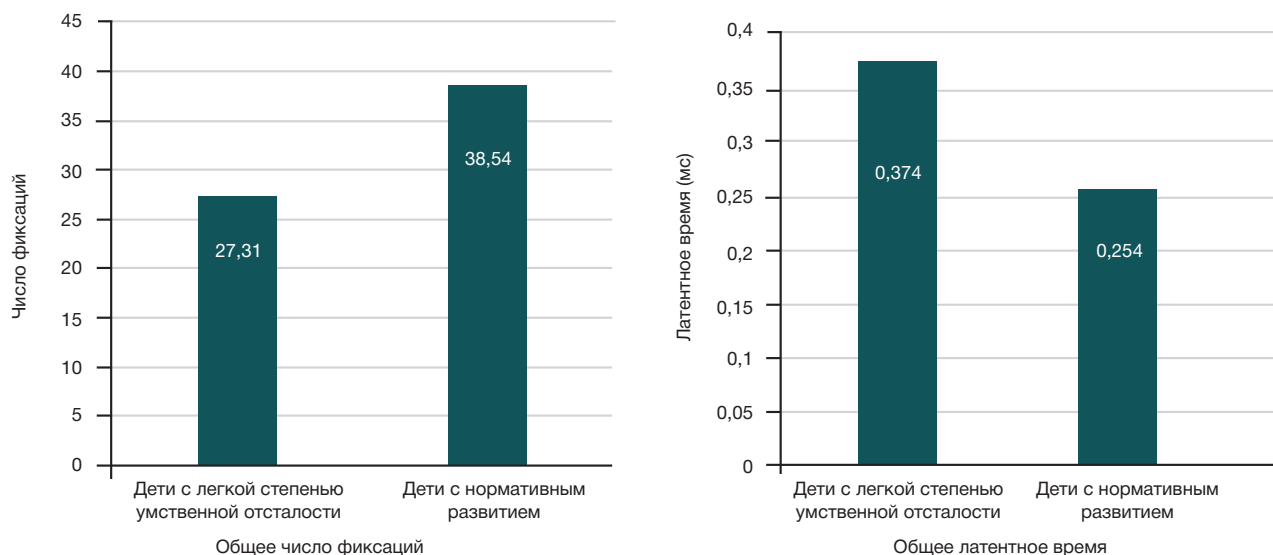


Рис. 3. Гистограмма средних значений показателей общего числа фиксаций у детей с легкой степенью УО и нормативным развитием

Таблица. Показатели значимости различий общего числа фиксаций по группам испытуемых с учетом числа одновременно предъявляемых объектов (Т-критерий Уилкоксона; $p < 0,05$)

	Число объектов: 6 ($\bar{x} \pm \sigma$)	Число объектов: 12 ($\bar{x} \pm \sigma$)	p
Дети с легкой степенью УО	25,15 \pm 4,49	30,22 \pm 6,24	0,029*
Дети с нормативным развитием	36,18 \pm 9,12	41,39 \pm 8,42	0,027*

Примечание: * — статистическая значимость различий.

8 лет 7 месяцев). На рисунке 5В представлены примеры тепловых карт распределения фиксации испытуемого с нормативным развитием С. (возраст — 8 лет 1 месяц).

В результате сравнительной оценки числа фиксации на картинках с изображением шести объектов (отдельных и в сюжетной картинке), а также 12 объектов (отдельных и в сюжетной картинке) установлено, что в экспериментальной группе показатель общего числа фиксации на изображениях, содержащих шесть отдельных объектов, и сюжетных изображениях, содержащих шесть объектов, является неизменным (статистически значимых различий не выявлено; $p = 0,75$). Аналогичные результаты получены при сравнении общего числа фиксации на картинках, содержащих 12 объектов. Общее число фиксации на картинках, содержащих 12 отдельных объектов, и сюжетных картинках, одновременно содержащих 12 объектов, у детей с легкой степенью УО также значимо не различается ($p = 0,73$). При нормативном развитии у детей число фиксации на сюжетных картинках, одновременно содержащих шесть объектов, значимо больше ($p = 0,027$), чем на картинках, содержащих шесть отдельных изображений. Также число фиксации значимо возрастает ($p = 0,029$) на сюжетных изображениях, содержащих одновременно 12 объектов, в сравнении с картинками, содержащими одновременно 12 отдельных объектов.

При анализе фиксации взгляда на сюжетном изображении с текстом, выявлено игнорирование текстовой части предъявляемой страницы детьми с легкой степенью УО и преимущественной фиксации взгляда на изображении. Дети с нормативным развитием преимущественно фиксируют взгляд на текстовой части страницы.

У детей с легкой степенью УО отсутствие фиксации на текстовой информации указывает на то, что содержание текста не поддерживает и не участвует в процессе восприятия изображений.

Предъявляемые картинки, содержащие шесть либо 12 объектов, были тоже разделены на две группы: содержащие изображения отдельных объектов и содержащие сюжетные изображения.

Фиксации на изображении отдельных объектов (картинки с изображением шести объектов) у детей с легкой степенью УО сосредоточены преимущественно на центральной части изображенных объектов. У детей с нормативным развитием фиксации распределены как на

самих объектах, так и в пространстве между ними. Это позволяет формировать помимо образа самого объекта представление о его пространственных характеристиках, в том числе о размерах относительно других объектов. При легкой степени УО у детей нарушен процесс формирования пространственных представлений, что может быть обусловлено особенностями произвольного зрительного восприятия.

Следует отметить, что при предъявлении сюжетного изображения у детей с легкой степенью УО установлено, что зрительные фиксации в основном распределены в области изображения головы (животных и птиц) и лиц людей (учителя и детей). В области второстепенных объектов отмечены единичные фиксации. У детей с нормативным развитием фиксации распределены равномерно в области основных и второстепенных объектов.

Соотношение числа фиксации между периферической и центральной частью предъявляемого изображения на картинке (при одновременном предъявлении шести объектов) у детей с нормативным развитием и у детей с легкой степенью УО равномерное.

При анализе числа фиксации взгляда на картинках с одновременным изображением 12 объектов установлено, что у детей с легкой степенью УО тоже отмечается большее число фиксации в области основных изображений при единичных фиксациях на второстепенных. Но при этом большее число фиксации сосредоточено в центральной части изображения, чем в периферической. Происходит игнорирование периферической части картинки вне зависимости от числа и характера (основные или второстепенные объекты) расположенных изображений. При нормативном развитии число фиксации между центральной и периферической частями картинки распределено равномерно.

Содержательный анализ картинок, на которых представлены люди, указывает на то, что в обеих группах испытуемых фиксации сосредоточены в области лиц изображенных людей. При этом у детей с легкой степенью УО фиксации взгляда сосредоточены на изображении лица взрослого, в то время как у детей с нормативным развитием — на изображении лиц детей.

Показатель общего латентного времени рассчитывали как сумму значений показателей латентного времени по всем выбранным областям (объектам, одновременно расположенным на предъявляемом изображении) на каждой предъявляемой на экране картинке. При анализе

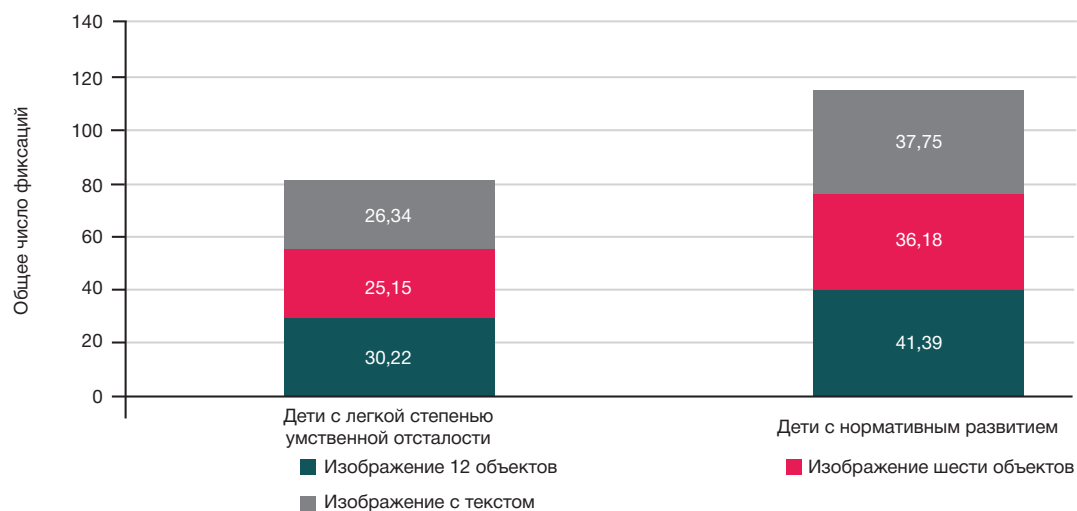
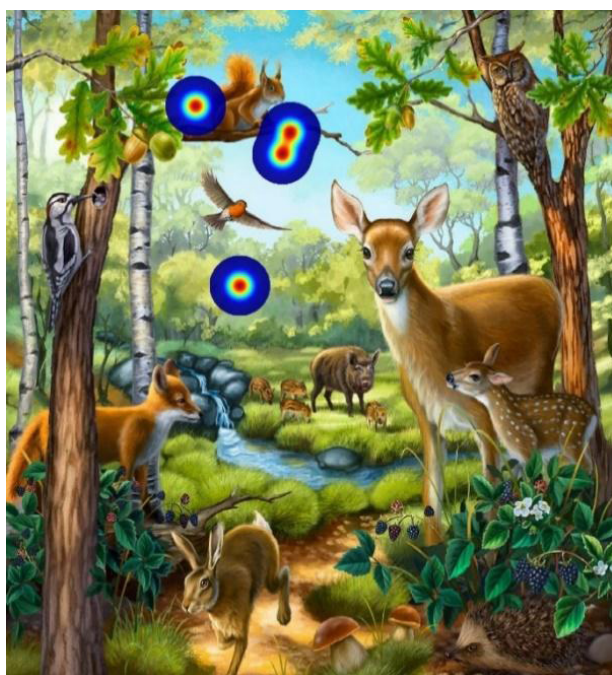


Рис. 4. Накопительные гистограммы по средним значениям показателей общего числа фиксации по группам стимульного материала



Сюжетная картинка (шесть объектов)

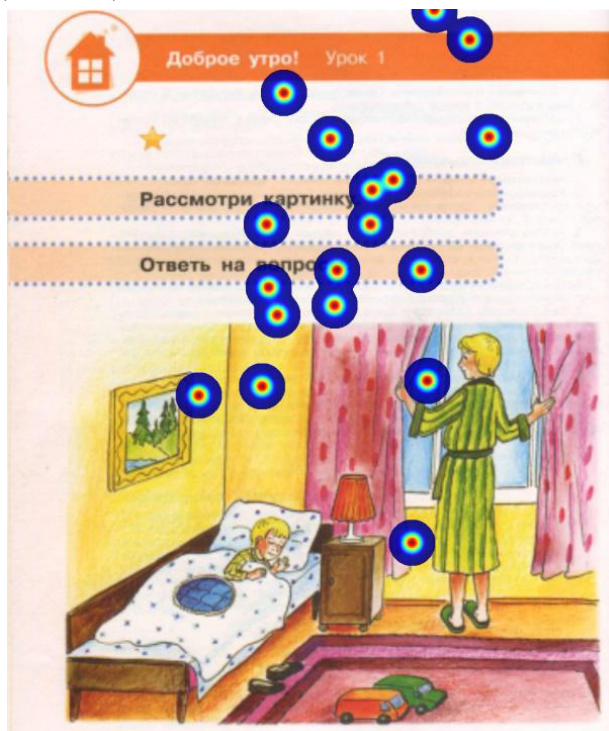


Сюжетная картинка (12 объектов)



Картинка, содержащая одновременно изображение и текст

Дети с легкой степенью УО



Дети с нормативным развитием

Рис. 5. Тепловые карты фиксации взгляда при восприятии сложного изображения по группам испытуемых

общего латентного времени, характеризующего разницу во времени с начала предъявления тестового стимула на экране до обнаружения первой фиксации достоверно установлено, что средние значения параметра показателей общего латентного периода у детей с легкой степенью УО больше, чем у детей с нормативным развитием ($p = 0,024$), т. е. детям с УО нужно больше времени для начала фиксации взгляда при восприятии статичных изображений (рис. 6А).

Вне зависимости от числа одновременно расположенных на изображении объектов (12 или 6) показатель латентного времени фиксации у детей с легкой степенью УО выше, чем у детей с нормативным развитием как по центральным полям, так и по периферическим. При этом дети с нормативным развитием намного раньше начинают воспринимать периферическое поле. Полученные результаты позволяют предположить, что более быстрое начало фиксации взгляда у детей с нормативным развитием связано с быстрой переключаемостью внимания. А поскольку у детей с легкой степенью УО время между началом восприятия периферического поля и центрального при восприятии шести объектов наименьшее, то можно сделать предположение, что им проще распределять свое внимание при восприятии меньшего числа объектов на изображении.

При оценивании общей длительности фиксации взгляда достоверно установлено, что у детей контрольной группы значение данного параметра значимо выше ($p = 0,029$) по сравнению с экспериментальной группой. При этом средняя длительность одной фиксации у детей с нормативным развитием составляет $0,29 \pm 0,08$ мс, у детей с легкой степенью УО — $0,33 \pm 0,11$ мс. Таким образом, для восприятия статичных изображений детям с легкой степенью УО требуется больше времени, чем детям с нормативным развитием. Меньшее число фиксации с большей длительностью у детей с легкой степенью УО приводит к утомлению (истощению) процесса активного восприятия и сужению его объема.

Оценка показателя общей продолжительности фиксации с учетом стимульного материала (6, 12 объектов, текст) свидетельствует, что средняя общая длительность фиксации значимо ($p = 0,027$) больше у детей с нормативным развитием по сравнению с детьми

с легкой степенью УО (рис. 6Б). Время, потраченное на просмотр АОИ (каждой выделенной области), у детей с легкой степенью УО составляет $62,37 \pm 8,31\%$ от общего времени; у детей с нормативным развитием — $68,42 \pm 9,14\%$.

У детей с легкой степенью УО выявлено уменьшение общего числа фиксации при увеличении общего латентного времени.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При восприятии статичного изображения у детей с легкой степенью УО в поле активного восприятия попадает преимущественно центр изображения при большом числе объектов. Данная тенденция подтверждает результаты ранее проведенных исследований [10, 12]. Более равномерно дети воспринимают изображения с меньшим числом объектов. На всех изображениях, где выделены картинки с текстом, у детей с легкой степенью УО отмечено меньшее число фиксации, при этом они сосредоточены в области изображения с полным игнорированием текстовой части предъявляемого изображения. То, что дети с легкой степенью УО фиксируют взгляд на отдельных элементах сюжетных картин при игнорировании других, исследователи связывают с информативностью участков изображения для таких детей [7].

У детей с нормативным развитием отмечено значимо большее число фиксации в целом по всем предъявляемым изображениям. При этом число фиксации взгляда на каждом объекте (выделенной области — АОИ), представленном на картинке (вне зависимости от числа одновременно представленных объектов — 6 или 12), относительно постоянно. Распределение числа фиксации на картинках, содержащих только изображения, является относительно равномерным (между центральной и периферической частями). На картинках, одновременно содержащих изображение и текст, основное число фиксации сосредоточено на текстовой части предъявляемой картинки и лишь отдельные фиксации отмечены на образно-графическом изображении.

При исследовании временных параметров глазодвигательных реакций у детей с легкой степенью УО общее латентное время фиксации значимо выше такового у детей с нормативным развитием. При УО детям требуется

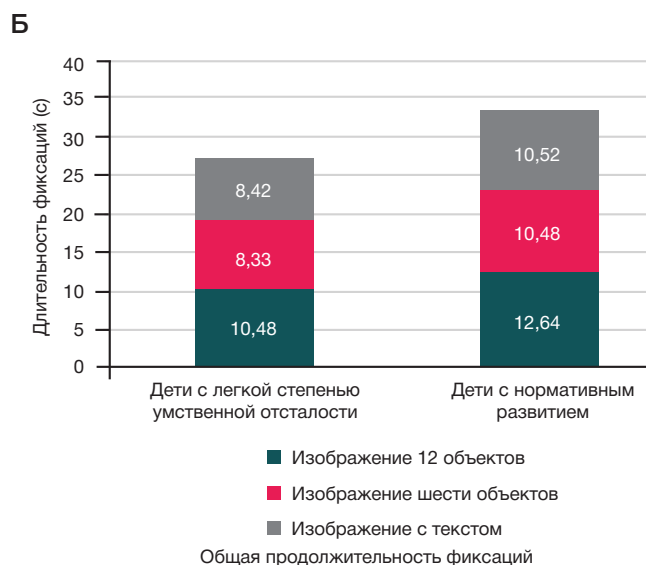
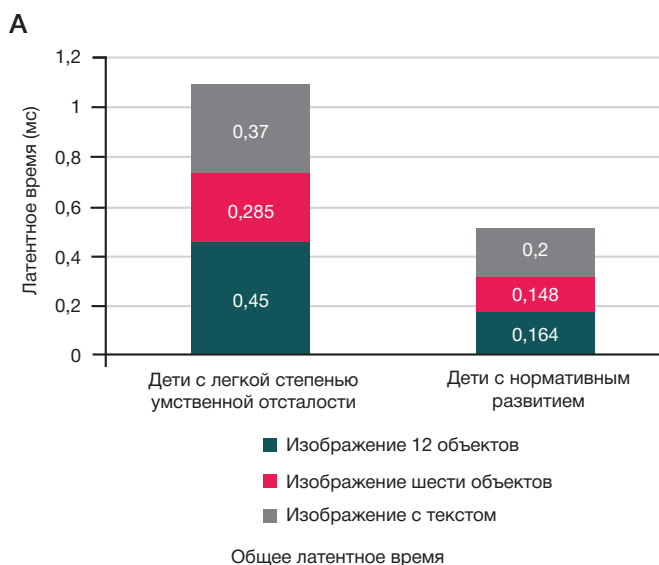


Рис. 6. Накопительные гистограммы по средним значениям показателей общего латентного времени (А) и общей продолжительности (Б) фиксации по группам стимульного материала

больше времени для восприятия изображения, чем детям с нормативным развитием. Данная тенденция тоже согласуется с результатами, представленными другими авторами, отмечающими увеличение длительности зрительных фиксаций [15]. Общая длительность фиксаций у младших школьников с нормативным развитием выше, чем у детей с легкой степенью УО. Учитывая, что число фиксаций при нормативном развитии больше, длительность одной фиксации получается меньше. Соответственно меньшее общее число фиксаций и менее длительную общую продолжительность фиксаций у детей с легкой степенью УО можно объяснить тем, что для полноценного восприятия статичных изображений им необходимо больше времени.

ВЫВОДЫ

Выявленные структурно-динамические параметры глазодвигательных реакций (показатели числа фиксаций, общей длительности и латентного времени фиксаций) позволяют выделить следующие тенденции у детей с легкой степенью УО при восприятии статичных объектов: происходит игнорирование текстовой части при восприятии страницы учебника, содержащей текстовое задание и изображение к нему; возникает ограничение

распределения зрительного внимания на периферическое поле изображения при размещении более шести объектов в одном изображении.

Выявленные особенности глазодвигательных реакций у детей младшего школьного возраста с легкой степенью УО позволяют оптимизировать форму предъявления информации в процессе обучения. Распределение активного внимания по объектам восприятия осуществляется равномерно при одновременном предъявлении в поле восприятия не более шести объектов. При размещении, например, на странице учебника одновременно более шести объектов часть из них, расположенная в периферической области, «выпадает» из поля активного восприятия. Одновременное размещение образно-графической (картинки) и текстовой (задание или описание картинки) информации неэффективно, так как текстовая часть оказывается проигнорированной в полном объеме. Последовательное предъявление текстовой информации и иллюстрации к ней позволит оптимизировать процесс активного восприятия детей с легкой степенью УО в ходе обучения. Увеличение латентного времени фиксации взгляда и длительности каждой отдельной фиксации указывает на необходимость увеличения времени предъявления иллюстративного материала при обучении.

Литература

1. Здравоохранение в России. 2019: Стат. сб. / Росстат. М., 2019; 170 с.
2. Петрова В. Г. Психология умственно отсталых школьников. М.: Академия, 2002; 160 с.
3. Лурия А. Р. Основы нейропсихологии. М.: Академия, 2003; 384 с.
4. Бережная С. А. Особенности развития зрительного восприятия у младших школьников с нарушением интеллектуального развития. В сборнике: Материалы научно-практической конференции; Симферополь, 16 мая 2017 г. Симферополь: Ариал, 2017; с. 32–34.
5. Евлахова З. А. Особенности восприятия сюжетно-художественных картин учащимися вспомогательной школы. Учебно-воспитательная работа в спец. школах. М., 1987; 205 с.
6. Забрамная С. Д. Некоторые психолого-педагогические показатели разграничения степеней умственной отсталости у детей на начальном этапе школьного обучения. Коррекционная педагогика. 2008; 1: 5–13
7. Исаев Д. Н. Умственная отсталость у детей и подростков. СПб.: Речь, 2007; 389 с.
8. Петрова В. Г. Психология умственно отсталых школьников. М.: Академия, 2002; 160 с.
9. Рубинштейн С. Я. Психология умственно отсталого школьника.

М.: Просвещение, 1986; 192 с.

10. Соловьев И. М. Особенности познавательной деятельности учащихся вспомогательной школы. М., 2004; 378 с.
11. Tiadi A, Gérard C-L, Peyre H., Bui-Quoc E, et al. Immaturity of Visual Fixations in Dyslexic Children. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2016; 10: 574–84.
12. Wang S, Jiang M, Duchesne XM, Laugeson EA, et al. Atypical Visual Saliency in Autism Spectrum Disorder Quantified through Model-Based Eye Tracking. *Neuron*. 2015; 88 (3): 604–16.
13. Boot FH, Pel JJ, Evenhuis HM, et al. Delayed visual orienting responses in children with developmental and/or intellectual disabilities. *Journal of Intellectual Disability Research*. 2012; 47: 57–58.
14. Оранов С. Р. Некоторые особенности развития читательской деятельности у детей с дислексией 9–13 лет. В сборнике: Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные исследования в педиатрии»; Санкт-Петербург, 31 октября 2019; СПб., 2019; с. 42–43.
15. Диневич К. В., Дунаевская Э. Б. Исследование зрительного восприятия текстов разного визуального формата у детей с умственной отсталостью. *Комплексные исследования детства*. 2019; 2: 114–120.

References

1. Zdravooхранenie v Rossii. 2019: Stat. sb. / Rosstat. M., 2019; 170 s. Russian.
2. Petrova VG. Psihologija umstvenno otstalyh shkol'nikov. M.: Akademija, 2002; 160 s. Russian.
3. Luriya AR. Osnovy nejropsihologii. M.: Akademija, 2003; 384 s. Russian.
4. Berezhnaja SA. Osobennosti razvitiya zritel'nogo vosprijatija u mladshih shkol'nikov s narusheniem intellektual'nogo razvitiya. V sbornike: Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii; Simferopol, 16 maja 2017 g. Simferopol: Arial, 2017; s. 32–34. Russian.
5. Evlahova ZA. Osobennosti vosprijatija sjuzhetno-hudozhestvennyh

6. kartin uchashhimisja vspomogatel'noj shkoly. Uchebno-vospitatel'naja rabota v spec. shkolah. M., 1987; 205 s. Russian.
7. Zabrarnaja SD. Nekotorye psihologo-pedagogicheskie poazateli razgranichenija stepeney umstvennoj otstalosti u detej na nachal'nom jetape shkol'nogo obuchenija. Korrekcionnaja pedagogika. 2008; 1: 5–13. Russian.
8. Isaev DN. Umstvennaja otstalost' u detej i podrostkov. SPb.: Rech', 2007; 389 s. Russian.
9. Petrova VG. Psihologija umstvenno otstalyh shkol'nikov. M.: Akademija, 2002; 160 s. Russian.
10. Rubinshtejn SYa. Psihologija umstvenno otstalogo shkol'nika. M.: Prosveshhenie, 1986; 192 s. Russian.

10. Solovev IM. Osobennosti poznavatel'noj dejatel'nosti uchashhihsja vspomogatel'noj shkoly. M., 2004; 378 s. Russian.
11. Tiadi A, Gérard C-L, Peyre H., Bui-Quoc E, et al. Immaturity of Visual Fixations in Dyslexic Children. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2016; 10: 574–84.
12. Wang S, Jiang M, Duchesne XM, Laugeson EA, et al. Atypical Visual Saliency in Autism Spectrum Disorder Quantified through Model-Based Eye Tracking. *Neuron*. 2015; 88 (3): 604–16.
13. Boot FH, Pel JJ, Evenhuis HM, et al. Delayed visual orienting responses in children with developmental and/or intellectual disabilities. *Journal of Intellectual Disability Research*. 2012; 47: 57–58.
14. Oganov SR. Nekotorye osobennosti razvitija chitatel'skoj dejatel'nosti u detej s disleksiej 9–13 let. V sbornike: Tezisy dokladov Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem «Fundamental'nye issledovanija v pediatrii»; Sankt-Peterburg, 31 oktjabrja 2019; SPb., 2019; s. 42–43. Russian.
15. Dinevich KV, Dunaevskaja YeB. Issledovanie zritel'nogo vosprijatija tekstov raznogo vizual'nogo formata u detej s umstvennoj otstalost'ju. *Kompleksnye issledovanija detstva*. 2019; 2: 114–120. Russian.

МАРКЕРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ КОНСОЛИДАЦИИ ИЗОЛИРОВАННОГО ПЕРЕЛОМА БЕДРЕННОЙ КОСТИ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ

М. В. Осиков[✉], Е. В. Давыдова, К. С. Абрамов

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

В комплексном лечении переломов бедра у лиц молодого трудоспособного возраста перспективно использование эфферентной физической терапии. Целью работы было изучить маркеры ремоделирования костной ткани в динамике консолидации перелома бедренной кости в условиях озонотерапии. В исследование были включены 20 мужчин (группа 2, $47,8 \pm 3,5$ лет) с переломом диафиза бедренной кости (AO/ASIF 32A, 32B). Контрольную группу (группа 1, $46,8 \pm 3,7$ лет) составили 10 здоровых мужчин. Пациентам подгруппы 2а ($n = 10$) проводили стандартное лечение, подгруппы 2б ($n = 10$) — стандартное лечение и малую аутогеомоозонотерапию (МАГОТ) при концентрации озона 20 мг/л. В динамике на 7-е, 30-е, 90-е сутки определяли интенсивность консолидации (по шкале RUST), С-концевые телопептиды коллагена I типа (bCTx, пг/мл) в крови, С-концевой пропептид проколлагена I типа (PICP, нг/мл). Результаты оценки по шкале RUST в подгруппах 2а и 2б на 7-е сутки — 4 балла, на 30-е сутки — 6,5 и 8,7 баллов, на 90-е — 10 и 11,5 баллов соответственно. На фоне МАГОТ минеральная плотность костной ткани в подгруппе 2б на 90-е сутки достигала 90% против 78% в подгруппе 2а, что отражает значимо высокие темпы консолидации. На фоне МАГОТ bCTx на 30-е сутки был выше, чем в подгруппе 2а (соответственно 2289,4 [2145,3; 2365,4] против 1894,6 [1745,3; 2098,2], PICP значимо повышался в сравнении с подгруппой 2а на 7-е сутки, с максимумом на 30-е и 90-е сутки наблюдения (30-е сутки: 268,3 [231,2; 286,3] против 183,2 [174,6; 195,6], 90-е сутки: 584,6 [512,3; 589,3] против 351,2 [312,3; 369,4]). Применение МАГОТ оказывает позитивное влияние на качество и интенсивность формирования костного регенерата у мужчин с закрытым неосложненным изолированным переломом диафиза бедренной кости.

Ключевые слова: закрытый изолированный перелом диафиза бедра, озонотерапия, маркеры ремоделирования костной ткани

Вклад авторов: М. В. Осиков — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; Е. В. Давыдова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста; К. С. Абрамов — набор клинического материала, анализ результатов, написание текста, редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета г. Челябинск (протокол № 4 от 22 мая 2020 г.). Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья получена: 29.12.2020 Статья принята к печати: 17.01.2021 Опубликована онлайн: 02.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.003

BONE TURNOVER MARKERS IN PATIENTS WITH ISOLATED FEMORAL SHAFT FRACTURE UNDERGOING SYSTEMIC OZONE THERAPY

Osikov MV[✉], Davidova EV, Abramov KS

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Efferent physical therapy holds promise as an adjunct to the combination treatment of femoral fractures in young, working-age individuals. The aim of the study was to investigate the dynamics of bone turnover markers at different stages of femoral fracture consolidation in patients undergoing ozone therapy. The study enrolled 20 men (group 2, 47.8 ± 3.5 years) with a femoral shaft fracture (AO/ASIF 32A, 32B). The control group (group 1, 46.8 ± 3.7 years) comprised 10 healthy males. Subgroup 2a ($n = 10$) was assigned to receive standard therapy; subgroup 2b ($n = 10$) was assigned to receive standard therapy complemented by minor autohemotherapy (MAHT) at 20 mg/L ozone concentrations. On days 7, 30 and 90, fracture consolidation was assessed on the RUST scale and blood levels of C-terminal telopeptides of type I collagen (bCTx, pg/ml) and procollagen type I carboxy-terminal propeptide (PICP, ng/ml) were measured. On day 7, the total RUST score in subgroups 2a and 2b was 4 points; on day 30, it was 6.5 and 8.7 points, respectively, and on day 90, it reached 10 and 11.5 points, respectively. Bone mineral density was as high as 90% in the MAHT subgroup vs. 78% in subgroup 2a, indicating faster bone healing. On day 30, bCTx levels in subgroup 2b were higher than in subgroup 2a (2289.4 [2145.3; 2365.4] vs. 1894.6 [1745.3; 2098.2], respectively). On day 7, PICP was significantly elevated in subgroup 2b in comparison with subgroup 2a; its levels peaked on days 30 and 90 (day 30: 268.3 [231.2; 286.3] vs. 183.2 [174.6; 195.6]; day 90: 584.6 [512.3; 589.3] vs. 351.2 [312.3; 369.4]). Thus, MAHT produces a positive effect on the quality and intensity of bone healing in men with isolated closed femoral shaft fractures.

Keywords: closed isolated femoral shaft fracture, ozone therapy, bone remodeling

Author contribution: Osikov MV conceived the study, proposed its design, analyzed the obtained data, wrote and edited the manuscript; Davidova EV conceived the study, proposed its design, analyzed the obtained data, participated in writing the manuscript; Abramov KS collected clinical data, analyzed the results of the study, wrote and edited the manuscript. The authors equally contributed to the study and preparation of the manuscript, read and approved the final version of this article before publication.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University, Chelyabinsk (Protocol № 4 dated May 22, 2020). Informed consent was obtained from all study participants.

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

Received: 29.12.2020 Accepted: 17.01.2021 Published online: 02.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.003

Травматические переломы бедренной кости являются одной из ведущих причин заболеваемости и смертности, наиболее распространены в странах с низким и средним уровнем дохода и преимущественно встречаются у молодых

людей трудоспособного возраста [1, 2]. Актуальность изучения маркеров ремоделирования костной ткани у пациентов с переломами опорно-двигательного аппарата продиктована необходимостью уточнения

патогенеза травматической болезни, а также разработкой и патогенетическим обоснованием применения эфферентных методов для коррекции биохимических, иммунных изменений гомеостаза. В комплексном лечении хирургической патологии костей в настоящее время широко используют методы эфферентной физической терапии, к которой относится озонотерапия. Озонотерапия оказывает локальный обезболивающий, противоотечный, противовоспалительный, стимулирующий репарацию эффект, улучшает кровообращение, оказывает системное иммуномодулирующее, антигипоксическое, регулирующее редокс-статус действие. Иммуотропные эффекты озонотерапии реализуются посредством стимуляции синтеза ряда про- и противовоспалительных цитокинов, факторов роста, что позволяет участвовать в процессах репарации и ремоделирования тканей [3]. Озон в терапевтических концентрациях активно вмешивается в работу дыхательной цепи митохондрий, повышая скорость гликолиза за счет активации фосфофруктокиназы, увеличивает синтез АТФ и 2,3-дифосфоглицерола, способствуя лучшей отдаче кислорода в ткани. Описана эффективность озонотерапии в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, таких как ревматоидный артрит, субакромиальный бурсит, остеоартрит, бурситы, капсулиты, патология височно-нижнечелюстного сустава и др. [4]. При остеоартрозе озон положительно зарекомендовал себя при внутрисуставных инъекциях и внутривенном введении [5]. Целью настоящего исследования было изучение биохимических маркеров ремоделирования костной ткани в динамике консолидации неосложненного закрытого перелома диафиза бедренной кости в условиях системной озонотерапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В пилотном проекте принимали участие 20 мужчин с закрытым изолированным переломом диафиза бедренной кости средней трети со смещением, который, согласно клинической классификации переломов АО/ASIF, классифицирован как 32А или 32В, по МКБ-10 шифруется как S72.3 [6]. Средний возраст пациентов составил $47,8 \pm 3,5$ года (группа 2). Пациенты находились на стационарном лечении в Челябинской областной клинической больнице. Критерии включения: возраст 35–55 лет; наличие изолированного неосложненного перелома диафиза бедренной кости средней трети; давность травмы 5–7 суток. Критерии исключения пациентов из исследования: наличие любой соматической патологии в стадии обострения; наличие онкологических, лимфопролиферативных заболеваний, остеопороза. Контрольную группу 1 для определения референсных значений маркеров костного ремоделирования в данной возрастной категории составили 10 здоровых мужчин, средний возраст которых $46,8 \pm 3,7$ лет. Всем пациентам группы 2 на 5–7-е сутки после перелома проводили оперативное вмешательство в виде закрытой репозиции отломков с последующим блокируемым интрамедуллярным остеосинтезом. При проведении операции использовали стандартные хирургические доступы. Всем пациентам, включенным в исследование, на протяжении госпитализации проводили стандартное медикаментозное лечение, включающее антибиотикотерапию и прием нестероидных противовоспалительных препаратов.

Методом простой рандомизации сразу после оперативного вмешательства исследуемая группа

пациентов ($n = 20$, группа 2) была разделена на две равновеликие подгруппы 2а и 2б, по 10 человек. В подгруппе 2а проводили только стандартную терапию, в подгруппе 2б в дополнение к стандартной терапии проводили физиотерапевтическое лечение в виде процедуры малой аутогемооозонотерапии (МАГОТ). Озонокислородную смесь (ОКС) получали на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона «УОТА-60-01» («Медозон»; Россия). Концентрация озона в озонокислородной смеси составляла 20 мг/л, объем вводимого газа — 10 мл. Объем венозной крови, взятой из кубитальной вены, составлял 10 мл. Интенсивное перемешивание ОКС и венозной крови осуществляли непосредственно в резервуаре шприца объемом 20 мл в течение 2–3 с и затем вводили глубоко внутримышечно в ягодичную или бедренную область. Курс терапии составлял 7–9 инъекций, выполняемых через день. Ни у одного пациента не было зафиксировано побочных реакций в виде повышения температуры тела, озноба, ухудшения общего самочувствия, развития постинъекционного инфильтрата.

При поступлении и в процессе лечения оценивали динамику боли в области повреждения согласно визуальной аналоговой шкале (ВАШ) [7], представляющей неградуированную 10-сантиметровую линию, начало и окончание которой отражают отсутствие боли и крайний предел ее ощущения соответственно. Пациент указывает на ней точку, соответствующую интенсивности болевых ощущений. Сразу после оперативного лечения оценку интенсивности боли проводили до приема анальгетиков. Ежедневно оценивали общее состояние больного, повышение температуры тела, наличие локальных признаков воспаления (отечность тканей, гиперемия кожи, инфильтрацию тканей, характер отделяемого из раны и пр.). На следующий день после оперативного вмешательства для контроля адекватности хирургического пособия и исключения системного остеопороза проводили компьютерную томографию (КТ) на аппарате «SOMATOM Definition Edge (Siemens; Германия) с оценкой минеральной плотности костной ткани (МПК) в паракортикальной зоне перелома. Контролем служила МПК кортикального слоя аналогичного участка кости контрлатеральной конечности. МПК измеряли в единицах Хаунсфилда (НУ). В динамике наблюдения КТ проводили на 7-е, 30-е и 90-е сутки. Дополнительно, контроль за консолидацией зоны перелома осуществляли с помощью оценки по шкале RUST [8]. Цифровой эквивалент показателя по шкале RUST определяли для каждого края кортикального слоя кости в области перелома (переднего, заднего, медиального, латерального) и интерпретировали при сумме баллов, равной 4, как отсутствие консолидации, при сумме баллов, равной 10–12, как полная консолидация. Перелом считали консолидированным при наличии 10 и более баллов по данной шкале. Клиническими критериями консолидации перелома служили отсутствие отека, инфильтрации мягких тканей, исчезновение болевого синдрома при осевой, боковых и ротационных нагрузках на конечность.

Материалом для исследования уровней маркеров костного метаболизма служила венозная кровь, взятая утром, натощак в декретируемые сроки 7-е, 30-е и 90-е сутки после перелома. Для оценки процессов резорбции в крови определяли С-концевые телопептиды коллагена I типа (bCTx, Beta-Crosslaps, нг/мл) с помощью тест-системы для проведения ИФА («БелкиАнтитела»; Россия). Показателем для процессов репарации служил уровень С-концевого пропептида проколлагена I типа (PICP, нг/мл)

(«БелкиАнтитела»; Россия). Результаты определяли на планшетном фотометре Multiskan Multisoft (LabSystems; Финляндия) при соответствующей длине волны.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19 (IBM; США). Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q_{25} ; Q_{75}]. Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уальда–Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Субъективная оценка интенсивности болевых ощущений по шкале ВАШ на 5–7-е сутки после травмы (до оперативного лечения) показала уровень выше среднего и была равна 5,6 [4,8–6,4] балла, т. е. боль носила умеренно сильный, постоянный характер, мешала выполнять любую деятельность, сосредоточиться. Игнорировать ее можно максимально на протяжении нескольких минут. После оперативного вмешательства интенсивность болевых ощущений была максимально высокой и доходила до 8–9 баллов, ощущения носили интенсивный, мучительный характер, физическая активность крайне ограничена. Проведение КТ на следующий день после оперативного вмешательства (7-е сутки после перелома) у всех пациентов, включенных в исследование, показало отсутствие признаков остеопороза. При визуальном осмотре поврежденной конечности признаки воспалительных изменений отсутствовали. На 30-е и 90-е сутки динамического наблюдения показатели боли по ВАШ снизились практически до минимального уровня (1,2 [0,9–1,4] и 0,8 [0,6–0,9] соответственно).

На протяжении всего периода наблюдения в подгруппах 2а и 2б на КТ определяли стабильное состояние костных фрагментов, смещения интрамедуллярных конструкций не наблюдали. Оценка минеральной плотности костной ткани и степени консолидации перелома по шкале RUST в подгруппе 2а, пациентов с переломом, получающих стандартное лечение (табл. 1), показала на 7-е сутки полное отсутствие формирования периостальной костной мозоли, на что указывал также низкий суммарный балл по шкале RUST. На 30-е сутки наблюдения была выявлена периостальная костная мозоль в виде облаковидного четко выраженного регенерата, формируемого за счет периостальных наслоений, при этом плотность костной ткани в сравнении с кортикальным слоем контрлатеральной здоровой конечности составила 18%, средний общий балл по шкале RUST — 6,5, что

указывает на клинические и рентгенологические признаки частичного присутствия костной мозоли. На 90-е сутки клинически определялось отсутствие инфильтративных изменений мягких тканей, исчез болевой синдром при осевой, боковых и ротационных нагрузках на конечность, показатель МПК формируемой периостальной мозоли приближался к показателю кортикального слоя здоровой конечности и составлял в среднем 78%, степень консолидации перелома согласно шкале RUST составила суммарно 10 баллов, что подтверждает полное сращение перелома.

Известно, что показателем активности процессов резорбции костной ткани служат С-концевые телопептиды коллагена I типа (bCTX, Beta-Crosslaps), представляющие собой продукт деградации спирального белка коллагена, из которого на 90% состоит матрикс кости. Интенсивность процессов репарации костной ткани в динамике перелома отражает уровень С-концевого пропептидапроколлагена I типа (PICP), содержащего С-(карбокси) и N-(амино) концевые фрагменты, которые отщепляются благодаря специальным ферментам (протеиназам) с последующим образованием коллагена и его объединением с костным матриксом. При этом С- и N-концевые фрагменты поступают в межклеточную жидкость и кровоток. Содержание PINP в крови прямо пропорционально количеству вновь синтезированного и встроенного в ткань коллагена. Динамика изменений концентрации маркеров костного метаболизма представлена в табл. 3 и 4.

Анализ табл. 3 и 4 показал значимо высокий уровень активности метаболизма костной ткани, как процессов резорбции, так и репарации, у пациентов подгруппы 2а на всех этапах динамического исследования (7-е, 30-е, 90-е сутки), в сравнении со здоровыми мужчинами того же возраста, что свидетельствует о напряженности метаболических процессов в динамике заболевания.

Пациенты с переломом бедра из подгруппы 2б на следующие сутки после проведения оперативного вмешательства (7-е сутки) в дополнение к стандартной терапии получали курс системной озонотерапии в виде МАГОТ. Субъективный показатель интенсивности болевых ощущений по шкале ВАШ у пациентов в этой подгруппе на 7-е сутки после травмы (после оперативного вмешательства) показал так же, как и в подгруппе 2а, высокий уровень болевых ощущений (8–9 баллов). На 30-е и 90-е сутки динамического наблюдения на фоне озонотерапии показатели боли по ВАШ снизились практически до нулевого уровня (1,1 [0,8–1,2] и 0,4 [0,2–0,6] соответственно на 30-е и 90-е сутки) и не имели различий с показателями подгруппы 2а.

Изучение минеральной плотности костной ткани и степени консолидации перелома по шкале RUST в подгруппе 2б на фоне озонотерапии (табл. 2) на 7-е сутки

Таблица 1. Плотность костной ткани и оценка по шкале RUST в зоне формирования периостальной костной мозоли у пациентов с неосложненным изолированным переломом диафиза бедренной кости (Me [Q_{25} ; Q_{75}])

Показатели	Здоровая конечность (кортикальный слой кости) ($n = 10$)	Поврежденная конечность (подгруппа 2а, $n = 10$)					
		7-е сутки		30-е сутки		90-е сутки	
МПК	1956,5 [1789,5; 2035,8]	ед. HU	%	ед. HU	%	ед. HU	%
		0,5*	0	354, 4 [327; 368,8]*	18	1544, 2 [1468,2; 1632,1]*	1544, 2 [1468,2; 1632,1]*
Шкала RUST (общий балл)	12,0 [12,0; 12,0]	4,0 [4,0; 4,0]*		6,5 [5,5; 7,0]*		10,0 [9,0; 11,0]	

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия со здоровой конечностью согласно критериям Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уальда–Вольфовитца.

Таблица 2. Плотность костной ткани и показатели шкалы RUST в зоне формирования периостальной костной мозоли у пациентов с неосложненным изолированным переломом диафиза бедренной кости на фоне озонотерапии (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Показатели	Здоровая конечность (кортикальный слой кости) (n = 20)	Поврежденная конечность (n = 20)					
		7-е сутки (сразу после оперативного вмешательства), ед. НУ (%)		30-е сутки, ед. НУ (%)		90-е сутки, ед. НУ (%)	
		Без O ₃ (подгруппа 2а)	МАГОТ (подгруппа 2б)	Без O ₃ (подгруппа 2а)	МАГОТ (подгруппа 2б)	Без O ₃ (подгруппа 2а)	МАГОТ (подгруппа 2б)
МПК	1956,5 [1789,5; 2035,8]	0,5* (0%)	0,6* (0%)	354, 4 [327,3; 368,8] (18%)*	372,8 [262,5; 381,4] (19%)*	1544, 2 [1468,2; 1632,1] (78,2%)*	1825,3 [1726,1; 1911,3] 90%*
Шкала RUST (общий балл)	12,0 [12,0; 12,0]	4,0 [4,0; 4,0]*	4,0 [4,0; 4,0]*	6,5 [5,5; 7,0]*	8,7 [5,9; 8,9]*	10,0 [9,0; 11,0]	11,5 [10,5; 2,0]*

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия согласно критериям Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уальда–Вольфовитца; * — со здоровой конечностью, # — с подгруппой 2а.

также показало отсутствие формирования периостальной костной мозоли и низкий суммарный балл по шкале RUST (4 балла). На 30-е сутки наблюдения на фоне озонотерапии на КТ выявлен периостальный регенерат костной мозоли, МПК в сравнении с кортикальным слоем контрлатеральной здоровой конечности составила 19%, что не имело значимых различий с группой 2а; средний общий балл по шкале RUST, равный 8,7, отражает активное формирование костной мозоли. На 90-е сутки в подгруппе 2б клинически также наблюдали отсутствие болевого синдрома при осевой, боковых и ротационных нагрузках на конечность; суммарный балл по шкале RUST составил 11,5, что подтверждает полное сращение перелома. При этом показатель МПК сформированной периостальной костной мозоли оказался на уровне 90% (против 78,2% в подгруппе 2а) и не имел значимых различий от показателя кортикального слоя здоровой контрлатеральной конечности, что свидетельствует о позитивном влиянии терапевтических концентраций медицинского озона на активность процессов метаболизма костной ткани.

На фоне системной озонотерапии изменились и показатели, характеризующие метаболизм костной ткани (см. табл. 3, 4).

Концентрация показателя резорбции костной ткани bCTX у пациентов, получающих озонотерапию (подгруппа 2б), на 30-е сутки была значимо выше относительно значений подгруппы 2а. В то время как показатель репарации костной ткани PICP в подгруппе 2б, получающей озонотерапию, уже начиная с 7 суток, а также на 30-е и 90-е сутки оказался значимо выше в сравнении с подгруппой 2а, что означает высокий уровень репаративных процессов в костной ткани, активно продолжающихся и на фоне клинических признаков сращения перелома бедренной кости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, костная ткань является динамической метаболической системой с высоким уровнем обмена веществ, обеспечивающим

непрерывные процессы костного ремоделирования. В условиях травматического повреждения костная ткань претерпевает ряд последовательных стадий, в ходе которых решаются задачи резорбции и репарации [9]. В течение первых пяти суток в зону мигрируют клеточные элементы: фибробласты, эндотелиоциты, лейкоциты, моноциты, способствующие некрозу поврежденных тканей. В то же время эти клетки, посредством своих молекулярных продуктов, индуцируют процессы образования грануляций с элементами мезенхимальной, костной, хрящевой, сосудистой тканей. Процесс альтерации — разрушения, некроза погибших или поврежденных клеток мягких тканей и кости сопровождаются интенсивными болевыми ощущениями. Международная ассоциация по изучению боли (IASP) трактует болевые ощущения пациента при травме как связанные как с истинным повреждением ткани, так и с неприятным сенсорным и эмоциональным переживанием, отражающим измененное болью психическое состояние. В условиях высокоэнергетического перелома крупных костей в основе болевых ощущений лежит гипералгезия ноцицептивного аппарата вследствие действия медиаторов воспаления (провоспалительных цитокинов, хемокинов, брадикинина), а также эфферентных влияний симпатно-адреналовой оси.

Развитие периостального, самого массивного слоя костной мозоли происходит за счет камбиального слоя надкостницы, богатого фибробластами, сосудами и остеобластами. В течение первых 5 недель формируется фиброзно-костная мозоль, которая в течение последующих 3–4 месяцев подвергается ремоделированию, что мы отчетливо наблюдали на КТ и этапах клинического осмотра. При этом активность метаболизма костной ткани, как процессов резорбции, так и репарации, на всех этапах динамического исследования (7-е, 30-е, 90-е сутки) оказалась значимо выше в сравнении с таковой у здоровых мужчин того же возраста, что свидетельствует о высокой активности метаболических процессов в динамике заболевания.

Применение физиотерапевтического лечения в виде малой аутогемоозонотерапии в комплексном

Таблица 3. Уровень С-концевых тепопептидов коллагена I типа в динамике озонотерапии при изолированном переломе бедренной кости (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Уровень bCTX, пг/мл					
Контрольная группа, n = 10	Подгруппы сравнения (n = 20)	Сроки наблюдения	7-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
355,6 [324,5; 378,6]	Подгруппа 2а (n = 10)		1572,3 [1452,3; 1638,4]*	1894,6 [1745,3; 2098,2]*	851,3 [745,9; 870,2]*
	Подгруппа 2б МАГОТ (n = 10)		1505,2 [1356,2; 1624,7]*	2289,4 [2145,3; 2365,4]**	915 [868,3; 925,4]*

Примечание: различия между группами получены с применением критериев Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уальда–Вольфовитца при $p < 0,05$; * — значимые различия с группой контроля, # — различия с подгруппой 2а.

Таблица 4. Уровень С-концевого пропептида проколлагена I типа (PICP) в динамике озонотерапии при изолированном переломе бедренной кости (Me [Q₂₅; Q₇₅])

Уровень PICP, нг/мл					
Контрольная группа, n = 10	Подгруппы сравнения (n = 20)	Сроки наблюдения	7-е сутки	30-е сутки	90-е сутки
41,4 [38,6; 43,6]	Подгруппа 2а (n = 10)		55,9 [49,1; 76,6]*	183,2 [174,6; 195,6]*	351,2 [312,3; 369,4]*
	Подгруппа 2б МАГОТ (n = 10)		106,5 [75,3; 138,6]**	268,3 [231,2; 286,3]**	584,6 [512,3; 589,3]**

Примечание: различия между группами получены с применением критериев Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уальда–Вольфовитца при $p < 0,05$; * — значимые различия с группой контроля, ** — различия с подгруппой 2а.

лечении неосложненного изолированного перелома диафиза бедренной кости позволило установить ряд положительных эффектов на течение данной патологии за счет мультимодальных свойств молекулярных продуктов озона. Процедура МАГОТ не предполагает непосредственного проникновения молекул озона или его молекулярных дериватов в системный кровоток, а, следовательно, озон не может достичь своих молекулярных мишеней. Однако смешивание некоторого объема крови и озонотоксической смеси в резервуаре шприца приводит к взаимодействию молекул озона с ненасыщенными жирными кислотами мембран клеток крови, а также компонентами плазмы с образованием альдегидов, гидропероксидов (перекись озона) и последующей трансформацией в H₂O₂ и альдегид-4-гидроксиноненаль (4-HNE), который является одним из наиболее активных альдегидов [10, 11]. Молекулы эндогенного пероксида водорода и 4-HNE являются вторичными мессенджерами и модулируют активность клеток иммунной системы, гемопоэтической ткани, участвуют в регуляции антиоксидантных клеточных систем [10, 11]. Известно, что H₂O₂ способен проникать в цитоплазму мононуклеарных клеток (моноцитов, макрофагов) и модулировать активность ядерного фактора NF-каппа В (NF-κB) [10].

Идет широкая дискуссия относительно гликопротеиновых эффектов 4-HNE на иммунную систему, опосредованных регуляторным влиянием на модуляцию пути NF-κB [10, 11]. Этот путь активирует высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как TNFα, INFγ, IL1β, IL6, IL8, а также индукцию провоспалительных генов, таких как циклооксигеназа-2 (COX-2) и индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS) [10, 11]. Терапевтическая доза O₃ блокирует сигнал NF-κB, уменьшая воспаление. При этом достижение гормональной роли озона играет решающую роль в управлении равновесными воспалительными / провоспалительными реакциями, что дает возможность его терапевтического применения при различных патологических процессах.

В литературе описан также анальгезирующий эффект озонотерапии, связанный с окислительной модификацией дериватами озона медиаторов воспаления, участвующих в передаче ноцицептивного сигнала в ЦНС, восстановлением баланса про- и антиоксидантных систем со снижением уровня тканевых токсичных молекулярных дериватов ПОЛ [12]. Полученные нами данные указывают и на активное влияние озонотерапии на процессы оптимизации репаративного остеогенеза, что подтверждает проведенный в динамике КТ-контроль, согласно которому уже на 30-е сутки имеет место более высокий суммарный балл по интегральной шкале консолидации перелома RUST, отражающий более высокие темпы формирования регенерата. Однако показатель МПК периостальной костной мозоли на фоне озонотерапии достиг значимых

различий с подгруппой 2а лишь к 90 суткам. В зоне новообразованной ткани на месте гематомы происходят сложные биохимические процессы, определяющие условия формирования регенерата, в которых особую регулирующую роль выполняют активированные Т-лимфоциты, остеокласты. Большинство регуляторных механизмов в костной ткани, опосредуемых иммунной системой, направлено на процессы резорбции [13, 14]. Ключевая роль в этом процессе принадлежит цитокиновой системе рецептора активатора NF-κB (RANK) и его лиганда (RANKL), а также остеопротегерина (OPG), отвечающих за остеокластогенез, регуляцию костной резорбции и ремоделирование костной ткани на этапах консолидации перелома [15]. Имеются работы, указывающие на максимальный (в 3 раза больше возрастной нормы) подъем bCTx через 3–4 месяца от момента перелома со значимым снижением через 6 месяцев [15]. Аналогичные данные получены при исследовании маркеров костного ремоделирования после сочетанного перелома бедренной кости и позвоночника, при этом отмечен максимальный подъем уровня bCTx и других маркеров резорбции (OPG (остеопротегерин) и RANKL) на 6–12-й неделе после травмы [16]. Есть мнение, что продукция остеобlastами OPG служит для модуляции баланса процессов ремоделирования кости и рецепторзависимой активации RANKL [16]. На наш взгляд, регуляторная роль озона опосредованно, через влияние неклассического вторичного мессенджера 4-HNE, заключается в способности модулировать процессы костного ремоделирования [17]. Косвенным подтверждением данного факта является и повышение показателя минеральной плотности периостальной мозоли на фоне озонотерапии, а также рост показателя резорбции bCTx на 30-е сутки относительно значений подгруппы 2а и показателя репарации костной ткани PICP уже начиная с 7 суток, а также на 30-е и 90-е сутки, что указывает на более высокий уровень метаболизма костной ткани на самых ранних стадиях формирования костного регенерата.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют позитивное влияние системной озонотерапии на процессы метаболизма костной ткани на этапах формирования костного регенерата при неосложненном изолированном переломе бедренной кости, о чем свидетельствует сравнительное повышение показателя минеральной плотности костной ткани и высокий суммарный балл показателя интенсивности консолидации перелома.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило выполнить поставленную цель и показало, что применение в комплексном лечении закрытого неосложненного изолированного перелома диафиза бедренной кости процедуры системной озонотерапии положительно влияет на качество и

интенсивность формирования костного регенерата, на что указывают значимые изменения МПК, увеличение суммарного балла по шкале RUST, более высокая интенсивность процессов костного ремоделирования.

Физиотерапевтическая процедура МАГОТ может быть использована в качестве дополнительного метода эфферентной физической терапии в комплексной терапии изучаемой патологии.

Литература

1. Bommakanti K, Feldhaus I, Motwani G, Dicker RA, Juillard C. Trauma registry implementation in low- and middle-income countries: challenges and opportunities. *J Surg Res*. 2018 Mar; 223: 72–86.
2. Agarwal-Harding KJ, Meara JG, Greenberg SL, Hagander LE, Zurakowski D, Dyer GS. Estimating the global incidence of femoral fracture from road traffic collisions: a literature review. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 Mar 18; 97 (6): e31. DOI: 10.2106/JBJS.N.00314.
3. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. *State of the art. Arch Med Res*. 2006; 37: 425–35.
4. Omar Seyam, Noel L. Smith, Ineeta Reid, Jason Gandhi, Wendy Jiang, Sardar Ali Khan. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med Gas Res*. 2018 Jul-Sep; 8 (3): 103–10.
5. Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J Biol Sci*. 2018 May; 25 (4): 672–9.
6. Помогаева Е. В., редактор. Современные классификации переломов костей нижней конечности. Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2016; 56 с.
7. Huskisson EC. Measurement of pain. *The Lancet*. 1974; 9 (2): 1127–31.
8. Leow JM, Clement ND, Tawonsawatruk T, Simpson CJ, Simpson RW. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures. *J Bone & Joint Research*. 2016; 5 (4): 116–21.
9. Хисматуллина З. Н. Факторы, оказывающие влияние на метаболизм костной ткани и приводящие к заболеваниям костной системы. Вестник Казанского технологического университета. 2015; 22. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/factory-okazyvayushchie-vliyaniye-na-metabolizm-kostnoy-tkani-i-privodyaschie-k-zabolevaniyam-kostnoy-sistemy> (дата обращения: 20.12.2020).
10. Bernardino C, Martínez-Sánchez FG, Llontop P, Aguiar-Bujanda D, Fernández-Pérez R, Santana-Rodríguez N. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects Antioxidants (Basel). 2019 Dec; 8 (12): 588. DOI: 10.3390/antiox8120588.
11. Bocci V, Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*. 2015; 3: 4.
12. Осиков М. В., Давыдова Е. В., Абрамов К. С. Врожденный иммунитет при изолированных переломах бедренной кости. Современные проблемы науки и образования. 2019; 1. Доступно по ссылке: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540> (дата обращения: 20.01.2020).
13. Korshunova AC, Yuryevna E, Lebedev VF. The role of interferons in the regulation of osteogenic and osteoresorptive processes. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 5–2 (87). Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-interferonov-v-regulyatsii-osteogennyh-i-osteorezorbivnyh-protsessov>.
14. Машейко И. В. Биохимические маркеры в оценке процессов ремоделирования костной ткани при остеопении и остеопорозе. Журнал ГрГМУ. 2017; 2. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/biohimicheskie-markery-v-otsenke-protsessov-remodelirovaniya-kostnoy-tkani-pri-osteopenii-i-osteoporoze> (дата обращения: 01.12.2020).
15. Аганов Д. С., Тыренко В. В., Цыган Е. Н., Топорков М. М., Бологов С. Г. Роль цитокиновой системы RANKL/RANK/OPG в регуляции минерального обмена костной ткани. Гены и клетки. 2014; 4. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-tsitokinovoy-sistemy-rankl-rank-opg-v-regulyatsii-mineralnogo-obmena-kostnoy-tkani> (дата обращения: 20.12.2020).
16. Sousa K, Dias I, Lopez-Peña M, Camassa J, Lourenço P. Bone turnover markers for early detection of fracture healing disturbances: A review of the scientific literature. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2015; 87 (2): 1049–1061. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520150008>.
17. Thakkar P, Naveen B, Prakash, Tharion G, Shetty Sh, Paul V, Bondu J, Yadav B. Evaluating Bone Loss with Bone Turnover Markers Following Acute Spinal Cord Injury. *Asian Spine Journal* 2020; 14 (1): 97–105. Available from: <https://doi.org/10.31616/asj.2019.0004>.

References

1. Bommakanti K, Feldhaus I, Motwani G, Dicker RA, Juillard C. Trauma registry implementation in low- and middle-income countries: challenges and opportunities. *J Surg Res*. 2018 Mar; 223: 72–86.
2. Agarwal-Harding KJ, Meara JG, Greenberg SL, Hagander LE, Zurakowski D, Dyer GS. Estimating the global incidence of femoral fracture from road traffic collisions: a literature review. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 Mar 18; 97 (6): e31. DOI: 10.2106/JBJS.N.00314.
3. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. *State of the art. Arch Med Res*. 2006; 37: 425–35.
4. Omar Seyam, Noel L. Smith, Ineeta Reid, Jason Gandhi, Wendy Jiang, Sardar Ali Khan. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med Gas Res*. 2018 Jul-Sep; 8 (3): 103–10.
5. Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J Biol Sci*. 2018 May; 25 (4): 672–9.
6. Pomogaeva EV, redaktor. Sovremennye klassifikatsii perelomov kostej nizhnej konechnosti. Ekaterinburg: Izd-vo UGMU, 2016; 56 s. Russian.
7. Huskisson EC. Measurement of pain. *The Lancet*. 1974; 9 (2): 1127–31.
8. Leow JM, Clement ND, Tawonsawatruk T, Simpson CJ, Simpson RW. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures. *J Bone & Joint Research*. 2016; 5 (4): 116–21.
9. Hismatullina ZN. Factors influencing the metabolism of bone tissue and leading to diseases of the bone system. *Bulletin of the Kazan technological University*. 2015; 22. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/factory-okazyvayushchie-vliyaniye-na-metabolizm-kostnoy-tkani-i-privodyaschie-k-zabolevaniyam-kostnoy-sistemy> (data obrashheniya: 20.12.2020). Russian.
10. Bernardino C, Martínez-Sánchez FG, Llontop P, Aguiar-Bujanda D, Fernández-Pérez R, Santana-Rodríguez N. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects Antioxidants (Basel). 2019 Dec; 8 (12): 588. DOI: 10.3390/antiox8120588.
11. Bocci V, Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*. 2015; 3: 4.
12. Osikov MV, Davydova EV, Abramov KS. Innate immunity in isolated femoral fractures. *Modern problems of science and education*. 2019; 1. Available from: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28540> (data obrashheniya: 20.01.2020). Russian.
13. Korshunova AC, Yuryevna E, Lebedev VF. The role of interferons

- in the regulation of osteogenic and osteoresorptive processes. *Acta Biomedica Scientifica*. 2012; 5–2 (87). Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-interferonov-v-regulyatsii-osteogennyh-i-osteorezorbivnyh-protsessov>.
14. Mashejko IV. Biohimicheskie markery v ocenke processov remodelirovaniya kostnoj tkani pri osteopenii i osteoporoze. *Zhurnal GrGMU*. 2017; 2. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/biohimicheskie-markery-v-otsenke-protsessov-remodelirovaniya-kostnoy-tkani-pri-osteopenii-i-osteoporoze> (data obrashheniya: 01.12.2020). Russian.
 15. Aganov DS, Tyrenko VV, Cygan EN, Toporkov MM, Bologov SG. Rol' citokinovoy sistemy RANKL/RANK/OPG v reguljacii mineral'nogo obmena kostnoj tkani. *Geny i kletki*. 2014; 4. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-tsitokinovoy-sistemy-rankl-rank-opg-v-regulyatsii-mineralnogo-obmena-kostnoy-tkani> (data obrashheniya: 20.12.2020). Russian.
 16. Sousa K, Dias I, Lopez-Peña M, Camassa J, Lourenço P. Bone turnover markers for early detection of fracture healing disturbances: A review of the scientific literature. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2015; 87 (2): 1049–1061. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520150008>.
 17. Thakkar P, Naveen B, Prakash, Tharion G, Shetty Sh, Paul V, Bondu J, Yadav B. Evaluating Bone Loss with Bone Turnover Markers Following Acute Spinal Cord Injury *Asian Spine Journal* 2020; 14 (1): 97–105. Available from: <https://doi.org/10.31616/asj.2019.0004>.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ПРЕДРАКОВЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА НА ПРИЕМЕ У СТОМАТОЛОГА

М. А. Постников¹, А. Г. Габриелян^{1,2} ✉, Д. А. Трунин¹, О. И. Каганов^{1,2}, В. П. Кириллова¹, А. М. Хамадеева¹, О. В. Осокин², И. С. Копецкий³, Д. А. Еремин³

¹ Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

² Самарский областной клинический онкологический диспансер, Самара, Россия

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

Поиск и применение доступных неинвазивных методов ранней диагностики новообразований слизистой оболочки рта (СОР) является актуальной задачей. Целью работы было выявить эффективность использования разработанного алгоритма балльной оценки данных клинического обследования в сочетании с проведением аутофлуоресцентной стоматоскопии (АФС) для постановки диагноза злокачественных новообразований СОР и принятия решения о необходимости проведения биопсии. Проведен анализ 134 амбулаторных карт больных, которым выполняли биопсию. Пациенты были разделены на две группы: в контрольную группу вошли 63 человека, которым после проведенного традиционного обследования (опроса, осмотра, пальпации) проводили инцизионную биопсию с последующим морфологическим исследованием; у 71 пациента основной группы применяли (ИНГВ). Установлено, что патологические состояния СОР локализовались в большей степени на языке у 72,4% пациентов в обеих группах. После выполненных биопсий в основной группе злокачественные опухоли СОР были диагностированы у 28 пациентов, в контрольной — у 14 ($p = 0,051$). В основной группе начальные стадии рака СОР установлены у 17 человек после биопсии, в контрольной — у 4 ($p = 0,004$). Использование разработанного алгоритма позволило с высоким процентом точности (90%) диагностировать предраковые и злокачественные новообразования и проводить инвазивные методы исследования (биопсию) строго по показаниям.

Ключевые слова: слизистая оболочка рта, СОР, предрак, злокачественное образование, индекс необходимости гистологической верификации, ИНГВ

Вклад авторов: М. А. Постников — анализ литературы; А. Г. Габриелян — планирование исследования; Д. А. Трунин, И. С. Копецкий, Д. А. Еремин — анализ данных; О. И. Каганов — подготовка черновика рукописи; В. П. Кириллова — обработка и анализ первичной документации; А. М. Хамадеева — интерпретация данных; О. В. Осокин — сбор данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (протокол № 27 от 12 февраля 2018 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Григорьевич Габриелян
ул. Мичурина, д. 138, кв. 85, г. Самара, 443086; gabriel_002@mail.ru

Статья получена: 18.12.2020 **Статья принята к печати:** 29.01.2021 **Опубликована онлайн:** 18.02.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.005

REFINEMENT OF NONINVASIVE METHODS FOR DIAGNOSING PRECANCER AND CANCER OF ORAL MUCOSA IN GENERAL DENTAL PRACTICE

Postnikov MA¹, Gabrielyan AG^{1,2} ✉, Trunin DA¹, Kaganov OI^{1,2}, Kirillova VP¹, Khamadeeva AM¹, Osokin OV², Kopetskiy IS³, Eremin DA³

¹ Samara State Medical University, Samara, Russia

² Samara Regional Clinical Cancer Center, Samara, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The search for and the application of available noninvasive methods for early diagnosis of oral mucosa (OM) neoplasia is a clinically significant problem. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the original score-based algorithm for assessing clinical data generated by a conventional and an autofluorescence-based examination in diagnosing OM cancer and assessing indications for a biopsy. We analyzed 134 medical histories and pathology reports of patients with oral neoplasia. The patients were assigned to 2 groups: the control group included 63 patients who underwent a standard visual and tactile examination with history taking and then were referred for an incisional biopsy followed by a histopathological examination of the specimens. In the main group consisting of 71 patients, a standard visual and tactile examination was complemented by an autofluorescence-based examination and the original score-based algorithm with the original index of required histopathological verification (RHV) were used to assess indications for a biopsy. In both groups, the most commonly affected site was the tongue (72.4%). The histopathological examination revealed that 28 patients from the main group and 14 patients from the control group had OM cancer ($p = 0.051$). Histologically, early-stage cancer was diagnosed in 17 patients from the main group and in 4 patients from the control group ($p = 0.004$). The proposed algorithm allowed us to effectively (in 90% of cases) diagnose precancer and cancer and avoid unnecessary biopsies.

Keywords: oral mucosa, precancer, cancer, required histological verification index (RHV)

Author contribution: Postnikov MA — literature analysis; Gabrielyan AG — study planning; Trunin DA, Kopetskiy IS, Eremin DA — analysis of the obtained data; Kaganov OI — manuscript draft; Kirillova VP — analysis of patients' records; Khamadeeva AM — interpretation of the obtained results; Osokin OV — data acquisition.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Samara State Medial University (Protocol № 27 dated February 12, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey G. Gabrielyan
Michurina, 138, kv. 85, Samara, 443086; gabriel_002@mail.ru

Received: 18.12.2020 **Accepted:** 29.01.2021 **Published online:** 18.02.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.005

Согласно статистическим данным, ежегодно в мире регистрируют более 300 тыс. новых случаев злокачественных опухолей слизистой оболочки рта (СОР) [1]. В 2018 г. диагноз злокачественного образования СОР в России был поставлен более 9 тыс. больным, а в Самарской области — 199 пациентам. Занимая 18 ранговое место в структуре онкологической заболеваемости, диагноз «злокачественное образование СОР» в РФ подтвержден морфологически у 97% больных [2]. Несмотря на то что опухоли СОР относят к наружным локализациям, процент запущенных стадий по-прежнему остается достаточно высоким и достигает в РФ 62%, а в Самарской области — 63%. К основным причинам поздней диагностики злокачественных образований СОР необходимо отнести отсутствие должной онкологической настороженности врачей стоматологов, просвещенности населения, скрининговых программ. В настоящее время врачи первичного звена работают в системе вторичной профилактики и при обращении пациентов к стоматологу у последних, в свою очередь, нет четкого алгоритма обследования с целью выявления новообразований СОР, что ведет зачастую к ошибочным диагнозам [3–5]. Клинический осмотр остается основным методом обследования при подозрении на злокачественный процесс [6–8]. Однако данный метод не позволяет поставить диагноз, в связи с чем большую часть пациентов с подозрением на злокачественные новообразования СОР направляют к онкологу с целью биопсии, что, в свою очередь, может привести к гипердиагностике [9–11]. Биопсия образований СОР является инвазивным методом взятия ткани для гистологического исследования с целью дифференциальной диагностики и установления диагноза. Данная процедура в ряде случаев приводит к нежелательным последствиям, поэтому ее необходимо проводить по строгим показаниям в первую очередь при подозрении на злокачественный процесс СОР. От гистологического заключения зависит: постановка правильного диагноза, последующее своевременное лечение и прогноз заболевания. По этой причине биопсию образований СОР применяют исключительно в случае дифференциальной диагностики, ее показания должны быть обоснованными. Метод аутофлуоресцентной стоматоскопии в диагностике новообразований СОР известен достаточно давно [12–14]. В зарубежной и отечественной литературе опубликовано множество работ, посвященных данному методу, но без какой-либо связи ее с имеющимся опросом и клиническим осмотром [15–18].

В 2019 г. была подана заявка и в 2020 г. получен патент РФ на изобретение «Способа определения показаний для выполнения гистологической верификации образования красной каймы губ и слизистой полости рта у больного на приеме у врача стоматолога», которое было применено в качестве неинвазивного метода обследования [19].

Цель исследования — выявить эффективность использования разработанного алгоритма балльной оценки данных клинического обследования пациента в сочетании с проведением аутофлуоресцентной стоматоскопии (АФС) для постановки диагноза предраковых и злокачественных новообразований слизистой оболочки рта и принятия решения о необходимости проведения биопсии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ 134 амбулаторных карт больных с новообразованиями СОР и результатами биопсии, обследуемых в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере в период с 2014 по 2019 г., направленных от стоматологов городских поликлиник г. Самары.

Пациенты были разделены на две группы в зависимости от примененных методов обследования. В контрольную группу (М2) вошли 63 пациента, которые были направлены к онкологу стоматологами в период с 2014 по 2019 г. с диагнозом новообразования СОР. После проведенного традиционного обследования, включающего опрос с выяснением жалоб, осмотр и пальпацию, проводили инцизионную биопсию и последующее морфологическое исследование образцов в условиях онкологического диспансера. В основной группе (М1) 71 пациенту на первичном приеме у стоматолога наряду с опросом и осмотром был применен разработанный способ балльной оценки выявленных факторов риска для определения показаний к биопсии и индекса гистологической верификации (ИНГВ), для чего кроме традиционных методов обследования (опроса, осмотра, пальпации) применяли АФС с целью дифференциальной диагностики воспалительных и предраковых поражений и злокачественных новообразований (рис. 1). Инцизионную биопсию в обеих группах выполняли под местным обезболиванием при помощи оториноларингологических конхатомов с последующим морфологическим исследованием (рис. 2). В основной группе ее проводили только тем пациентам, у которых ИНГВ превышал 5 баллов.

Таблица 1. Распределение больных в группах сравнения по локализации патологических состояний СОР

Локализация	Группы			
	Контрольная М2 <i>n</i> = 63		Основная М1 <i>n</i> = 71	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Язык	29	46	33	47
Альвеолярная часть верхней челюсти	1	2	–	0
Альвеолярная часть нижней челюсти	3	5	1	1
Дно полости рта	14	22	17	24
Твердое небо	2	3	3	4
Мягкое небо	1	2	2	3
Щека	13	20	15	21
Всего	63	100	71	100

Примечание: критерий Пирсона 2,7567; *p* = 0,8386.

Критерии включения пациентов: пациенты любого возраста и пола; пациенты с поверхностными новообразованиями СОР, первично направленные от стоматолога к онкологу. Критерий исключения: пациенты, направленные от других специалистов или обратившиеся к онкологу самостоятельно; отказ пациента от обследования; наличие подслизистых новообразований СОР.

Пациенты были сопоставимы по полу (М : Ж как 3 : 1; $p = 0,858$), возрасту (в контрольной группе — $63 \pm 2,8$ года, в основной — $71 \pm 2,8$ года), локализации новообразования (табл. 1). Новый способ, примененный в основной группе, представлен в виде протокола, где определяют анамнестические данные, проводят осмотр, оценивают результат пальпации, осуществляют осмотр с помощью аутофлуоресцентной лампы «АФС400» («Полироник»; Россия). Каждый метод в протоколе оценивают по балльной системе. Для облегчения и фиксации полученной суммы баллов авторами был применен ИНГВ. Значение индекса фиксируется в графе таблицы с буквенной отметкой топографического расположения очага поражения.

На каждый выявленный очаг необходимо заполнить отдельный протокол и рассчитать индекс. При значении индекса менее 5 рекомендуются наблюдение и лечение у стоматолога с последующим повторным обследованием, при значении 5 и выше показана биопсия образований СОР. Основным критерий оценки эффективности данного алгоритма обследования — подтверждение диагноза «предраковое заболевание» или «злокачественное новообразование» после выполненных биопсий и морфологического исследования. Пример осмотра при естественном освещении и при помощи лампы АФС образования языка по данному способу с расчетом ИНГВ представлен на рис. 1–4. При сравнении данных пациентов основной и контрольной групп оценивали такие показатели, как характер жалоб; патологические процессы, выявленные при осмотре; процент предраковых заболеваний, злокачественных опухолей и стадии злокачественного новообразования после получения гистологического заключения. В работе использовали многофакторные модели логистической регрессии у

Дата: Прием первичный / повторный (нужное подчеркнуть)	БАЛЛЫ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОСМОТРА, ПАЛЬПАЦИИ И ОСМОТРА С АФС КРАСНОЙ КАЙМЫ ГУБ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА
Ф.И.О.		
Дата рождения		
ОПРОС (нужное подчеркнуть) Наличие жалоб — 0,25 балла, отсутствие — 0 баллов Длительность жалоб 14 дней и более — 0,25 балла, менее 14 дней — 0 баллов Наличие вредных привычек (кроме курения) — 0,25 балла Курение — 0,5 баллов Отсутствие вредных привычек — 0 баллов Наличие эпизодического контакта с вредными производственными факторами — 0,25 баллов Отсутствие контакта с вредными производственными факторами — 0 баллов	0,25 0,25 0 0	a) губа красная кайма / слизистая, угол верхняя / нижняя / справа / слева b) преддверие верхнее / нижнее / справа / слева c) слизистая альвеолярного отростка с вестибулярной стороны на верхней / нижней челюсти, справа / слева / фронтальный отдел d) слизистая щеки справа / слева e) слизистая альвеолярного отростка с язычной стороны на верхней / нижней челюсти, справа / слева / фронтальный отдел f) ретромолярное пространство справа / слева g) слизистая дна полости рта фронтального / бокового отделов / справа / слева h) нижняя поверхность языка справа/слева i) боковая поверхность языка справа / слева j) кончик языка k) спинка языка справа / слева l) корень языка справа / слева m) слизистая твердого неба справа / слева n) слизистая мягкого неба справа / слева o) передние небные дужки справа / слева
ОСМОТР (нужное подчеркнуть) Наличие при визуальном осмотре эрозии, эксфолиации, афты, язвы, трещины, корки, рубца, гиперкератоза — 2 балла Наличие пятна, узла, узелка, бугорка, пузырька, пузыря, гнойника, кисты — 1 балл Отсутствие образований — 0 баллов Наличие санированной ротовой полости — 0 баллов Несанированная ротовая полость — 0,25 балла	2 0,25	Примечание: нужное подчеркнуть
ПАЛЬПАЦИЯ (нужное подчеркнуть) Отсутствие пальпируемого образования — 0 баллов Наличие пальпируемого образования — 1 балл Наличие пальпируемых региональных лимфатических узлов — 0,5 баллов Отсутствие пальпируемых региональных лимфатических узлов — 0 баллов	1 0	
ОСМОТ АФС (нужное подчеркнуть) Наличие коричнево-темного свечения — 2 балла Наличие розово-красного свечения — 1 балл Наличие зеленого свечения — 0 баллов	2	
ИНГВ	ИНГВ = 5,75j	

Рис. 1. Способ определения показаний для выполнения гистологической верификации образования красной каймы губ и слизистой полости рта у больного на приеме у врача стоматолога

больных с образованиями слизистой оболочки полости рта. Критерий значимости $p < 0,05$ (величину p менее 0,05 считали значимой). Все статистические анализы были выполнены с использованием Statistica 10.0 (Dell; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке жалоб пациентов основной и контрольной групп определено их различие. Пациенты указывали на наличие образования в основной группе реже, чем в контрольной группе (в 0,54 и 1,17 раза соответственно). Боль пациенты отмечали в основной группе М1 в 23,9% случаев, а в контрольной группе М2 — в 47,6% случаев. В обеих группах выявлен высокий дискомфорт, жжение и зуд — в равной мере (рис. 5). Сравнительная характеристика признаков заболевания, определенных при клиническом обследовании пациентов групп М1 и М2, представлена в табл. 3. Изменение цвета слизистой полости рта в 0,82 раза чаще выявлено в основной группе, чем в контрольной (54,9% случаев в сравнении с 28,4% случаев). Наличие налета зафиксировано в равной мере (62,0% и 60,3% случаев), а гиперкератоз — в 45,1% и в 58,7% случаев. Обнаружено значительное превалирование эрозий в контрольной группе (55,6% по сравнению с 36,6% случаев у пациентов основной группы). Гиперплазия и атрофия выявлены от 11,1% до 31,0% случаев.

После выполнения биопсии и получения гистологического заключения предраковые заболевания подтверждены у 18 пациентов основной и у 36 пациентов контрольной группы с существенной разницей ($p = 0,016$). В то же время в основной группе злокачественные заболевания СОР диагностированы в 28 случаях, в группе сравнения — в 14 ($p = 0,051$). Воспалительный процесс в основной группе обнаружен у 7 пациентов, а в контрольной — у 31 пациента ($p = 0,001$) (рис. 6). В основной группе начальные стадии рака СОР установлены у 17 пациентов после биопсии, в контрольной — у 4 ($p = 0,004$). Значимых различий в диагностике запущенных стадий в группах сравнения нет, они выявлены у 11 пациентов контрольной и у 10 основной группы (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследованием установлено, что жалобы на боль, жжение, дискомфорт, наличие эрозий были более выражены в контрольной группе, а в основной чаще выявляли налет и гиперплазию тканей. Патологические состояния СОР локализовались в большей степени на языке как в контрольной (46%), так и в основной (47%) группах, что не противоречит данным современных исследований [2, 5]. Пациенты с воспалительными процессами СОР представляют наибольшее затруднение в плане диагностики и особенно дифференциальной диагностики у врачей — стоматологов первичного звена и наиболее часто необоснованно направляются на инвазивные методы обследования. В целом применение алгоритма балльной оценки данных клинического обследования пациента и АФС для выполнения гистологической верификации образования красной каймы губ и слизистой полости рта у больного на приеме у врача стоматолога позволило подтвердить предраковые и злокачественные заболевания СОР у 90% больных основной группы, а в группе сравнения при традиционном обследовании — у 51% пациентов ($p = 0,001$). С точки зрения ранней диагностики, точнее с позиции вторичной профилактики, когда в основном работают врачи первичного звена,



Рис. 2. Биопсия новообразования слизистой щеки



Рис. 3. Образование на слизистой языка при клиническом осмотре

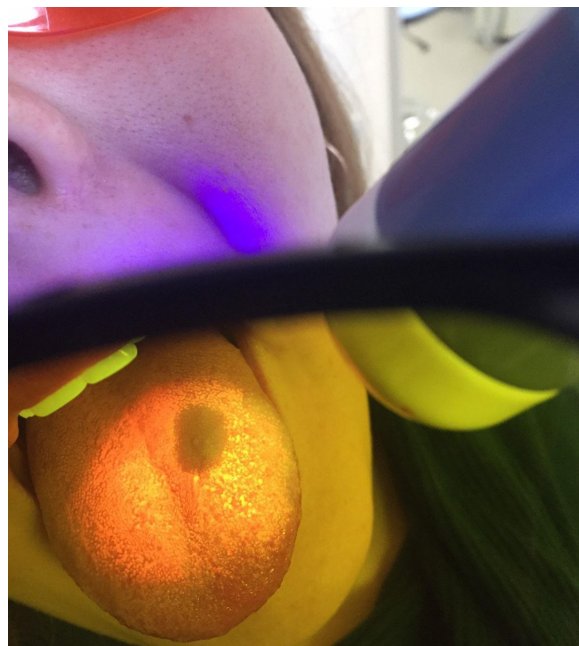


Рис. 4. Коричневое свечение образования языка в лучах

Таблица 2. Распределение жалоб, определенных при клиническом обследовании пациентов основной (M1) и контрольной (M2) групп

Группы	Жалобы	Наличие образования	Боль	Дискомфорт	Жжение	Зуд	Кровотечение
M1	Выявлены	35,2%	23,9%	64,8%	40,8%	29,6%	7,04%
	Не выявлены	64,8%	76,1%	35,2%	59,2%	70,4%	92,96%
	Различие	0,54 раза	3,17 раза	1,84 раза	1,45 раза	0,98 раза	13,2 раза
M2	Выявлены	53,9%	47,6%	47,6%	42,9%	39,7%	22,2%
	Не выявлены	46,1%	52,4%	19,1%	57,1%	60,3%	77,8%
	Различие	1,17 раза	1,1 раза	4,25 раза	1,33 раза	1,52 раза	3,5 раза

выявление предраковых и злокачественных опухолей в основной группе, т. е. с применением нового способа, имеет существенные преимущества по сравнению с применением традиционного метода. Согласно ранее проведенным исследованиям, метод осмотра не может служить диагностическим тестом в дифференциальной диагностике и наряду с ним применяют дополнительные флуоресцентные методы и ряд других, что в наших

наблюдениях показало их эффективность в комбинации с имеющимися традиционными [12, 14–16].

ВЫВОДЫ

Использование разработанного алгоритма балльной оценки данных клинического обследования пациента в сочетании с проведением АФС позволило с высоким

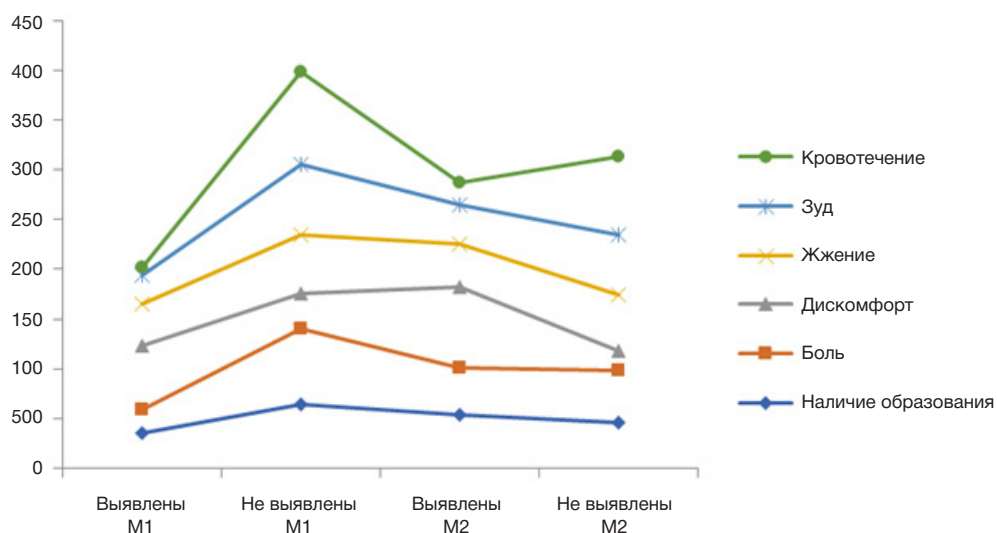


Рис. 5. Распределение жалоб, определенных при клиническом обследовании пациентов основной (M1) и контрольной (M2) групп

Таблица 3. Сравнительная характеристика признаков заболевания, определенных при клиническом обследовании пациентов основной (M1) и контрольной (M2) групп (стационарная лампа — естественное освещение)

Осмотр СОР		Изменение цвета слизистой	Увлажненность (блеск) слизистой	Налет			Патологические признаки			
				Наличие	Удаляемый	Не удаляемый	Гиперкератоз	Гиперплазия	Атрофия	Эрозия / язва
M1	Выявлены	54,9%	43,7%	62,0%	31,0%	28,2%	45,1%	31,0%	12,7%	36,6%
	Не выявлены	45,1%	56,3%	38,0%	69,0%	71,8%	54,9%	69,0%	87,3%	63,4%
	Различие	0,82 раза	1,29 раза	1,63 раза	2,23 раза	2,55 раза	1,22 раза	2,23 раза	6,9 раза	1,73 раза
M2	Выявлены	28,4%	53,9%	60,3%	33,8%	36,5%	58,7%	17,5%	11,1%	55,6%
	Не выявлены	71,4%	46,1%	39,7%	66,2%	63,5%	41,3%	82,5%	88,9%	44,4%
	Различие	2,5 раза	1,17 раза	1,52 раза	3,2 раза	1,7 раза	1,42 раза	4,7 раза	8,0 раза	1,25 раза



Рис. 6. Распределение пациентов в группах сравнения по диагнозам после гистологического исследования

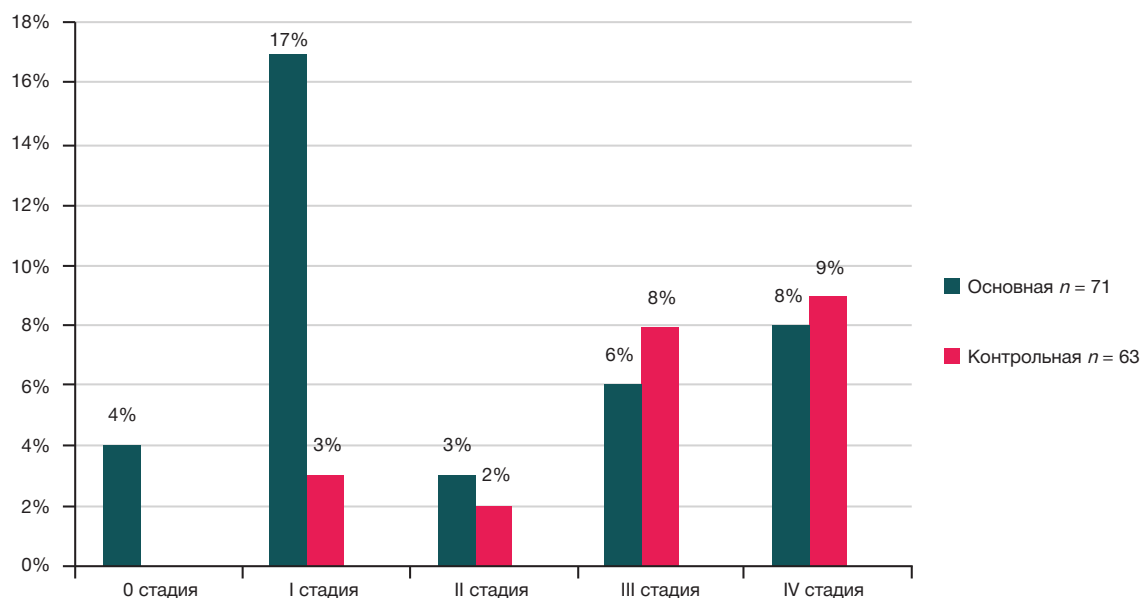


Рис. 7. Распределение пациентов в группах сравнения по стадии заболевания злокачественных опухолей COP

процентом эффективности (90%) диагностировать предраковые и злокачественные новообразования, а также диагностировать начальные стадии рака COP в

сравнении с традиционными методами обследования (24% и 5% соответственно) и проводить инвазивные методы исследования (биопсию) строго по показаниям.

Литература

- Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадовой А. О. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020; с. 239.
- Стариков В. И. Опухоли головы и шеи: учебное пособие для студентов IV курса стоматологического факультета. Харьков: 2014; с. 73.
- Доманин А. А., Солнышкина А. Ф. Диагностика предрака слизистой оболочки полости рта. Приволжский онкологический вестник. 2011; 1: 45–46.
- Костина И. Н. Структура, локализация опухолевых и опухолеподобных заболеваний полости рта. Проблемы стоматологии. 2014; 4: 33–39.
- Николенко В. Н. и др. Современный взгляд на диагностику и лечение рака слизистой оболочки полости рта. Голова и шея. 2018; 4: 36–42.
- Степанов Д. А., Федорова М. Г., Аверкин Н. С. Морфологические исследования в стоматологии. Вестник Пензенского государственного университета. 2019; 1 (25): 80–85.
- Филимонова Л. Б., Межевикина Г. С., Маршуба Л. О. Использование аутофлуоресцентной стоматоскопии как скринингового метода диагностики предраковых состояний и онкологических заболеваний слизистой оболочки рта на стоматологическом приеме. Наука молодых. 2020; 8 (1): 80–85.
- Межевикина Г. С., Глухова Е. А. Современные методы диагностики предраковых и раковых изменений слизистой оболочки рта. Наука молодых. 2018; 6 (4): 600–6.
- Ephros H. Oral Tissue Biopsy. Medscape. 2018: 1–13.

11. Леонтьева Е. С., Егоров М. А., Кузнецова Р. Г. Иммуногистохимические маркеры в диагностике предраковых поражений слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ. Практическая медицина. 2012; 1: 20–22.
12. Максимовская Л. Н., Эрк А. А., Булгакова Н. Н., Зубов Б. В. Применение аутофлуоресцентной стоматоскопии для онкоскрининга заболеваний слизистой оболочки полости рта. Стоматология для всех. 2016; 4 (77): 34–37.
13. Пурсанова А. Е., Казарина Л. Н., Гущина О. О., Серхель Е. В., Белозеров А. Е., Абаев З. М. Клинико-иммунологические особенности предраковых заболеваний слизистой оболочки рта и красной каймы губ. Стоматология. 2018; 5: 23–26.
14. Позднякова Т. И., Смирнова Ю. А., Волков Е. А., Булгакова Н. Н. Возможности аутофлуоресцентной спектроскопии в выявлении предраковых заболеваний слизистой оболочки полости рта. Дентал-Ревю. 2013; 2: 46–47.
15. Amirchaghmaghi M, Mohtasham N, Delavarian Z, Shakeri MT, Hatami M, Mozafari PM. The diagnostic value of the native fluorescence visualization device for early detection of premalignant/malignant lesions of the oral cavity. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018; 21: 19–27.
16. Simonato LE, Tomo S, Navarro RS, Villaverde AGJB. Fluorescence visualization improves the detection of oral, potentially malignant, disorders in population screening. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27: 74–8.
17. Meleti M, Giovannacci I, Vescovi P, Pedrazzi G, Govoni P, Magnoni C. Histopathological determinants of autofluorescence patterns in oral carcinoma. Oral Dis. 2020.
18. Шухорова Ю. А., Ткач Т. М., Буракшаев С. А., Постников М. А. Онконастороженность в практике врача-стоматолога на амбулаторном приеме. Институт стоматологии. 2020; 3 (88): 20–22.
19. Орлов А. Е., Каганов О. И., Постников М. А., Воздвиженский М. О., Трунин Д. А., Махонин А. А., Габриелян А. Г., Ткачев М. В., Кирилова В. П., Осокин О. В., Керосиров А. П., Ахмадиева Е. О., Баранов Р. А., Шурыгина О. В., авторы. Способ определения показаний для выполнения гистологической верификации образования красной каймы губ и слизистой полости рта у больного на приеме у врача стоматолога. Патент РФ № 2019133760. 22.10.2019.

References

1. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.
2. Kaprin AD, Starinskii VV, Shakhzadovoi AO. Sostojanie onkologicheskoy pomoshhi naseleniju Rossii v 2019 godu. M.: MNIOL im. P. A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2020; s. 239. Russian.
3. Starikov VI. Opuholi golovy i shei: uchebnoe posobie dlja studentov IV kursa stomatologicheskogo fakul'teta. Har'kov: 2014; s. 73. Russian.
4. Domanin AA, Solnyshkina AF. Diagnostika predraka slizistoj obolochki polosti rta. Privolzhskij onkologicheskij vestnik. 2011; 1: 45–46. Russian.
5. Kostina IN. Struktura, lokalizacija opuholevyh i opuholepodobnyh zabolevanij polosti rta. Problemy stomatologii. 2014; 4: 33–39. Russian.
6. Nikolenko V. N. i dr. Sovremennij vzgljad na diagnostiku i lechenie raka slizistoj obolochki polosti rta. Golova i sheja. 2018; 4: 36–42. Russian.
7. Stepanov DA, Fedorova MG, Averkin NS. Morfologicheskie issledovanija v stomatologii. Vestnik Penzenskogo gosudarstvennogo universiteta. 2019; 1 (25): 80–85. Russian.
8. Filimonova LB, Mezhevikina GS, Marshuba LO. Ispol'zovanie autofluorescentnoj stomatoskopii kak skринingovogo metoda diagnostiki predrakovyh sostojanij i onkologicheskix zabolevanij slizistoj obolochki rta na stomatologicheskom prieme. Nauka molodyh. 2020; 8 (1): 80–85. Russian.
9. Mezhevikina GS, Gluhova EA. Sovremennye metody diagnostiki predrakovyh i rakovyh izmenenij slizistoj obolochki rta. Nauka molodyh. 2018; 6 (4): 600–6. Russian.
10. Ephros H. Oral Tissue Biopsy. Medscape. 2018: 1–13.
11. Leonteva ES, Egorov MA, Kuznecova RG. Immunogistochemicheskie markery v diagnostike predrakovyh porazhenij slizistoj obolochki polosti rta i krasnoj kajmy губ. Prakticheskaja medicina. 2012; 1: 20–22. Russian.
12. Maksimovskaya LN, Erk AA, Bulgakova NN, Zubov BV. Primenenie autofluorescentnoj stomatoskopii dlja onkoskrininga zabolevanij slizistoj obolochki polosti rta. Stomatologija dlja vseh. 2016; 4 (77): 34–37.
13. Pursanova AE, Kazarina LN, Gushchina OO, Serhel EV, Belozеров AE, Abaev ZM. Kliniko-immunologicheskie osobennosti predrakovyh zabolevanij slizistoj obolochki rta i krasnoj kajmy губ. Stomatologija. 2018; 5: 23–26.
14. Pozdnyakova TI, Smirnova YuA, Volkov EA, Bulgakova NN. Vozmozhnosti autofluorescentnoj spektroskopii v vyjavlenii predrakovyh zabolevanij slizistoj obolochki polosti rta. Dental-Revju. 2013; 2: 46–47.
15. Amirchaghmaghi M, Mohtasham N, Delavarian Z, Shakeri MT, Hatami M, Mozafari PM. The diagnostic value of the native fluorescence visualization device for early detection of premalignant/malignant lesions of the oral cavity. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018; 21: 19–27.
16. Simonato LE, Tomo S, Navarro RS, Villaverde AGJB. Fluorescence visualization improves the detection of oral, potentially malignant, disorders in population screening. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27: 74–8.
17. Meleti M, Giovannacci I, Vescovi P, Pedrazzi G, Govoni P, Magnoni C. Histopathological determinants of autofluorescence patterns in oral carcinoma. Oral Dis. 2020.
18. Shuhorova YuA, Tkach TM, Burakshaev SA, Postnikov MA. Onkonastorozhennost v praktike vracha-stomatologa na ambulatornom prieme. Institut stomatologii. 2020; 3 (88): 20–22.
19. Orlov AE, Kaganov OI, Postnikov MA, Vozdvizhensky MO, Trunin DA, Makhonin AA, Gabrielyan AG, Tkachev MV, Kirilova VP, Osokin OV, Kerosirov AP, Akhmadieva EO, Baranov RA, Shurygina OV, avtory. Sposob opredelenija pokazanij dlja vypolnenija gistologicheskoy verifikacii obrazovaniya krasnoj kajmy губ i slizistoj polosti rta u bol'nogo na prieme u vracha stomatologa. Patent RF # 2019133760. 22.10.2019.