

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 Евгений Лукьянов

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.2021-03

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.06.2021
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 Evgeniy Lukyanov

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

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

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

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

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 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.2021-03

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 30.06.2021
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР

5

Персистенция коронавируса SARS-CoV-2 в телах умерших и меры защиты от инфицирования
А. И. Щеголев, У. Н. Туманова

Persistence of SARS-CoV-2 in deceased patients and safe handling of infected bodies
Shchegolev AI, Tumanova UN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

13

Изменение аминокислотного профиля плазмы пуповинной крови и амниотической жидкости от матерей с COVID-19
Н. А. Ломова, В. В. Чаговец, Е. Л. Долгополова, А. В. Новоселова, У. Л. Петрова, Р. Г. Шмаков, В. Е. Франкевич

Changes in amino acid profile of cord blood plasma and amniotic fluid of mothers with COVID-19
Lomova NA, Chagovets VV, Dolgopola EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

25

Изменение содержания цитокинов семейства IL1 в крови больных эссенциальной гипертензией после COVID-19
О. А. Радаева, А. С. Симбирцев, Ю. А. Костина, М. С. Искандарова, С. В. Машнина, Д. Д. Бессейнов, Е. В. Негоднова, В. В. Куляпкин

Changes in blood levels of IL1 family cytokines in patients with essential hypertension after having COVID-19
Radaeva OA, Simbirtsev AS, Kostina YuA, Iskandaryova MS, Mashnina SV, Bessheynev DD, Negodnova EV, Kulyapkin VV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

32

Экстренная хирургическая помощь больным новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и туберкулезом в многопрофильной клинике
М. Н. Решетников, Д. В. Плотикин, О. Н. Зубань, Е. М. Богородская

Emergency surgical care for patients with COVID-19 and tuberculosis coinfection at multispecialty hospital
Reshetnikov MN, Plotkin DV, Zuban ON, Bogorodskaya EM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

39

Изменение концентрации сфинголипидов в плазме крови на фоне гиполипидемической терапии у пациентов с ранним атеросклерозом
А. А. Рогожина, А. В. Алесенко, И. Н. Курочкин, Л. О. Минушкина, У. А. Гутнер, М. А. Шулик, О. А. Малошицкая, А. Т. Лебедев, Д. А. Затеишников

Changes in plasma sphingolipid levels against the background of lipid-lowering therapy in patients with premature atherosclerosis
Rogozhina AA, Alesenko AV, Kurochkin IN, Minushkina LO, Gutner UA, Shupik MA, Maloshitskaya OA, Lebedev AT, Zateyshnikov DA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

49

Производное бензимидазола как противоопухолевое средство в отношении экспериментальной злокачественной опухоли легкого
Е. Ф. Комарова, О. Н. Жуковская, Е. А. Лукбанова, М. А. Енгибарян, Л. Н. Ващенко, Д. А. Харагезов, В. В. Позднякова, Н. Д. Ушакова, Ю. С. Шатова, Ю. В. Пржедецкий

Benzimidazole derivative as antitumor drug against experimentally induced lung carcinoma
Komarova EF, Zhukovskaya ON, Lukbanova EA, Yengibaryan MA, Vashenko LN, Kharagezov DA, Pozdnyakova VV, Ushakova ND, Shatova YuS, Przhedetsky YuV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

54

Структурно-функциональные биомаркеры эффективности навигационной ритмической транскраниальной магнитной стимуляции в лечении невралгии тройничного нерва
А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, И. С. Бакулин, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов

Structural and functional biomarkers of efficacy of navigated repetitive transcranial magnetic stimulation in therapy for trigeminal neuralgia
Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Bakulin IS, Suponeva NA, Piradov MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

63

Полиморфизм гена *CDKN2B-AS1* ассоциирован с первичной открытоугольной глаукомой у женщин Центрального Черноземья России
Н. В. Елисеева, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносков

CDKN2B-AS1 gene polymorphism is associated with primary open-angle glaucoma in women of the Central Black Earth Region, Russia
Eliseeva NV, Ponomarenko IV, Churnosov MI

МЕТОД

72

Исследование молекулярно-клеточных характеристик аутоотрансплантатов нижней челюсти с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния
Г. В. Максимов, Т. И. Сашкина, Д. К. Фасхутдинов, О. В. Слатинская, И. В. Салдусова, О. В. Зайченко

Molecular and cellular features of mandibular autografts studied using Raman spectroscopy
Maksimov GV, Sashkina TI, Fashutdinov DK, Slatinskaya OV, Saldusova IV, Zaychenko OV

Перспективы использования биолюминесцентной системы *Chaetopterus variopedatus* для мониторинга ферроптоза в живых организмах
А. С. Щеглов, А. С. Царькова

The potential of using the bioluminescent system of *Chaetopterus variopedatus* to study ferroptosis in living organisms
Shcheglov AS, Tsarkova AS

Современные проблемы в изучении распространенности и диагностике расстройств шизофренического спектра у детей и подростков
О. Ф. Панкова, Н. М. Казин, С. М. Иванова

Schizophrenia spectrum disorders in children and adolescents: prevalence and diagnostics
Pankova OF, Kazin NM, Ivanova SM

ПЕРСИСТЕНЦИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 В ТЕЛАХ УМЕРШИХ И МЕРЫ ЗАЩИТЫ ОТ ИНФИЦИРОВАНИЯ

А. И. Щеголев^{1,2}✉, У. Н. Туманова¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

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

Представлен анализ данных литературы о времени сохранения SARS-CoV-2 в телах умерших, путях заражения от трупов больных с COVID-19 и необходимых способах защиты от такого заражения. Показано, что для SARS-CoV-2 характерен достаточно длительный период персистенции в тканях и жидкостях тел умерших больных с COVID-19, а также на различных поверхностях, при этом наиболее долго вирус сохраняется на стальных и пластиковых изделиях, находившихся в соприкосновении с трупом. Согласно проанализированным данным, вскрытие тел умерших больных с COVID-19 должно проходить только в специально перепрофилированных отделениях с обязательным соблюдением мер, обеспечивающих биологическую безопасность, сотрудники патологоанатомических отделений и бюро судебно-медицинской экспертизы обязаны соблюдать при этом меры индивидуальной и коллективной защиты.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, персистенция, труп, аутопсия, меры защиты

Вклад авторов: А. И. Щеголев — дизайн обзора, поиск и анализ данных литературы, редактирование текста; У. Н. Туманова — поиск и анализ данных литературы, написание текста.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Иванович Щеголев
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117485; patan777@gmail.com

Статья получена: 31.05.2021 **Статья принята к печати:** 14.06.2021 **Опубликована онлайн:** 18.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.029

PERSISTENCE OF SARS-COV-2 IN DECEASED PATIENTS AND SAFE HANDLING OF INFECTED BODIES

Shchegolev AI^{1,2}✉, Tumanova UN¹

¹ Kulakov National Medical Research Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

This article analyzes the literature on SARS-CoV-2 persistence in the corpses of patients infected with COVID-19, possible routes of viral transmission from the bodies and biosafety measures to prevent the spread of the infection. SARS-CoV-2 persists for quite long in the tissues and bodily fluids of decedents with COVID-19 and on various surfaces. The longest viability of the virus is on stainless steel and plastic surfaces that come in contact with the infected body. Autopsies on decedents with COVID-19 must be performed at specially conditioned facilities. Medical and forensic pathologists and other mortuary workers must adhere to stringent biosafety requirements.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, persistence, corpse, autopsy, biosafety

Author contribution: Shchegolev AI designed the study, searched and analyzed the literature and wrote the manuscript; Tumanova UN searched and analyzed the literature and wrote the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander I. Shchegolev
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117485; patan777@gmail.com

Received: 31.05.2021 **Accepted:** 14.06.2021 **Published online:** 18.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.029

Коронавирусная инфекция 2019 г. (2019-nCoV, или COVID-19, от англ. *coronavirus disease* 2019) впервые была официально зарегистрирована в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань, а в августе 2020 г. она распространилась уже в 213 странах [1]. На 1 января и 1 мая 2021 г. COVID-19 была диагностирована соответственно у 84 092 619 и 152 196 159 жителей планеты [2].

В целом около 20% инфицированных SARS-CoV-2 были госпитализированы, примерно 20% из них требовалось проведение интенсивной терапии [3]. Среди тех, кто нуждался в интенсивной терапии, 50–80% погибли, что соответствует 2–4% смертности в странах с хорошими ресурсами системами здравоохранения. При этом показатели летальности в различных странах мира варьировали от 0,1 до 14% в мае и от 1,5 до 14% июля 2020 г. [1]. На 1 мая 2021 г. общее число умерших с COVID-19 достигло 3 192 763 [2]. При этом очевидно, что как медицинскому персоналу, так и родственникам, в той или иной степени приходится контактировать с телами умерших от COVID-19.

Одной из актуальных проблем на сегодняшний день является выяснение особенностей заражения от тел умерших больных с COVID-19.

Пути передачи инфекции от трупа

Инфекционные болезни, в том числе и особо опасные с высокой степенью летальности, возникали на протяжении всей истории человечества. Тела погибших больных всегда считали потенциальными источниками заражения и при обращении с ними соблюдали дополнительные меры противоинфекционной защиты [4].

Так, при непосредственном контакте с пораженной кожей трупа или загрязненными предметами могут передаваться инфекции кожи и слизистых оболочек, вызванные в основном двумя бактериями: *Streptococcus pyogenes* (группа А) и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA). При контактировании с фекалиями или загрязненными ими предметами во время обработки трупов существует риск фекально-оральной передачи микроорганизмов, наиболее грозными из которых являются *Salmonella typhi*, вызывающая брюшной тиф, и *Hepatitis A* как причина вирусного гепатита А.

Воздушный путь попадания в дыхательные пути характерен в частности для *Mycobacterium tuberculosis*, вызывающей туберкулез, вследствие чего сотрудники,

работающие в прозектурах и моргах, относятся к категории высокого риска заражения туберкулезом [5]. Повышенный риск заболевания туберкулезом среди работников, контактирующих с трупами, был документирован, в частности, при помощи туберкулинового кожного теста [6]. Примечательно, что используемый для фиксации образцов тканей формалин является туберкулоцидным.

При контакте с кровью и другими биологическими жидкостями, в том числе при ранениях кожи, возможна передача вирусов гепатита В и С (*Hepacivirus B* и *C*), а также вируса иммунодефицита человека, или ВИЧ (*human immunodeficiency virus*), вызывающего синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) [4]. Жизнеспособный ВИЧ был выделен из фрагментов костей, селезенки, головного и спинного мозга, лимфатических узлов больного СПИД при аутопсии через 6 дней после смерти [7]. Более того, его выявляли в плевральной и перикардиальной жидкостях, а также в крови умерших пациентов после сохранения их тел при температуре 2 °C в течение 16,5 дней после смерти [8]. При прямом контакте с инфицированными жидкостями организма, такими как кровь, слюна, пот, моча, могут передаваться и эндемичные для Африки вирусы Эбола (*Ebolavirus*), Марбург (*Marburgvirus*) и лихорадки Ласса (*Lassa mammarenavirus*), вызывающие вирусную геморрагическую лихорадку.

Вопрос о необходимости проведения аутопсии тела больного, умершего от инфекционного заболевания, всегда решался с учетом конкретного инфекционного агента, возможности безопасного проведения вскрытия и существующей общей политики в отношении проведения вскрытий тел умерших.

Так, в СССР трупы людей, умерших, от особо опасных инфекций, подлежали обязательному патологоанатомическому вскрытию, а органы — гистологическому, бактериологическому (вирусологическому) исследованию [9]. Однако в этой же инструкции отмечено, что трупы умерших от сибирской язвы (все формы), когда диагноз прижизненно подтвержден бактериологически, вскрытию не подвергаются. Современный порядок проведения аутопсий указывает на обязательное проведение патологоанатомического вскрытия в случае смерти от инфекционного заболевания или подозрения на него [10].

SARS-CoV-2 при аутопсии

Вирус SARS-CoV-2 относят ко II группе патогенности, т. е. к возбудителям высококонтагиозных эпидемических заболеваний человека. Соответственно в Российской Федерации во всех случаях смерти больных с COVID-19 необходимо проводить патологоанатомические вскрытия.

Наряду с этим, у ряда исследователей в разных странах существовало мнение о нецелесообразности проведения вскрытий тел больных, инфицированных SARS-CoV-2. Так, польские судебно-медицинские эксперты утверждали, что в случае смерти, вызванной подтвержденной SARS-CoV-2-инфекцией, нет медицинских показаний для проведения посмертного исследования [11]. По мнению итальянских ученых, вскрытия должны быть ограничены высоко мотивированными случаями, но какие именно это случаи и критерии их мотивации, авторы не уточнили [12].

Примечательно, что в Китае, где впервые были зарегистрированы случаи COVID-19, вскрытия тел умерших обычно не проводят, как их не проводили у скончавшихся от этой инфекции и в первое время после

вспышки данного заболевания. Позже вскрытия умерших от COVID-19 больных были разрешены при обязательном соблюдении правил биобезопасности. Однако учреждений, предназначенных для проведения вскрытий и отвечающих таким требованиям, было явно недостаточно, в том числе в Ухане [13].

В Италии, где весной 2020 г. был отмечен значительный рост числа больных с COVID-19, 1 апреля 2020 г. был опубликован официальный документ Министерства здравоохранения Италии [14], рекомендующий избегать проведения вскрытий или посмертных диагностических исследований в случаях смерти больных с COVID-19.

Институт имени Роберта Коха, являющийся одним из центральных научно-исследовательских учреждений Германии, в начальной фазе пандемии тоже рекомендовал не проводить вскрытия тел умерших больных с COVID-19, в результате чего их проводили только в некоторых регионах страны [15]. Однако в Гамбурге, втором по величине городе Германии с населением 1,8 млн, наоборот, с самого начала пандемии было организовано проведение полноценных вскрытий всех умерших больных с COVID-19 [15].

Тем не менее, несмотря на различные точки зрения и существующие положения о проведении вскрытий, одним из основных доводов о важности вскрытия стала необходимость точного определения причины смерти, в частности, смерть наступила от COVID-19 или смерть произошла от других заболеваний при COVID-19 как сопутствующей патологии. К тому же, именно на основании патологоанатомических вскрытий и комплексного морфологического исследования органов и тканей были получены основные сведения о морфогенезе и органопатологии COVID-19.

Так, к настоящему времени четко установлено, что возбудителем COVID-19 является SARS-CoV-2, идентифицированный как седьмой тип коронавируса, способный заражать человека [16]. Данный вирус относится к оболочечным одноцепочечным РНК-вирусам (в частности, к β -типу коронавирусов), характеризуется самым большим из известных геномов и при электронно-микроскопическом исследовании вирус выглядит в виде короны.

Как и другие типы коронавирусов SARS-CoV-2 представлен четырьмя основными структурами: шипиками (S), мембраной (M), оболочкой (E) и нуклеокапсидом (N). Установлено, что белок S участвует в процессах прикрепления и проникновения вируса в клетки-мишени. При SARS-CoV-2 С-концевой домен белка S связывается с рецептором человеческого ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2, hACE2), присутствующим на поверхности клеток, в результате чего происходит слияние вирусной и плазматической мембран, эндоцитоз и соответственно инфицирование клетки [17].

Подобный механизм аналогичен действию SARS-CoV, однако, по данным электронной микроскопии, у SARS-CoV-2 белок S характеризуется в 10–20 раз более высоким сродством связывания с АПФ2 [18], что, видимо, и определяет более высокую трансмиссивность нового вируса.

На основании выявления локализации и экспрессии рецепторов АПФ2 было проведено определение потенциальных путей проникновения и мест поражения SARS-CoV-2 [19]. Белок АПФ2 выявлен в легких (в частности, в альвеолах II типа), сердце (кардиомиоцитах), почках (эпителии проксимальных канальцев), пищеводе,

подвздошной кишке (эпителии), мочевом пузыре (эпителии), а также в лимфатических узлах, тимусе, костном мозге, селезенке, печени и головном мозге [20]. Рецепторы АПФ2 были также идентифицированы в кератиноцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках, остеобластах, остеокластах.

Соответственно, проведение патологоанатомических вскрытий с последующим иммуногистохимическим и молекулярно-биологическим анализом позволило не только выявить основные морфологические изменения органов и тканей и сопоставить их с локализацией SARS-CoV-2 и его рецепторов, но и определить время сохранения РНК вируса в тканях после смерти больного.

О достаточно длительной жизнеспособности коронавирусов в различных органах умерших пациентов сообщалось еще в 2007 г. [21]. На основании сравнительного анализа вирусной нагрузки путем определения соотношения РНК SARS-CoV/GAPDH во внутренних органах семи пациентов, умерших от тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), наиболее высокие значения, равные или превышающие единицу, были выявлены в ткани легких и тонкой кишки, тогда как в образцах ткани сердца, печени, селезенки и почек значения были меньше единицы. При этом промежуток времени от констатации смерти до взятия материала для ПЦР исследования составил 90–180 ч. К сожалению, авторам не удалось выяснить, насколько вирус был вирулентным [21].

SARS-CoV-2 и после смерти присутствовал в различных органах и тканях пациентов, имевших положительные мазки при жизни. Так, в результате проведения ПЦР-мазков носоглотки, взятых через 2–24 ч после смерти у 29 умерших больных с COVID-19, SARS-CoV-2 был выявлен в 10 наблюдениях через 2 и 4 ч, в 9 — через 6 ч и в 7 — через 12 ч [22]. Примечательно, что все мазки, взятые у судебно-медицинских экспертов, проводивших описанное вскрытие, были отрицательными. В другом исследовании провели сравнительный анализ мазков из носоглотки, взятых прижизненно и в телах погибших пациентов с COVID-19 [23]. Диапазон времени взятия прижизненных мазков составил 2–14 дней до смерти. Сравнение прижизненных и посмертных уровней РНК SARS-CoV-2 продемонстрировало ее высокую сохранность в телах умерших пациентов на протяжении 2,7–482,6 ч после смерти. При этом авторы отмечают, что все пациенты имели выраженную иммуносупрессию, а после смерти тела хранили в холодильнике при температуре 4 °C [23].

В одном из исследований при полноценном судебно-медицинском вскрытии четырех пациентов с доказанной при жизни инфекцией SARS-CoV-2, включавшем проведение ПЦР в реальном времени образцов тканей, наличие РНК SARS-CoV-2 было выявлено в ткани легких всех погибших пациентов [24]. Кроме того, у одного из них РНК SARS-CoV-2 была выявлена в ткани головного мозга, а у другого — в тонкой кишке и почке. Примечательно, что продолжительность интервала между смертью и вскрытием составляла 1–17 дней.

Следует также добавить о возможности персистенции SARS-CoV-2 в структурах глаза, в частности, в стекловидном теле и сетчатке [25]. Так, при анализе мазков стекловидного тела РНК SARS-CoV-2 обнаружена у двоих из 10 пациентов с COVID-19. Важным моментом было и то, что при помощи ПЦР РНК SARS-CoV-2 в стекловидном теле выявлял даже после его замораживания при температуре –20 °C и последующего размораживания.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживает описание случая с 60-летним мужчиной, доставленным в больницу после случайного падения дома и умершим на второй день после госпитализации [26]. В качестве первоначальной причины смерти была установлена пневмония SARS-CoV-2, а сопутствующей патологии — мышечная дистрофия Штейнера и ишемическая кардиомиопатия. После смерти труп был помещен в холодильник с температурой 4 °C, где в ожидании разрешения на кремацию находился 35 дней. Перед кремацией судебно-медицинский эксперт взял мазки из полости носа и ротоглотки трупа, и в тот же день методом ПЦР в реальном времени была обнаружена РНК SARS-CoV-2, т. е. через 35 дней после смерти. По мнению авторов, столь длительная персистенция SARS-CoV-2 была обусловлена отсутствием прижизненной противовирусной терапии и хранением трупа при температуре 4 °C [28].

Однако SARS-CoV-2 был выявлен и в тканях с признаками гниения при исследовании трупа через 17 дней после констатации смерти [24]. Наличие SARS-CoV-2 было отмечено и в некротизированных ворсинках плаценты, полученной от роженицы с COVID-19, при иммуногистохимическом исследовании с антителами к SARS-CoV-2 Nucleocapsid [27].

Необходимо констатировать, что коронавирусы могут сохраняться и на небиологических поверхностях (металле, пластике, бумаге, стекле) [28]. Так, эндемичный штамм коронавируса человека (HCoV-) 229E может оставаться заразным на разных типах материалов от 2 ч до 9 дней. При температуре 4 °C персистенцию вирусов TGEV (*transmissible gastroenteritis virus*) и MHV (*mouse hepatitis virus*) регистрировали до 28 дней. При более высокой температуре, в частности, 30 или 40 °C, продолжительность персистенции высокопатогенных MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus), TGEV и MHV уменьшалась. В условиях комнатной температуры HCoV-229E лучше сохранялся при относительной влажности 50% по сравнению с 30%.

В сравнительном исследовании стабильности и времени сохранения вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1 в аэрозолях и на четырех различных поверхностях (пластике, нержавеющей стали, меди и картоне) в аэрозолях SARS-CoV-2 оставался жизнеспособным на протяжении 3 ч эксперимента, однако цитопатогенная доза ТЦД₅₀ (тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя) снизилась с 10^{3.5} до 10^{2.7} на 1 л воздуха. При этом ТЦД₅₀ SARS-CoV-1 снизилась с 10^{4.3} до 10^{3.5} на 1 л воздуха.

В то же время на поверхности пластика и нержавеющей стали SARS-CoV-2 оставался жизнеспособным через 72 ч, хотя ТЦД₅₀ через это время снизилась с 103,7 до 100,6 на 1 мл среды на пластике и через 48 ч на нержавеющей стали. Динамика изменения концентрации SARS-CoV-1 была аналогичной. На картоне и медной поверхности SARS-CoV-2 перестал определяться через 24 и 4 ч соответственно, а SARS-CoV-1 — через 8 ч [29]. В результате исследования дольше всего SARS-CoV-2 сохранялся на стальных поверхностях и пластике, а соответственно на тех материалах, из которых сделаны секционный стол и инструменты для вскрытия, а также мешки для перевозки трупов. Указанный факт несомненно необходимо учитывать при разработке рекомендаций по противоинфекционной защите и методик обработки медицинского инвентаря.

В качестве яркого примера можно добавить, что РНК SARS-CoV-2 была идентифицирована на различных

поверхностях в каютах круизного лайнера «Diamond Princess» в течение 17 дней после того, как его покинули пассажиры с симптомным и бессимптомным течением COVID-19 [30]. Для справки: среди 3711 пассажиров и членов экипажа судна положительные результаты теста на SARS-CoV-2 были зарегистрированы у 712 (19,2%), из них 331 (46,5%) не имели клинических симптомов на момент тестирования.

Необходимо учитывать, что перенос вирусов зависит от конкретного его вида и длительности контакта. Так, при контакте в течение 5 с рук с поверхностью, инфицированной вирусом гриппа А, передается 31,6% вирусной нагрузки, а при инфицировании поверхности вирусом парагриппа — 1,5% [31]. Интересно, что студенты трогают свое лицо руками в среднем 23 раза в час, прикасаясь в основном к коже (56%), а также рту (16%), носу (14%) и глазам (12%) [28].

К сожалению, несмотря на достаточно многочисленные сообщения, на сегодняшний день все еще отсутствуют единые четкие данные о длительности сохранения жизнеспособного вируса в тканях и органах умерших больных с COVID-19, а также не установлены четкие корреляции между результатами определения ПНК SARS-CoV-2 при помощи ПЦР и данными культивирования жизнеспособного вируса. В связи с этим подобные исследования крайне актуальны при изучении не только аутопсийного материала, но и живых пациентов с COVID-19 [32].

На основании представленных данных о том, что органы и ткани умерших больных с COVID-19, а также оборудование, инструменты и предметы, используемые при перевозке, хранении и аутопсии, потенциально содержат вирусные частицы, они могут стать источником заражения сотрудников прозектур и ритуальных услуг. Пути передачи SARS-CoV-2-инфекции являются воздушно-капельный, воздушно-пылевой, контактный, а также фекально-оральный.

Несмотря на то что в литературе имеются лишь единичные публикации о заражении COVID-19 сотрудниками прозектур без четких доказательств их инфицирования во время аутопсии или вне работы [33], факты смерти патологоанатомов и судебно-медицинских экспертов, проводивших вскрытие больных «красной зоны» указывают на высокую вероятность такого заражения.

Соответственно, обращаться с телом умершего больного с COVID-19, а тем более проводить аутопсию необходимо с соблюдением адекватных и эффективных мер безопасности.

Меры защиты от инфицирования SARS-CoV-2

Именно поэтому для обеспечения полной безопасности персонала прозектур до вскрытия необходимо тестирование образцов дыхательных путей всех трупов на SARS-CoV-2 методом ПЦР [34]. Положительный результат на SARS-CoV-2 должен служить не поводом для отказа от проведения вскрытия, а использоваться для адекватной защиты персонала патологоанатомических отделений.

Во всех зарубежных и отечественных рекомендациях по обращению с телом умершего больного с COVID-19 отмечается необходимость использования средств индивидуальной защиты (СИЗ) в виде перчаток и одноразового халата (см. табл.). Дополнительно в ряде стран, в частности, в Китае [35] и Индии [36], рекомендуется надевать водонепроницаемый фартук, защитные очки и маску для лица. При этом отмечается, что

труп больного с COVID-19 как можно скорее должен быть доставлен в морг. В Китае [35] и Индии [36] рекомендуется продезинфицировать кожные покровы тела умершего, а также очистить и закрыть водонепроницаемым пластырем все раневые поверхности. Естественные отверстия тела (рот, нос, анус) также должны быть закрыты. В соответствии с Российскими рекомендациями все отверстия и раны необходимо закрыть ватными шариками или марлей, замоченными в растворе хлорсодержащего дезинфектанта в концентрации 3000–5000 мг/л или в растворе гидроперекиси ацетил 0,5% [43].

В большинстве стран транспортировку тела в морг следует производить в герметичном пластиковом мешке для ограничения контакта с поверхностями и жидкостями организма. В Китае [35] и Индии [36] мешки для трупов дополнительно должны быть обернуты простыней. В рекомендациях индийских специалистов кроме того указано, что трупы больных с положительным результатом на SARS-CoV-2 необходимо хранить в помещении с обособленной вентиляцией отдельно от трупов с отрицательными результатами исследований [36]. В Германии умерший должен быть завернут в двойную простыню, пропитанную дезинфицирующим средством, помещен в двухслойный герметичный мешок с хлором и положен в гроб, который должен быть немедленно закрыт [42].

Несомненно, что при проведении вскрытия тел умерших больных с COVID-19 необходимо соблюдать более строгие меры защиты. Стоит отметить, что наиболее полноценные и эффективные меры, на наш взгляд, предусмотрены в нашей стране. Так, согласно рекомендациям Министерства здравоохранения РФ [44], аутопсию необходимо проводить в специально перепрофилированных для подобных процедур, в том числе межстационарных, патологоанатомических отделениях. В связи с этим в Москве ряд патологоанатомических отделений были перепрофилированы с целью соблюдения требований биологической безопасности [45].

В РФ помещения для проведения вскрытий должны находиться под отрицательным атмосферным давлением в окружающих зонах, иметь 6 циклов воздухообмена в час для уже существующих конструкций и 12 циклов воздухообмена в час для отремонтированных или новых конструкций, при этом воздух должен поступать непосредственно наружу или проходить через НЕРА-фильтр [43]. В Великобритании [39] и Индии [36] вскрытие необходимо проводить в помещении с отрицательным давлением с полной вентиляцией или сквозным движением воздушных масс на рабочих местах. В Германии помещения для проведения вскрытия должны находиться в отдельном здании с автономными системами канализации и вентиляции и с наличием душевых кабин для персонала [42].

В соответствии с имеющимися рекомендациями, число лиц в помещении во время аутопсии должно быть максимально ограничено персоналом, непосредственно участвующим в проведении вскрытия и получении биологического материала. В РФ это врач-патологоанатом, лаборант и санитар. Как патологоанатомическое, так и судебно-медицинское вскрытие больного с COVID-19 необходимо проводить в присутствии специалиста организации, уполномоченной осуществлять федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор [43]. Однако данное требование не распространяется на патологоанатомические отделения Москвы, специализированные для работы с COVID-19 и получившие

Таблица. Средства индивидуальной защиты, рекомендуемые при обращении с телом умершего больного с COVID-19 и при его вскрытии

Источник	Стандартные СИЗ	Водонепроницаемый фартук	Маска для лица	Защитные очки	Двойные перчатки
Тело умершего без вскрытия					
Китай [35]	+	+	+	+	
Индия [36]	+	+	+	+	
США [37]	+		+	+	
Нидерланды [38]	+		–	–	
Великобритания [39]	+		+	+	
Европа [40]	+				
ВОЗ [41]	+	+	+	+	
Вскрытие тела умершего					
Китай [35]	+	+	+		+
Индия [36]	+	+	+	+	+
США [37]	+	+	+	+	+
Великобритания [39]	+	+	+	+	+
Германия [42]	+	+	+	+	+
Европа [40]	+		+	+	+
ВОЗ [41]	+	+	+	+	+

Примечание: стандартные СИЗ включают в себя использование перчаток, одноразового халата и соблюдение гигиены рук.

допуск Роспотребнадзора [45]. Само вскрытие проводит или контролирует заведующий подразделением или наиболее опытный прозектор [43]. В то же время, по мнению некоторых иностранных исследователей [46], как ни парадоксально, к проведению вскрытия могут быть привлечены стажеры, включая беременных, имеющие опыт работы с инфицированным материалом.

Согласно всем иностранным рекомендациям, при проведении вскрытия необходимо использовать стандартный набор СИЗ, включающий в себя перчатки, одноразовый халат, и соблюдать гигиену рук (см. табл.). В дополнение к вышеобозначенным СИЗ в Германии [42] и Индии [36] рекомендуется использовать двойные перчатки. В США [37], Великобритании [39] и Германии [42] для проведения вскрытия рекомендовано одевать защитный комплект для всего тела с вентилируемыми респираторами.

Согласно Российским методическим рекомендациям [43], во всех случаях исследования трупов с COVID-19 необходимо использовать:

- двойные хирургические перчатки со слоем непрорезаемых синтетических сетчатых перчаток;
- одноразовое водонепроницаемое или герметичное облачение с длинными рукавами (халат, куртка, брюки);
- водонепроницаемый фартук;
- пластиковую маску (щиток) или очки для защиты лица и глаз от брызг;
- одноразовый респиратор с высоким уровнем защиты органов дыхания;
- одноразовые бахилы, хирургическую шапочку.

В то же время рекомендовано применение противочумного костюма I или II типа, СИЗ типа «Кварц» и подобных, допускается также противочумный костюм II типа с дополнительным надеванием двойных хирургических перчаток и непрорезаемых синтетических перчаток между ними, защитных очков, клеенчатого или полиэтиленового фартука, нарукавников из подобного материала и респиратора класса FFP3. Отмечена необходимость использования специальной защитной одежды врача-инфекциониста «Кварц-1М» [44].

В большинстве рекомендаций указано, что следует избегать или свести к минимуму процедуры,

сопровождающиеся разбрызгиванием воды (например, высокий напор воды или сбрасывание органов в воду) и образованием аэрозолей. В отечественных рекомендациях указано, что вскрытие следует проводить без применения воды при отключенном стоке, так называемое «сухое вскрытие» [43–45]. Не рекомендуется применять и качающуюся костную пилу, либо использовать ее с вакуумным кожухом для сбора костной стружки, а взятие образцов биологического материала на исследование необходимо осуществлять стерильным секционным набором.

В Индии [36], Великобритании [39] и Германии [42] аутопсию предпочтительно проводить путем последовательного вскрытия по одной полости тела. В то же время некоторые исследователи [46] рекомендуют применение поэтапной техники вскрытия, включающей в себя первоначальное взятие только образцов для определения SARS-CoV-2, а затем после получения результатов диагностических тестов при необходимости проведение более полного вскрытия.

В этой связи следует добавить, что ряд иностранных исследователей рекомендуют проводить минимально инвазивное вскрытие, т. е. взятие образцов тканей и жидкостей на основании данных прижизненных и/или посмертных лучевых исследований [13, 47]. Действительно, посмертные КТ-исследования все шире используют для выявления прижизненных поражений в сочетании с гистологическим исследованием легких взрослых пациентов [48, 49]. При этом у погибших новорожденных целесообразно проводить посмертную МРТ, позволяющую с большей эффективностью верифицировать врожденную пневмонию [50, 51]. В отношении умерших больных с COVID-19 обращает на себя внимание и использование посмертного УЗИ для прицельного взятия образцов тканей, обеспечивающего минимизацию инфекционного риска заражения во время вскрытия [52]. Однако для исключения артефактов посмертное УЗИ следует проводить не ранее 1–2 ч, после того как мертвое тело было извлечено из холодильной камеры и достигло комнатной температуры [52].

Заключительным этапом любого вскрытия является необходимость обязательной финальной обработки и дезинфекции кожных покровов трупа, инструментов

и помещения. Для обработки кожных покровов рекомендуется использовать 1 или 5,25%-й раствор гипохлорита натрия. Все поверхности, которые соприкасались с трупом, должны быть очищены от видимых загрязнений и продезинфицированы также гипохлоритом натрия или 70%-м спиртом. При этом в Германии запрещено сливать использованную воду в общую канализацию [42], а циркулирующий воздух в помещении для вскрытия должен быть стерилизован ультрафиолетовым светом в течение 1 ч и профильтрован в течение 2 ч [42].

Следует также добавить, что, согласно отечественным рекомендациям [43–45], после завершения вскрытия не рекомендуется проводить бальзамирование тел умерших, а следует помещать их в пластиковые пакеты, дезинфицировать снаружи и размещать в помещениях для хранения до дня похорон. При выдаче тела родственникам следует поместить его во второй пластиковый пакет, продезинфицировать снаружи и выдать в закрытом гробу, который подлежит захоронению или кремации. В Китае [35] и Индии [36] тоже запрещено бальзамирование тел умерших с COVID-19. Практически во всех странах не рекомендован физический

контакт с телом умершего, за исключением Нидерландов [38], где это разрешено с последующей надлежащей обработкой рук. В Китае тела умерших с COVID-19 рекомендуется кремировать [35], в Германии разрешается захоронение на глубину не менее 2 м [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для SARS-CoV-2 характерен достаточно длительный период персистенции в тканях и жидкостях тел умерших больных с COVID-19, а также на различных небиологических поверхностях, соприкасавшихся с трупом, из которых наиболее долго — на изготовленных из стали и пластика. Соответственно, вскрытие тел умерших больных с COVID-19 должно проходить только в специально перепрофилированных отделениях с обязательным соблюдением мер, обеспечивающих биологическую безопасность в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов. Сотрудники патологоанатомических отделений и бюро судебно-медицинской экспертизы обязаны соблюдать меры индивидуальной и коллективной защиты.

Литература

- Matta S, Chopra KK, Arora VK. Morbidity and mortality trends of Covid 19 in top 10 countries. *Indian J Tuberc.* 2020; 67 (4S): S167–S172.
- Публичный дашборд Yandex DataLens. Available from: https://datalens.yandex.ru/7o7is1q6ikh23?tab=0Ze&utm_source=cbmain&state=7e29b15887.
- Sekhawat V, Green A, Mahadeva U. COVID-19 autopsies: conclusions from international studies. *Diagn Histopathol (Oxf).* 2021; 27 (3): 103–7.
- Aubert AC, Lampuranés XS. Servicios funerarios: exposición laboral a agentes biológicos. *Notas Técnicas de Prevención.* 2010; 858: 1–6.
- Sterling TR, Pope DS, Bishai WR, Harrington S, Gershon RR, Chaisson RE. Transmission of mycobacterium tuberculosis from a cadaver to an embalmer. *N Engl J Med.* 2000; 342 (4): 246–8.
- Gershon RR, Vlahov D, Escamilla-Cejudo JA, Badawi M, McDiarmid M, Karkashian C. et al. Tuberculosis risk in funeral home employees. *J Occup Environ Med.* 1998; 40 (5): 497–503.
- Nyberg M, Suni J, Haltia M. Isolation of human immunodeficiency virus infection in health care workers. *Arch Intern Med.* 1990; 153: 1451–8.
- Douceron H, Deforges L, Gherardi R, Sobel A, Chariot P. Long-lasting postmortem viability of human immunodeficiency virus: A potential risk in forensic medicine practice. *Forensic Sci Int.* 1993; 60 (1–2): 61–6.
- Инструкции о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями чумы, холеры, сапа, мелиоидоза, натуральной оспы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза, Министерство здравоохранения СССР. Алма-Ата, 1975.
- Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ.
- Teresiński G, Jurek T. Recommendations of the polish society of forensic medicine and criminology and national consultant for forensic medicine with regard to performing forensic post-mortem examinations in case of confirmed COVID-19 disease and suspected SARS CoV-2 infections. *Arch Med Sadowej Kryminol.* 2019; 69 (4): 147–57.
- Sapino A, Facchetti F, Bonoldi E, Gianatti A, Barbareschi M, Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia — SIAPEC. The autopsy debate during the COVID-19 emergency: the Italian experience. *Virchows Arch.* 2020; 476 (6): 821–3.
- Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* 2020; 33 (6): 1007–14.
- Moretti M, Malhotra A, Visonà SD, Finley SJ, Osculati AM, Javan GT. The roles of medical examiners in the COVID-19 era: a comparison between the United States and Italy. *Forensic Sci Med Pathol.* 2021; 17 (2): 262–70.
- Sperhake JP. Autopsies of COVID-19 deceased? Absolutely! *Leg Med (Tokyo).* 2020; 47: 101769.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382 (8): 727–33.
- He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Med Virol.* 2020; 92 (7): 719–25.
- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367 (6483): 1260–3.
- 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; 12 (1): 8.
- Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020; 14 (2): 185–92.
- Tang JW, To KF, Lo AW, Sung JJ, Ng HK, Chan PK. Quantitative temporal-spatial distribution of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) in post-mortem tissues. *J Med Virol.* 2007; 79 (9): 1245–53.
- Aquila I, Ricci P, Bonetta CF, Sacco MA, Longhini F, Torti C, et al. Analysis of the persistence time of the SARS-CoV-2 virus in the cadaver and the risk of passing infection to autopsy staff. *Med Leg J.* 2021; 89 (1): 40–53.
- Heinrich F, Meißner K, Langenwalder F, Püschel K, Nörz D, Hoffmann A, et al. Postmortem stability of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal mucosa. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27 (1): 329–31.
- Plenzig S, Bojkova D, Held H, Berger A, Holz F, Cinatl J, et al. Infectivity of deceased COVID-19 patients. *Int J Legal Med.* 2021 Mar 5; 1–6.
- Bogdanović M, Skadrić I, Atanasijević T, Stojković O, Popović V, Savić S, et al. Case Report: Post-mortem histopathological and molecular analyses of the very first documented COVID-19-related death in Europe. *Front Med.* 2021; 8: 612758.
- Beltempo P, Curti SM, Maserati R, Gherardi M, Castelli M.


- Persistence of SARS-CoV-2 RNA in post-mortem swab 35 days after death: A case report. *Forensic Sci Int.* 2021; 319: 110653.
27. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingjin K, Chen H, et al. Vertical transmission of SARS-CoV-2 in second trimester associated with severe neonatal pathology. *Viruses.* 2021; 13: 447.
 28. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020; 104 (3): 246–51.
 29. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Eng J Med.* 2020; 382 (16): 1564–7.
 30. Leah FM, Plucinski MM, Marston BJ, Kurbatova EV, Knust B, Murray EL, et al. Public health responses to COVID-19 outbreaks on cruise ships — worldwide, February–March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020; 69 (12): 347–52.
 31. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M. Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol.* 1991; 29 (10): 2115–9.
 32. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2: e13–22.
 33. Davis GG, Williamson AK. Risk of Coronavirus Disease 2019 transmission during autopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 2020; 144 (12): 1445a–1445.
 34. Nakamura M, Tojo M, Takaso M, Hitosugi M. A regional approach for infection prevention in death investigations during the COVID-19 era. *Leg Med (Tokyo).* 2021; 48: 101829.
 35. Centre for Health Protection. Precautions for Handling and Disposal of Dead Bodies, Hong Kong, China, 2020. Available from: https://www.chp.gov.hk/files/pdf/grp-guideline-hp-ic-precautions_for_handling_and_disposal_of_dead_bodies_en.pdf.
 36. Government of India Ministry of Health & Family Welfare Directorate General of Health Services. COVID-19: Guidelines on dead body management, India, 2020. Available from: https://www.mohfw.gov.in/pdf/1584423700568_COVID19GuidelinesonDeadbodymanagement.pdf.
 37. Centers for Disease Control and Prevention. Collection and Submission of Postmortem Specimens from Deceased Persons with Known or Suspected COVID-19 (Postmortem Guidance). Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-postmortem-specimens.html>.
 38. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. COVID-19 richtlijn (guideline). Available from: <https://ici.rivm.nl/richtlijnen/covid-19>.
 39. Health and Safety Executive. Managing infection risks when handling the deceased. Guidance for the mortuary, post-mortem room and funeral premises, and during exhumation. Available from: <https://www.hse.gov.uk/pUbns/priced/hsg283.pdf>.
 40. European Centre for Disease Prevention and Control. Considerations related to the safe handling of bodies of deceased persons with suspected or confirmed COVID-19, Europe, 2020. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/considerations-related-safe-handling-bodies-deceased-persons-suspected-or>.
 41. WHO Guidelines. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care — WHO Guidelines. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112656/9789241507134_eng.pdf?sequence=1.
 42. Ketten D, Okdemir E, Ketten A. Precautions in postmortem examinations in Covid-19 — Related deaths: Recommendations from Germany. *J Forensic Leg Med.* 2020; 73: 102000.
 43. Франк Г. А., Ковалев А. В., Грибунов Ю. П., Заславский Г. И., Кильдюшов Е. М., Ягмуров О. Д. и др. Исследование умерших с подозрением на коронавирусную инфекцию (COVID-19). В сборнике: Временные методические рекомендации. Версия 22 (23.07.2020). М., 2020; 428 с.
 44. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 10 (08.02.2021). М., 2021; 262 с.
 45. Зайратьянц О. В., Каниболоцкий А. А., Михалева Л. М., Мишнев О. Д., Савелов Н. С., Авдальян А. М. и др. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Организация работы патологоанатомической службы. В сборнике: Временные методические рекомендации. Версия 3 (15.11.2020). М., 2020; 36 с.
 46. Hanley B, Lucas SB, Youd E, Swift B, Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol.* 2020; 73: 239–42.
 47. Monteiro RAA, Duarte-Neto AN, Silva LFFD, Oliveira EP, Filho JT, Santos GABD, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsies: A protocol for the study of pulmonary and systemic involvement of COVID-19. *Clinics (Sao Paulo).* 2020; 75: e1972.
 48. Roberts IS, Benamore RE, Benbow EW, Lee SH, Harris JN, Jackson A, et al. Post-mortem imaging as an alternative to autopsy in the diagnosis of adult deaths: a validation study. *Lancet.* 2012; 379 (9811): 136–42.
 49. Kniep I, Lutter M, Ron A, Edler C, Püschel K, Iltich H, et al. Postmortem imaging of the lung in cases of COVID-19 deaths. *Radiologe.* 2020; 60 (10): 927–33.
 50. Туманова У. Н., Ляпин В. М., Быченко В. Г., Щеголев А. И., Сухих Г. Т. Посмертная МРТ для диагностики врожденной пневмонии. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2016; 4: 48–55.
 51. Туманова У. Н., Щеголев А. И. Возможности и ограничения виртуальной аутопсии в неонатологии. *REJR.* 2017; 7 (1): 20–33.
 52. Kanchan T, Shrestha R, Krishan K. Post-mortem ultrasonography: a safer alternative to autopsies in COVID-19 deaths. *J Ultrasound.* 2020 Oct 31; 1–2.

References

1. Matta S, Chopra KK, Arora VK. Morbidity and mortality trends of Covid 19 in top 10 countries. *Indian J Tuberc.* 2020; 67 (4S): S167–S172.
2. Publicnyj dashboard Yandex DataLens. Available from: https://datalens.yandex/7o7is1q6ikh23?tab=0Ze&utm_source=cbmain&state=7e29b15887.
3. Sekhawat V, Green A, Mahadeva U. COVID-19 autopsies: conclusions from international studies. *Diagn Histopathol (Oxf).* 2021; 27 (3): 103–7.
4. Aubert AC, Lampuranés XS. Servicios funerarios: exposición laboral a agentes biológicos. *Notas Técnicas de Prevención.* 2010; 858: 1–6.
5. Sterling TR, Pope DS, Bishai WR, Harrington S, Gershon RR, Chaisson RE. Transmission of mycobacterium tuberculosis from a cadaver to an embalmer. *N Engl J Med.* 2000; 342 (4): 246–8.
6. Gershon RR, Vlahov D, Escamilla-Cejudo JA, Badawi M, McDiarmid M, Karkashian C. et al. Tuberculosis risk in funeral home employees. *J Occup Environ Med.* 1998; 40 (5): 497–503.
7. Nyberg M, Suni J, Haltia M. Isolation of human immunodeficiency virus infection in health care workers. *Arch Intern Med.* 1990; 153: 1451–8.
8. Douceron H, Deforges L, Gherardi R, Sobel A, Chariot P. Long-lasting postmortem viability of human immunodeficiency virus: A potential risk in forensic medicine practice. *Forensic Sci Int.* 1993; 60 (1–2): 61–6.
9. Инструкции о противоэпидемическом режиме работы с материалом, заразным или подозрительным на заразность возбудителями чумы, холеры, сары, мелиоидоза, натуральной оспы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза, Министерство здравоохранения СССР. Алма-Ата, 1975.
10. Федеральный закон "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации" от 21.11.2011 N 323-FZ.
11. Teresiński G, Jurek T. Recommendations of the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology and National Consultant for Forensic Medicine with regard to performing forensic post-mortem examinations in case of confirmed COVID-19 disease and suspected SARS CoV-2 infections. *Arch Med Sadowej Kryminol.* 2019; 69 (4): 147–57.
12. Sapino A, Facchetti F, Bonoldi E, Gianatti A, Barbareschi M,

- Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia — SIAPEC. The autopsy debate during the COVID-19 emergency: the Italian experience. *Virchows Arch.* 2020; 476 (6): 821–3.
13. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* 2020; 33 (6): 1007–14.
 14. Moretti M, Malhotra A, Visonà SD, Finley SJ, Osculati AMM, Javan GT. The roles of medical examiners in the COVID-19 era: a comparison between the United States and Italy. *Forensic Sci Med Pathol.* 2021; 17 (2): 262–70.
 15. Sperhake JP. Autopsies of COVID-19 deceased? Absolutely! *Leg Med (Tokyo).* 2020; 47: 101769.
 16. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382 (8): 727–33.
 17. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Med Virol.* 2020; 92 (7): 719–25.
 18. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367 (6483): 1260–3.
 19. 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; 12 (1): 8.
 20. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020; 14 (2): 185–92.
 21. Tang JW, To KF, Lo AW, Sung JJ, Ng HK, Chan PK. Quantitative temporal-spatial distribution of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARSCoV) in post-mortem tissues. *J Med Virol.* 2007; 79 (9): 1245–53.
 22. Aquila I, Ricci P, Bonetta CF, Sacco MA, Longhini F, Torti C, et al. Analysis of the persistence time of the SARS-CoV-2 virus in the cadaver and the risk of passing infection to autopsy staff. *Med Leg J.* 2021; 89 (1): 40–53.
 23. Heinrich F, Meißner K, Langenwalder F, Püschel K, Nörz D, Hoffmann A, et al. Postmortem stability of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal mucosa. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27 (1): 329–31.
 24. Plenzig S, Bojkova D, Held H, Berger A, Holz F, Cinatl J, et al. Infectivity of deceased COVID-19 patients. *Int J Legal Med.* 2021 Mar 5; 1–6.
 25. Bogdanović M, Skadić I, Atanasijević T, Stojković O, Popović V, Savić S, et al. Case Report: Post-mortem histopathological and molecular analyses of the very first documented COVID-19-related death in Europe. *Front Med.* 2021; 8: 612758.
 26. Beltempo P, Curti SM, Maserati R, Gherardi M, Castelli M. Persistence of SARS-CoV-2 RNA in post-mortem swab 35 days after death: A case report. *Forensic Sci Int.* 2021; 319: 110653.
 27. Sukhikh G, Petrova U, Prihodko A, Starodubtseva N, Chingina K, Chen H, et al. Vertical transmission of SARS-CoV-2 in second trimester associated with severe neonatal pathology. *Viruses.* 2021; 13: 447.
 28. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020; 104 (3): 246–51.
 29. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Eng J Med.* 2020; 382 (16): 1564–7.
 30. Leah FM, Plucinski MM, Marston BJ, Kurbatova EV, Knust B, Murray EL, et al. Public health responses to COVID-19 outbreaks on cruise ships — worldwide, February–March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020; 69 (12): 347–52.
 31. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M. Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol.* 1991; 29 (10): 2115–9.
 32. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2: e13–22.
 33. Davis GG, Williamson AK. Risk of Coronavirus Disease 2019 transmission during autopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 2020; 144 (12): 1445a–1445.
 34. Nakamura M, Tojo M, Takaso M, Hitosugi M. A regional approach for infection prevention in death investigations during the COVID-19 era. *Leg Med (Tokyo).* 2021; 48: 101829.
 35. Centre for Health Protection. Precautions for Handling and Disposal of Dead Bodies, Hong Kong, China, 2020. Available from: https://www.chp.gov.hk/files/pdf/grp-guideline-hp-ic-precautions_for_handling_and_disposal_of_dead_bodies_en.pdf.
 36. Government of India Ministry of Health & Family Welfare Directorate General of Health Services. COVID-19: Guidelines on dead body management, India, 2020. Available from: https://www.mohfw.gov.in/pdf/1584423700568_COVID19GuidelinesonDeadbodymanagement.pdf.
 37. Centers for Disease Control and Prevention. Collection and Submission of Postmortem Specimens from Deceased Persons with Known or Suspected COVID-19 (Postmortem Guidance). Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-postmortem-specimens.html>.
 38. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. COVID-19 richtlijn (guideline). Available from: <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/covid-19>.
 39. Health and Safety Executive. Managing infection risks when handling the deceased. Guidance for the mortuary, post-mortem room and funeral premises, and during exhumation. Available from: <https://www.hse.gov.uk/pubns/priced/hsg283.pdf>.
 40. European Centre for Disease Prevention and Control. Considerations related to the safe handling of bodies of deceased persons with suspected or confirmed COVID-19, Europe, 2020. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/considerations-related-safe-handling-bodies-deceased-persons-suspected-or>.
 41. WHO Guidelines. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care — WHO Guidelines. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112656/9789241507134_eng.pdf?sequence=1.
 42. Keten D, Okdemir E, Keten A. Precautions in postmortem examinations in Covid-19 — Related deaths: Recommendations from Germany. *J Forensic Leg Med.* 2020; 73: 102000.
 43. Frank GA, Kovalev AV, Gribunov YuP, Zaslavskij GI, Kildjushov EM, Jagmurov OD, i dr. Issledovanie umershih s podozreniem na koronavirusnuju infekciju (COVID-19). V sbornike: Vremennye metodicheskie rekomendacii. Versija 22 (23.07.2020). M., 2020; 428 s. Russian.
 44. Vremennye metodicheskie rekomendacii: profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19). Versija 10 (08.02.2021). M., 2021; 262 s. Russian.
 45. Zajratyanc OV, Kanibolockij AA, Mihaleva LM, Mishnev OD, Savelov NS, Avdalyan AM, i dr. Novaja koronavirusnaja infekcija (COVID-19). Organizacija raboty patologoanatomicheskoy sluzhby. V sbornike: Vremennye metodicheskie rekomendacii. Versija 3 (15.11.2020). M., 2020; 36 s. Russian.
 46. Hanley B, Lucas SB, Youd E, Swift B, Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol.* 2020; 73: 239–42.
 47. Monteiro RAA, Duarte-Neto AN, Silva LFFD, Oliveira EP, Filho JT, Santos GABD, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsies: A protocol for the study of pulmonary and systemic involvement of COVID-19. *Clinics (Sao Paulo).* 2020; 75: e1972.
 48. Roberts IS, Benamore RE, Benbow EW, Lee SH, Harris JN, Jackson A, et al. Post-mortem imaging as an alternative to autopsy in the diagnosis of adult deaths: a validation study. *Lancet.* 2012; 379 (9811): 136–42.
 49. Kniep I, Lutter M, Ron A, Edler C, Püschel K, Ittrich H, et al. Postmortem imaging of the lung in cases of COVID-19 deaths. *Radiologe.* 2020; 60 (10): 927–33.
 50. Tumanova UN, Lyapin VM, Bychenko VG, Shchegolev AI, Sukhikh GT. Posmertnaja MRT dlja diagnostiki vrozhdennnoj pnevmonii. Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 2016; 4: 48–55. Russian.
 51. Tumanova UN, Shchegolev AI. Vozmozhnosti i ogranichenija virtual'noj autopsii v neonatologii. REJR. 2017; 7 (1): 20–33. Russian.
 52. Kanchan T, Shrestha R, Krishan K. Post-mortem ultrasonography: a safer alternative to autopsies in COVID-19 deaths. *J Ultrasound.* 2020 Oct 31; 1–2.

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ ПЛУВОВИННОЙ КРОВИ И АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ОТ МАТЕРЕЙ С COVID-19

Н. А. Ломова , В. В. Чаговец, Е. Л. Долгополова, А. В. Новоселова, У. Л. Петрова, Р. Г. Шмаков, В. Е. Франкевич

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


Новорожденные от матерей с COVID-19 подвержены риску заражения, могут иметь высокий риск осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленные последствия для здоровья. Цель исследования — определить аминокислотный профиль пуповинной плазмы и амниотической жидкости пациентов с COVID-19 для анализа связи влияния перенесенного антенатально COVID-19 на изменения в метаболоме «внутриутробного пациента». Для оценки уровня 31 аминокислоты в образцах амниотической жидкости и пуповинной плазмы беременных с COVID-19, полученных при родоразрешении, применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрической детекцией. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную — 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости статистически значимо ($p < 0,05$) различались между исследуемыми группами. Разработаны модели логистической регрессии (чувствительность 0,84; специфичность — 1), позволяющие определять, что анализируемая амниотическая жидкость взята от пациенток, перенесших COVID-19. В плазме пуповинной крови значимые различия обнаружены для четырех аминокислот. Построенные модели позволяют выявлять принадлежность исследуемой пуповинной плазмы пациентам группы контроля или COVID-19 (чувствительность и специфичность — 1). Одновременно в двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболом плода, были выявлены и статистически значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты. Воздействие вируса на организм приводит к выраженным изменениям в метаболоме амниотической жидкости и пуповинной плазмы плода, что может привести к нарушению программирования производства белковых молекул, но не проявляется при рождении.

Ключевые слова: аминокислотный анализ, плазма пуповинной крови, амниотическая жидкость, COVID-19, маркеры состояния новорожденного

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант рег. № 20-04-60093.

Вклад авторов: Н. А. Ломова — анализ клинических данных, систематический анализ, написание рукописи; В. В. Чаговец — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; Е. Л. Долгополова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны», статистический анализ результатов; А. В. Новоселова — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, обработка масс-спектрометрических данных; У. Л. Петрова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны»; Р. Г. Шмаков — анализ клинических данных в условиях «красной зоны», систематический анализ, редактирование рукописи; В. Е. Франкевич — подготовка исследования, систематический анализ, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 13 от 10 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Международной конференции по гармонизации (ICF), Стандартов надлежащей клинической практики (GCP), ФЗ № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Наталья Анатольевна Ломова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; natasha-lomova@yandex.ru

Статья получена: 24.05.2021 **Статья принята к печати:** 18.06.2021 **Опубликована онлайн:** 29.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.032

CHANGES IN AMINO ACID PROFILE OF CORD BLOOD PLASMA AND AMNIOTIC FLUID OF MOTHERS WITH COVID-19

Lomova NA , Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

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


Neonates born to mothers with COVID-19 are at risk for infection, they may have high risk of complications during the neonatal period, and long-term health consequences. The study was aimed to define the amino acid profile of blood plasma and amniotic fluid in patients with COVID-19 in order to assess the relationship between the COVID-19 infection during the antenatal period, and metabolomic alterations in the “intrauterine” patient. The levels of 31 amino acids in the samples of amniotic fluid and cord blood plasma of pregnant women with COVID-19, obtained during delivery, were assessed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. The index group included 29 patients with confirmed diagnosis of COVID-19, and the control group included 17 healthy women with uncomplicated pregnancies. There were significant ($p < 0.05$) differences in the concentrations of eight amino acids between the studied groups. Logistic regression models were developed (sensitivity 0.84; specificity 1) making it possible to define, whether the assessed amniotic fluid was obtained from COVID-19 patients. Significant differences in the concentrations of four amino acids were observed in the umbilical cord blood. The models developed made it possible to define whether the studied cord blood plasma belonged to controls or to COVID-19 patients (sensitivity and specificity 1). Three amino acids were detected, and their levels were significantly different in COVID-19 patients simultaneously in two points (amniotic fluid and cord blood plasma), depicting the fetal metabolome in a holistic manner. The impact of the virus on those infected results in pronounced metabolomic alterations in the amniotic fluid and the fetal cord blood plasma, which may lead to impaired programming of protein production, but never show up at birth.

Keywords: amino acid analysis, cord blood plasma, amniotic fluid, COVID-19, markers of neonatal condition

Funding: the study was supported by RFBR grant №. 20-04-60093.

Author contribution: Lomova NA — analysis of clinical data, systematic analysis, manuscript writing; Chagovets VV — mass spectrometry-based metabolome analysis, statistical analysis of the results, manuscript editing; Dolgoplova EL — collection and preparation of biological matrix samples in the red zone, statistical analysis of the results; Novoselova AV — mass spectrometry-based metabolome analysis, mass spectrometry data processing; Petrova UL — collection and preparation of biological matrix samples in the red zone; Shmakov RG — analysis of clinical data in the red zone, systematic analysis, manuscript editing; Frankevich VE — preparation of the study, systematic analysis, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov (protocol № 13 dated December 10, 2020); the study met the requirements of the Declaration of Helsinki, International Conference on Harmonization (ICF), Good Clinical Practice (GCP), and Federal Law No. 323-FZ “On the Basics of Protecting Citizens’ Health in the Russian Federation” of November 21, 2011; the informed consent was submitted by all patients.

 **Correspondence should be addressed:** Natalia A. Lomova
Oparina, 4, Moscow, 117997; natasha-lomova@yandex.ru

Received: 24.05.2021 **Accepted:** 18.06.2021 **Published online:** 29.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.032

Вспышка тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, началась в Ухане (Китай) в 2019 г. и быстро привела к всемирной пандемии, которая поставила системы здравоохранения стран перед необходимостью оказания интенсивной терапии огромному числу пациентов. Из-за быстрого распространения число заболеваний во всем мире увеличивается каждый день. Только в России на сегодняшний день зарегистрировано более 4 700 000 подтвержденных случаев заражения COVID-19. Беременные женщины представляют собой уязвимую группу населения, восприимчивую к инфекции COVID-19 из-за физиологических изменений иммунологических показателей и показателей кровообращения. Дети от матерей, инфицированных COVID-19, подвержены риску заражения, а также высокому риску осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленных последствий для здоровья. Непосредственно для COVID-19 такие последствия еще не изучены, однако исследования, выполненные для вируса гриппа, позволяют предположить их потенциальную возможность [1, 2]. До сих пор мало известно о перинатальной и неонатальной инфекции COVID-19, а текущая информация основана преимущественно на отчетах о единичных случаях. Одно из первых и самых крупных исследований касается 33 новорожденных от матерей с подтвержденным диагнозом COVID-19 [3]. Было постулировано несколько путей передачи вируса, включая послеродовую передачу (горизонтальную), транс-плацентарную передачу, а также через околоплодные воды и грудное молоко [4–12]. Первое исследование, описывающее клинические характеристики и изучающее возможность вертикальной передачи SARS-CoV-2 у девяти беременных с лабораторно подтвержденным COVID-19, продемонстрировало отсутствие доказательств вертикальной передачи [11, 13]. Однако в последнее время в литературе появляются сообщения о единичных случаях вертикальной передачи вируса, а также о тяжелых заболеваниях в антенатальном периоде у беременных [14, 15]. Так, продемонстрирована трансплацентарная передача вируса, подтвержденная комплексными вирусологическими тестами на плаценте, а также симптомами и клиническими проявлениями у новорожденных [16].

По фундаментальным причинам метаболом является более чувствительным и динамичным индикатором биохимического статуса клетки и организма, чем протеом или транскриптом [17]. Метаболомный анализ образцов пациентов с инфекцией COVID-19 дает возможность понять биохимические изменения, связанные с плохо изученными процессами, поскольку он показывает воздействие вируса на хозяина, а не просто присутствие инфекционного агента. Метаболомные исследования могут предоставить набор маркеров, потенциально имеющих важное значение для подтверждения инфекции SARS-CoV-2, а также для определения тяжести заболевания и возможного исхода. Недавно показано, что 204 метаболита в плазме крови пациентов с COVID-19 коррелируют с тяжестью заболевания [18]. Аминокислоты, являющиеся частью метаболома, незаменимы во всех процессах жизнедеятельности человека. Биологическая роль около трехсот аминокислот в нашем организме неопределима. Без необходимого количества аминокислот организм не может эффективно развиваться. Именно поэтому существуют оптимальные уровни аминокислот в организме, обеспечивающие сбалансированные обменные процессы. Отклонение концентрации

аминокислот от референсных значений может указывать на развитие конкретного заболевания. Так, концентрации аминокислот изменяются при инфицировании вирусом песчаной мухи [19], при пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1 [20], при хронической обструктивной болезни легких [21]. Ряд неонатальных патологий выявляют путем анализа аминокислот в сухой капле крови [22]. Исследования низкомолекулярных промежуточных продуктов метаболизма в биологических системах приобретают все большее значение в последние годы, поскольку позволяют лучше понять взаимодействие и регуляцию метаболических путей человека. Связанные с заболеваниями изменения метаболических профилей физиологических жидкостей человеческого организма исследуют для выяснения патофизиологии сложных заболеваний. Например, метаболомный анализ показал, что изменение метаболизма аминокислот коррелирует с изменением гомеостаза кислорода у пациентов с COVID-19 [23]. Еще в одном исследовании аминокислотных профилей у взрослых и детей с COVID-19 выявлены изменения, которые могут быть связаны с эндотелиальной дисфункцией и нарушением регуляции Т-лимфоцитов [24]. Различные метаболические процессы могут быть охарактеризованы путем измерения концентраций аминокислот [25].

Таким образом, целью исследования было определить влияние COVID-19 на аминокислотный состав амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови для разработки диагностической панели и влияние возможных последствий на состояние новорожденного, к которым могут привести изменения метаболизма аминокислот.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с марта по май 2020 г. в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова была создана «красная зона», где проходили лечение и обследование пациенты с диагнозом COVID-19, в том числе беременные женщины. Подготовлено 190 коек для лечения пациентов с COVID-19 и 60 коек акушерского профиля.

В исследование были включены 46 беременных, которые поступили и были родоразрешены в НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную группу составили 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР-теста («ДНК-Технология»; Россия). Включение в группу происходило по мере обращения. Критерии включения в I группу: наличие COVID-19, установленной по данным молекулярно-генетического обследования (ПЦР); критерии включения во II группу: отсутствие COVID-19 по данным клинического обследования, результатам ПЦР-исследования. Критерии исключения: многоплодная беременность; отсутствие резус- и АВ0-изоиммунизации, хромосомных аномалий, генетических мутаций и врожденных пороков развития у плода. Для анализа были собраны пуповинная плазма и амниотическая жидкость.

Образцы биологических жидкостей собирали у всех пациентов на базе 1-го инфекционного отделения НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова «красная зона» с проведением предварительной подготовки и хранения образцов. Транспортировку и последующий анализ осуществляли на

территории НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова в помещениях, сертифицированных для работы с пробами 2-го класса опасности. В работе использовали стандартный набор и модифицированный протокол для приготовления и последующего анализа 31 аминокислоты в физиологических жидкостях (JASEM; Турция). Набор содержит две различных калибровочных смеси лиофилизированных аминокислот, смесь внутренних стандартов, лиофилизированную смесь для контроля качества анализа, подвижные фазы А и В, «Реагент 1» (кат. № JSM-CL-503), используемый при приготовлении образцов плазмы, а также колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) аминокислот (кат. № JSM-CL-575).

В процессе подготовки к анализу 50 мкл образца смешивали с 50 мкл раствора внутренних стандартов, перемешивали в течение 5 с, добавляли 700 мкл Реагента-1, перемешивали повторно 15 с, центрифугировали 3 мин со скоростью 3000 об./мин, после чего переносили надосадочную жидкость в хроматографическую вials. Подготовку и хранение анализируемых образцов и вспомогательных растворов производили в соответствии с руководством JASEM.

Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре 6460 Triple Quad (Agilent; США).

Транзитные переходы между родительскими ионами и дочерними фрагментами для анализируемых аминокислот, соответствующие им хроматографические времена удержания, концентрации внутренних стандартов, а также сведения о чувствительности и воспроизводимости анализа представлены в руководстве JASEM.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью скриптов, написанных на языке R (R Core Team, Vienna, Austria, в Rstudio; R. RStudio, Inc.; Boston).

Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для описания количественных данных использовали медианы (Me) и квартили Q_1 и Q_3 в формате $Me (Q_1; Q_3)$. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании исследуемых параметров были разработаны модели логистической регрессии. В качестве

зависимых переменных в моделях рассматривали все возможные комбинации аминокислот. В качестве независимой переменной выступала принадлежность пациентки к группе. Из всех разработанных моделей выбирали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели были определены критерий Вальда, 95%-й доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал. Качество разработанных моделей определяли путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой, а также расчета чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 46 женщин, из которых 29 пациенток находились в стационаре с подтвержденным COVID-19, и 17 женщин, не болевших данной вирусной инфекцией (группа контроля). Средний возраст пациентов составил $30,7 \pm 4,9$ года, в первой группе средний возраст пациенток $29,9 \pm 5,03$, в группе контроля $32,0 \pm 5,03$. Индекс массы тела в обеих группах значимо не отличался: в первой группе $27,85 \pm 4,52$, во второй $26,12 \pm 3,16$.

Основными клиническими симптомами были кашель (41,38%), потеря обоняния (24,14%) и гипертермия (41,38%) (табл. 1). Бессимптомное течение COVID-19 зарегистрировано в 8 (28,59%) случаях. Легкие, средние и тяжелые случаи составили 22 (75,86%), 6 (20,69%) и 1 (3,45%) случаев соответственно.

По данным компьютерной томографии (КТ) в 25% случаев характерные признаки вирусной пневмонии отсутствовали (СТ-0). Высокая вероятность вирусной пневмонии с минимальным объемом пораженной легочной ткани была выявлена у 40% женщин (СТ-1). Высокая вероятность вирусной пневмонии с поражением 25–50% объема легочной ткани (СТ-2) отмечена у 10% женщин. Высокая вероятность вирусной пневмонии с поражением 50–75% объема легочной ткани (СТ-3) была выявлена у 10% пациенток, с критическим объемом пораженной легочной ткани $> 75\%$ (СТ-4) — в 15% случаев.

В группе пациенток с подтвержденным COVID-19 срок родоразрешения $38 \pm 1,52$ недель беременности достоверно отличался, в сравнении с группой контроля $39,42 \pm 1,14$ недель ($p = 0,001$). Вероятно, это связано с тем, что в группе COVID-19 в четырех случаях (13,8%) были преждевременные роды, однако причины досрочного родоразрешения не связаны с тяжестью вирусного заболевания COVID-19. Причинами преждевременного

Таблица 1. Клиническая характеристика беременных женщин с COVID-19

Клиническая характеристика	COVID-19 (n = 29, %)
Наличие симптомов	21 (71,41)
Повышенная температура ($> 37^\circ\text{C}$)	12 (41,38)
Потеря обоняния	7 (24,14)
Боль в горле	3 (10,34)
Одышка	4 (13,79)
Кашель	12 (41,38)
Утомляемость	4 (13,79)
Легкая степень тяжести	22 (75,86)
Средняя степень тяжести	6 (20,69)
Тяжелая степень тяжести	1 (3,45)

Таблица 2. Клиническая характеристика беременных женщин, включенных в исследование

	COVID-19 (<i>n</i> = 29)	Контроль (<i>n</i> = 17)	<i>p</i>
Возраст, лет	29,9 (± 5,03)	32,0 (± 5,03)	0,16
Рост, см	166,62 (± 7,37)	165,76 (± 7,34)	0,71
Вес, кг	77,64 (± 11,58)	71,87 (± 9,75)	0,10
ИМТ	27,85 (± 4,52)	26,12 (± 3,16)	0,18
Срок родоразрешения, месяцы	38 (± 1,52)	39,42 (± 1,14)	0,001
Масса новорожденного, г	3332 (± 484)	3585 (± 424)	0,08
Рост новорожденного, см	52,4 (± 2,66)	53,1 (± 2,29)	0,35
Апгар на 1-й мин	8 (8;8)	9 (9;9)	0,69
Апгар на 5-й мин	8 (8;8)	9 (9;9)	0,83

родоразрешения послужили в одном случае неготовность мягких родовых путей и наличие рубца на матке, в другом — нарастание тяжести преэклампсии и еще в двух случаях — преждевременное излитие околоплодных вод и начало родовой деятельности. Кесарево сечение выполнено в 13 (44,8%) случаях (ОР: 0,9 [0,5;1,6]), вакуум-экстракция проведена в связи с дистрессом плода в одном (3,5%) случае, остальные роды протекали нормально через естественные родовые пути. В группе контроля было произведено 9 (52,9 %) операций кесарева сечения, в остальных случаях роды произошли через естественные родовые пути. Причинами для операции кесарева сечения послужили наличие одного или более рубца на матке, неправильное положение плода, анатомические особенности таза и заключение смежных специалистов (врача офтальмолога, ортопеда, невролога). В группе COVID-19 средний вес при рождении составил 3332 ± 484 г, в группе контроля — 3585 ± 424 г, средняя длина новорожденных составила $52,4 \pm 2,66$ см и $53,1 \pm 2,29$ см соответственно. В обеих группах состояние новорожденных на первой минуте по шкале Апгар оценено в 8 (8; 8) баллов и на пятой минуте 9 (9; 9) баллов (табл. 2).

Случаев COVID-19 у новорожденных не зарегистрировано. Новорожденные сразу после рождения были изолированы от их матерей. При получении двух отрицательных результатов SARS-CoV-2 у матерей им разрешали грудное вскармливание. Все новорожденные были протестированы на SARS-CoV-2 сразу после рождения, а также на 3-й и 10-й дни после рождения. Все новорожденные получили отрицательные результаты анализов, которые могут свидетельствовать об отсутствии вертикальной передачи инфекции. Случаев перинатальной смерти не зарегистрировано.

На лабораторном этапе работы был применен метод целевой метаболомики с использованием набора для количественного определения 31 аминокислоты методом ВЭЖХ-МС в образцах амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови, собранных в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика Кулакова. Настоящее исследование было проведено для описания изменений уровня аминокислот новорожденных от матерей, у которых был положительный результат теста на инфекцию COVID-19.

Амниотическая жидкость

При анализе амниотической жидкости была определена концентрация 31 аминокислоты. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить восемь аминокислот, содержание которых статистически

значимо отличалось при COVID-19 (табл. 3; рис. 1): 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин.

С учетом полученных результатов ВЭЖХ-МС-анализа интерес представляло рассмотрение возможности разработки математической модели, позволяющей отличить амниотическую жидкость пациентов группы COVID-19 от группы контроля. Для этого были построены модели логистической регрессии на базе аминокислот со статистически значимой разницей между исследуемыми группами. Для построения моделей использовали все возможные комбинации аминокислот. Для каждой из моделей был выполнен ROC-анализ и выбраны четыре модели с характерной наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC). В табл. 4 представлены параметры полученных моделей, а на рис. 2 — соответствующие им ROC-кривые. Наибольшее значение AUC, равное 0,89, было у модели, построенной на базе аргинина, цистина, гистидина и транс-4-гидроксипролина (табл. 5). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,84 и специфичностью 0,93. Несколько более высокие значения чувствительности и специфичности, 0,84 и 1 соответственно, были у модели, построенной на базе 1-метилгистидина, цистина, транс-4-гидроксипролина (табл. 5).

Пуповинная плазма

На следующем этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля пуповинной плазмы в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить четыре аминокислоты, концентрации которых статистически значимо отличались при COVID-19 (табл. 6; рис. 3): 1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин.

Аналогично исследованию амниотической жидкости были построены модели логистической регрессии, позволяющие отличить пуповинную плазму пациентов группы COVID-19 от группы контроля. Результаты разработки и анализа полученных моделей представлены на рис. 4 и в табл. 7, 8. Во все построенные модели вошел цистин, очевидно, как аминокислота наиболее различающаяся между группами. Все модели характеризуются AUC, равным 1, а также чувствительностью и специфичностью, равными 1 (табл. 8).

Особый интерес представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. В двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболом плода, были выявлены и статистически

Таблица 3. Концентрация аминокислот (нмоль/мл) в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19

Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
1-метил-L-гистидин	9,52 (5,78; 23,54)	0 (0; 4,98)	< 0,001
3-метил-L-гистидин	1,32 (0,14; 2,56)	1,62 (0,48; 5,35)	0,258
3-аминоизомасляная кислота	7,44 (6,38; 9,22)	5,48 (4,4; 6,17)	0,002
DL-5-гидроксилизин	10,31 (9,98; 10,69)	10,28 (9,99; 10,5)	0,591
Этаноламин	45,69 (38,94; 67,65)	35,24 (24,53; 46,3)	0,096
L-2-аминомасляная кислота	1,5 (1,27; 2,34)	1,27 (1; 2,62)	0,367
L-2-аминоадипиновая кислота	7,21 (5,39; 10,59)	6,66 (5,24; 9,46)	0,615
L-аланин	238,74 (179,29; 329,59)	187,36 (136,91; 257,72)	0,302
L-аргинин	26,59 (22,42; 48,86)	16,25 (8,97; 23,61)	0,006
L-аспарагин	29,36 (24,49; 40,74)	25,56 (19,32; 41,31)	0,391
L-аспарагиновая кислота	13,82 (7,9; 29,75)	11,92 (6,64; 62,9)	0,784
L-карнозин	4,58 (4,43; 5,21)	5,5 (4,54; 6,31)	0,107
L-цитруллин	8,6 (6,93; 11,43)	7,57 (4,84; 14,52)	0,632
L-цистатинин	0,96 (0,83; 1,16)	0,8 (0,56; 0,96)	0,036
L-цистин	39,69 (30,93; 46,09)	15,92 (5,48; 35,06)	0,005
L-глутаминовая кислота	176,3 (114,37; 215,51)	112,92 (67,26; 176,17)	0,15
L-глутамин	392,48 (267,94; 450,24)	286,57 (177,62; 369,67)	0,044
L-глицин	216,37 (189,39; 359,66)	219,92 (156,65; 260,22)	0,43
L-гистидин	65,35 (34,72; 85,64)	7,9 (0; 30,68)	0,008
L-лизин	153,56 (113,59; 169,06)	149,15 (105,52; 187,74)	0,973
L-метионин	16,55 (10,59; 20,68)	11,21 (7,36; 19,59)	0,252
L-орнитин	24,16 (15,39; 34,42)	42,8 (20,11; 69,65)	0,096
L-фенилаланин	39,63 (24,82; 51,44)	32 (21,48; 55,77)	0,515
L-пролин	118,37 (103,97; 154,61)	109,16 (72,85; 125,35)	0,137
L-серин	65,52 (37,24; 89,78)	50,74 (32,72; 95,85)	0,681
L-треонин	150,1 (101,89; 211,52)	136,31 (96,46; 172,32)	0,445
L-триптофан	11,63 (7,7; 13,69)	7,49 (4,36; 14,33)	0,302
L-тирозин	24,3 (17,75; 38,24)	18,23 (8,22; 47,62)	0,435
L-валин	378,17 (286,06; 544,61)	412,5 (256,16; 570,82)	0,681
Таурин	12,6 (11,48; 14,32)	12,66 (11,54; 16,48)	0,958
Транс-4-гидрокси-L-пролин	18,03 (14,18; 20,08)	13,54 (11,05; 15,96)	0,019

значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты: 1-метилгистидин, цистин и гистидин (табл. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирусные инфекции вызывают характерные изменения в метаболизме клеток-хозяев, чтобы обеспечить эффективную репликацию вируса [19]. Более того, результирующее метаболическое воздействие и клеточное перепрограммирование варьируют между вирусами (даже в пределах одного семейства) и типом клетки-хозяина.

Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом различии концентраций восьми аминокислот в амниотической жидкости и четырех в пуповинной плазме между пациентками с COVID-19 и группой контроля. Причем концентрации восьми аминокислот были снижены у пациенток с COVID-19. Сходные изменения концентраций аминокислот были обнаружены при исследовании плазмы крови взрослых и детей с COVID-19 [24]. Авторы этой работы искали подтверждение своей гипотезе о возможном снижении концентрации

аргинина при COVID-19. Известно, что эндотелиальная дисфункция играет роль в развитии повреждения легких при COVID-19 как у взрослых, так и у детей [27, 28], а низкая биодоступность аргинина связана с развитием эндотелиальной дисфункции и дисрегуляции Т-клеток [29, 30] и вносит вклад в патофизиологию множества заболеваний [31]. Действительно, у больных COVID-19 было обнаружено ожидаемое снижение концентрации аргинина. Кроме того, были значимо снижены и концентрации цитруллина, глутамин, аланина, глицина, гистидина, пролина и нескольких других аминокислот, однако авторы статьи затрудняются объяснить механизмы такого эффекта [24]. Снижение концентрации аминокислот было выявлено и при некоторых других патологиях [19, 21–24, 32, 33].

Особый интерес в нашем исследовании представляло сравнение уровней аминокислот в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. Одновременно в двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих

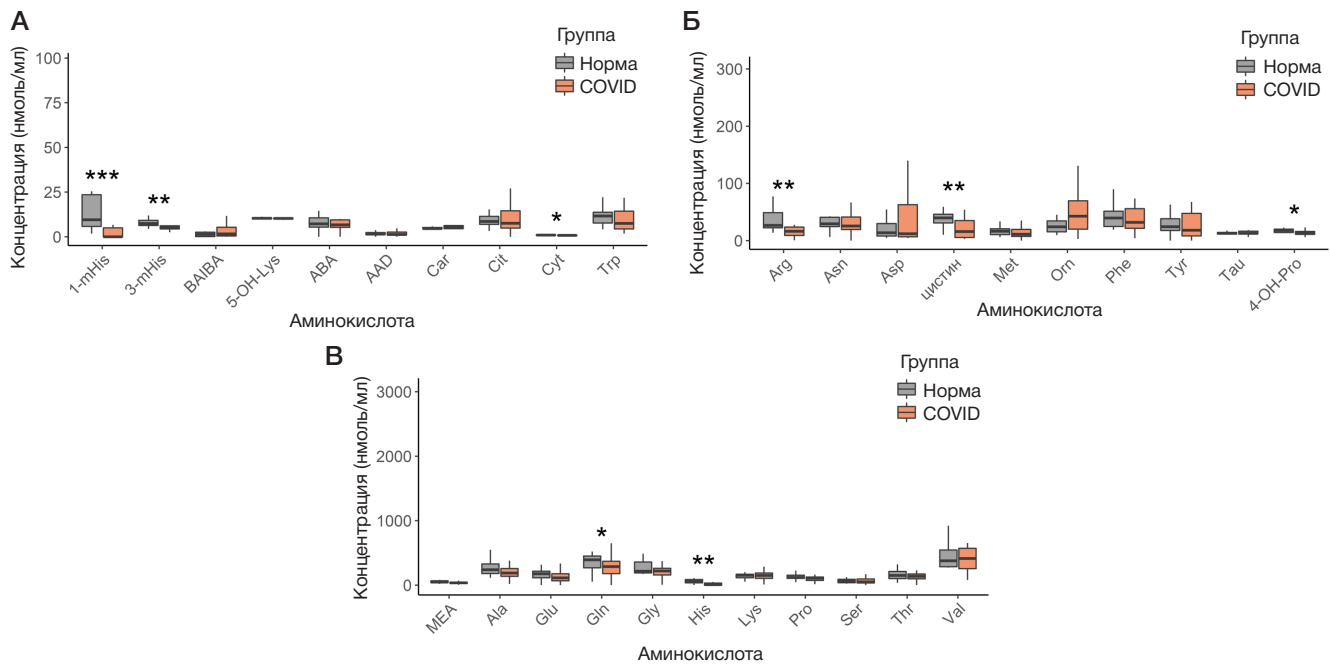


Рис. 1. Концентрация аминокислот в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$; 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AAD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатионин; 4-OH-Pro — 4-гидроксипролин

метаболизм плода, были выявлены и статистически значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты: 1-метилгистидин, цистин и гистидин.

Одной из трех аминокислот, выявленных сразу в двух средах плода (амниотической жидкости и плазме пуповинной крови), обладающей высокой дифференцирующей значимостью, был L-цистин. Это некодируемая аминокислота, представляющая собой продукт окислительной димеризации цистеина. В ходе

посттрансляционной модификации белков она играет крайне важную роль в формировании и поддержании третичной структуры белков и пептидов и, соответственно, их биологической активности. Так, например, такие гормоны, как вазопрессин, окситоцин, инсулин и соматостатин, приобретают биологическую активность после образования внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

Двумя другими аминокислотами со статистически значимой разницей, выявленной в амниотической

Таблица 4. Параметры моделей логистической регрессии, позволяющие дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в амниотической жидкости

№ модели	Коэффициент	Величина коэффициента	Критерий Вальда	p-value	ДИ		ОШ	ОШ	
					2,50%	97,50%		2,50%	97,50%
1	Свободный член	5,8782	2,3394	0,019	1,8187	11,8835	357,17	6,1637	144864
	L-аргинин	0,0091	0,3735	0,709	-0,042	0,0565	1,0091	0,9588	1,0582
	L-цистин	-0,0842	-2,2358	0,025	-0,1747	-0,0208	0,9192	0,8397	0,9794
	L-гистидин	0,0129	1,1644	0,244	-0,0063	0,0386	1,013	0,9937	1,0394
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,2534	-1,7891	0,074	-0,574	-0,0041	0,7762	0,5633	0,9959
2	Свободный член	2,7692	1,7238	0,085	-0,1116	6,3699	15,9456	0,8944	583,996
	1-метил-L-гистидин	-0,0336	-1,271	0,204	-0,1107	0,0073	0,9669	0,8952	1,0073
	L-цистин	-0,0123	-0,5235	0,601	-0,0621	0,0328	0,9878	0,9398	1,0333
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,1114	-1,0398	0,298	-0,3392	0,0951	0,8946	0,7123	1,0998
3	Свободный член	2,7231	1,6899	0,091	-0,152	6,3672	15,2278	0,859	582,4
	1-метил-L-гистидин	-0,0339	-1,2824	0,2	-0,1109	0,0071	0,9667	0,895	1,0071
	L-цистин	-0,0156	-0,5326	0,594	-0,0792	0,0395	0,9845	0,9239	1,0402
	L-глутамин	7,00E-04	0,1925	0,847	-0,0066	0,0082	1,0007	0,9934	1,0082
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,116	-1,0585	0,29	-0,3503	0,0978	0,8905	0,7045	1,1027
4	Свободный член	5,1861	2,146	0,032	1,2261	11,0587	178,765	3,408	63495,7
	1-метил-L-гистидин	-0,0272	-0,8762	0,381	-0,1263	0,0193	0,9731	0,8813	1,0195
	L-цистин	-0,0633	-1,6706	0,095	-0,1559	8,00E-04	0,9387	0,8557	1,0008
	L-гистидин	0,0146	2,199	0,028	0,0032	0,0312	1,0147	1,0032	1,0317
	Транс-4-гидрокси L-пролин	-0,2185	-1,5539	0,12	-0,5408	0,0346	0,8038	0,5823	1,0352

Таблица 5. Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в амниотической жидкости

Аминокислота	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
Л-аргинин, Л-цистин, Л-гистидин, <i>транс</i> -4-гидрокси-Л-пролин	0,89	0,46	0,84 (0,58; 1)	0,93 (0,73; 1)	0,94 (0,8; 1)
1-метил-Л-гистидин, Л-цистин, <i>транс</i> -4-гидрокси-Л-пролин	0,88	0,68	0,84 (0,63; 1)	1 (0,8; 1)	1 (0,86; 1)
1-метил-Л-гистидин, Л-цистин, Л-глутамин, <i>транс</i> -4-гидрокси-Л-пролин	0,88	0,67	0,82 (0,63; 0,95)	1 (0,87; 1)	1 (0,87; 1)
1-метил-Л-гистидин, Л-цистин, Л-гистидин, <i>транс</i> -4-гидрокси-Л-пролин	0,88	0,65	0,79 (0,58; 1)	0,93 (0,67; 1)	0,95 (0,78; 1)

Таблица 6. Концентрация аминокислот (нмоль/мл) в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19

Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
1-метил-Л-гистидин	0 (0; 1,95)	0 (0; 0)	0,041
3-метил-Л-гистидин	3,02 (2,82; 3,46)	3,2 (2,56; 3,68)	0,759
Бета-аланин	1,19 (0,82; 1,61)	2,9 (1,8; 4,35)	0,014
DL-5-гидроксилизин	6,69 (6,48; 6,77)	6,67 (6,56; 6,87)	0,608
Этаноламин	18,77 (14,52; 21,97)	14,75 (13,43; 16,43)	0,104
Л-2-аминомасляная кислота	5,97 (1,97; 7,96)	7,04 (3,45; 10,51)	0,255
Л-аланин	498,14 (451,48; 554,51)	426,72 (390,15; 530,81)	0,134
Л-аргинин	55,2 (42,7; 73,97)	69,1 (51,71; 81,33)	0,23
Л-аспарагин	46,5 (43,4; 51)	51,33 (45,72; 53,85)	0,404
Л-аспарагиновая кислота	21,69 (12,05; 28,9)	16,66 (11,6; 26,76)	0,753
Л-карнозин	2,14 (1,93; 2,3)	2,01 (1,64; 2,33)	0,274
Л-цитруллин	11,92 (10,83; 13,47)	11,96 (10,46; 15,18)	0,357
Л-цистатинин	0,32 (0,17; 0,46)	0,2 (0,16; 0,42)	0,593
Л-цистин	28,93 (26,49; 33,43)	2,55 (1,44; 3,81)	< 0,001
Л-глутаминовая кислота	138,44 (41,01; 189,32)	92,68 (60,31; 109,28)	0,187
Л-глутамин	617,36 (576,47; 725,84)	625,09 (559,72; 689,24)	0,736
Л-глицин	277,25 (255,67; 303,25)	259,22 (235,34; 293,13)	0,43
Л-гистидин	175,97 (138,84; 206,4)	141,92 (103,55; 175,91)	0,04
Л-лизин	410,97 (388,38; 448,61)	451,73 (389,8; 488,91)	0,531
Л-метионин	33,11 (27,86; 39)	30,61 (25,81; 39,05)	0,753
Л-орнитин	119,5 (100,28; 131,19)	100,77 (83,6; 124,42)	0,123
Л-фенилаланин	79,88 (76,47; 94,87)	80,5 (75,99; 88,11)	0,982
Л-пролин	159,61 (153,75; 177,18)	158,5 (143,86; 176,18)	0,417
Л-серин	132,49 (125,85; 148,56)	143,03 (128,45; 154,13)	0,558
Л-треонин	293,9 (231,79; 339,82)	319,48 (276,25; 352,53)	0,23
Л-триптофан	77,59 (66,69; 84,57)	73,72 (68,93; 78,29)	0,309
Л-тирозин	70,65 (57,22; 78,07)	63,8 (57,51; 77,25)	0,685
Таурин	38,01 (31,1; 49,77)	37,28 (30,51; 46,92)	0,928
<i>Транс</i> -4-гидрокси-Л-пролин	20,95 (17,68; 26,64)	20,56 (19,28; 23,57)	0,893

жидкости и плазме пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19, были Л-гистидин и его производное 1-метилгистидин.

Л-гистидин — гетероциклическая альфа-аминокислота, одна из 20 протеиногенных аминокислот и одна из двух условно-незаменимых аминокислот (наряду с аргинином). Первоначально считалось, что незаменима она только для детей. Остаток гистидина входит в состав активных центров множества ферментов. Гистидин является предшественником в биосинтезе гистамина. Гистамин

играет важную роль в развитии воспаления и некоторых аллергических реакций. Гистидин, одна из незаменимых аминокислот, способствует росту и восстановлению тканей, участвует в синтезе эритроцитов и лейкоцитов, а также в формировании миелиновых оболочек нервных клеток. Нехватка гистидина может вызвать ослабление слуха, дегенеративные заболевания, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Наши результаты показали, что вирус может вызывать выраженные изменения в метаболизме амниотической

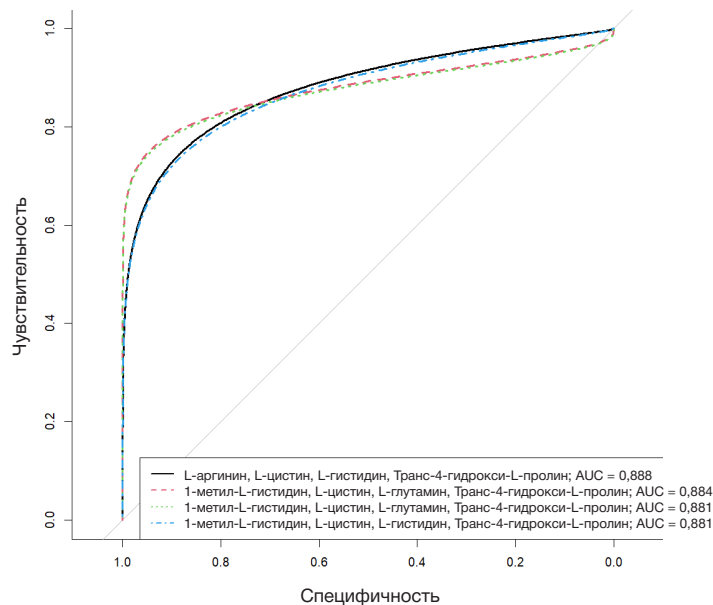


Рис. 2. ROC-кривые моделей логистической регрессии, разработанных на основании концентраций аминокислот в амниотической жидкости для классификации пациенток контрольной группы и группы COVID-19

жидкости и плазме пуповинной крови, что чревато риском нарушения программирования производства белковых молекул. При этом COVID-19 может никак не проявлять себя при рождении. Изменения метаболических процессов путем нарушения необходимого соотношения аминокислот на территории плода, могут быть связаны с репликацией вируса, воспалительной реакцией хозяина и изменениями энергетического метаболизма. Вероятно, данные нарушения метаболизма могут проявиться и на момент родоразрешения, но не были зафиксированы в нашем исследовании, ввиду критериев включения в основную группу. Все роженицы болели COVID-19 на момент родоразрешения. И, возможно, именно данный факт не позволил вирусу реализовать на территории плода все свои негативные потенции.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании мы использовали методы целевой метаболомики для обнаружения изменений концентрации аминокислот беременных, инфицированных COVID-19, в момент госпитализации. Такие изменения были выявлены. Было обнаружено, что концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости (1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин) и четырех аминокислот в пуповинной плазме (1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин) статистически значительно различаются между группой пациентов, инфицированных COVID-19, и контрольной группой. Наша цель состояла в том, чтобы не только найти маркеры заболевания, но и

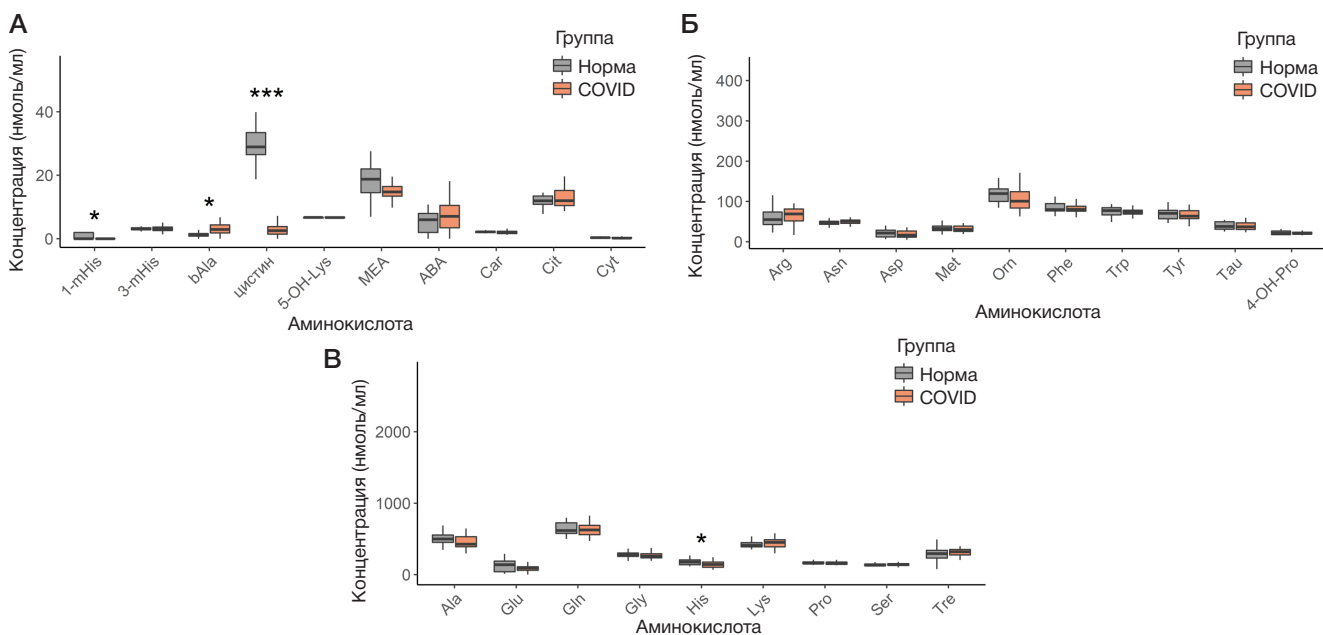


Рис. 3. Концентрация аминокислот в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19. Границы бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$. 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; bAla — бета-аланин; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксипролин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатионин; 4-OH-Pro — 4-гидроксипролин

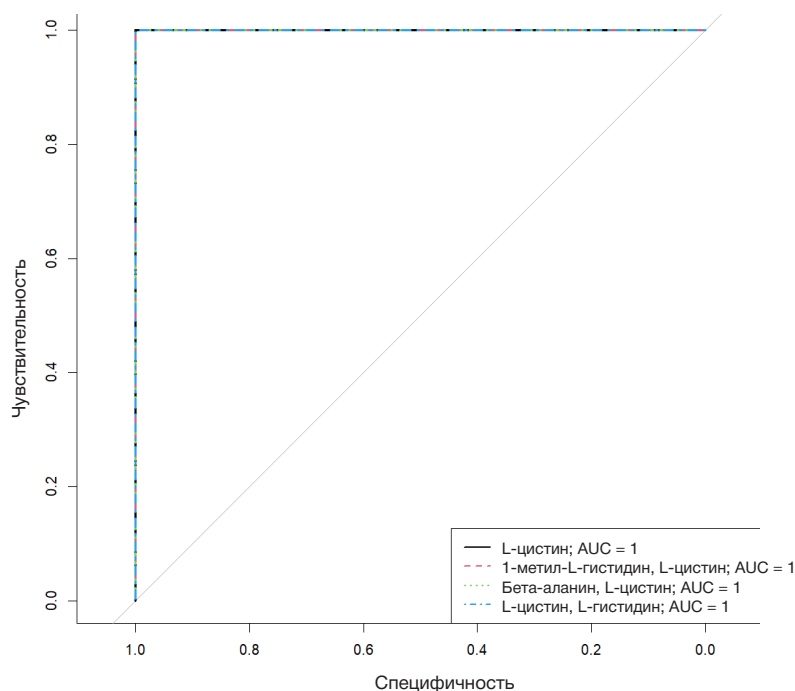


Рис. 4. ROC-кривые моделей логистической регрессии, разработанных на основании концентраций аминокислот в пуповинной плазме для классификации пациенток контрольной группы и группы с COVID-19

понять, какое влияние инфекция COVID-19 оказывает на метаболизм плода. Оказалось, что нарушение метаболизма выявленных аминокислот проявляется при ряде серьезных патологий, таких как острый респираторный дистресс-синдром у пациентов с тяжелым сепсисом, пневмония при гриппе H1N1, бактериальная пневмония, серповидноклеточная анемия, талассемия, малярия,

острая астма, муковисцидоз, легочная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые виды рака и др. Эти результаты могут быть использованы для выбора направления дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных от матерей, перенесших COVID-19, и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и

Таблица 7. Параметры моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в пуповинной плазме

№ модели	Коэффициент	Величина коэффициента	Критерий Вальда	p-value
1	Свободный член	79,204	0,001	0,9992
	L-цистин	-5,3827	-0,001	0,9992
2	Свободный член	79,4804	0,001	0,9992
	1-метил-L-гистидин	3,1115	3,00E-04	0,9998
	L-цистин	-5,4032	-0,001	0,9992
3	Свободный член	77,8123	9,00E-04	0,9992
	Бета-аланин	-1,4597	-2,00E-04	0,9998
	L-цистин	-5,099	-0,001	0,9992
4	Свободный член	78,9156	9,00E-04	0,9993
	L-цистин	-5,3946	-0,001	0,9992
	L-гистидин	0,0027	0	1

Таблица 8. Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в пуповинной плазме

Аминокислоты	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
1-метил-L-гистидин, L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
Бета-аланин, L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
L-цистин, L-гистидин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)

Таблица 9. Концентрации аминокислот (нмоль/мл) в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19

Образец	Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
Амниотическая жидкость	1-метил-L-гистидин	9,52 (5,78; 23,54)	0 (0; 4,98)	< 0,001
	3-метил-L-гистидин	7,44 (6,38; 9,22)	5,48 (4,4; 6,17)	0,002
	L-аргинин	26,59 (22,42; 48,86)	16,25 (8,97; 23,61)	0,006
	L-цистатинин	0,96 (0,83; 1,16)	0,8 (0,56; 0,96)	0,036
	L-цистин	39,69 (30,93; 46,09)	15,92 (5,48; 35,06)	0,005
	L-глутамин	392,48 (267,94; 450,24)	286,57 (177,62; 369,67)	0,044
	L-гистидин	65,35 (34,72; 85,64)	7,9 (0; 30,68)	0,008
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	18,03 (14,18; 20,08)	13,54 (11,05; 15,96)	0,019
Пуповинная плазма	1-метил-L-гистидин	0 (0; 1,95)	0 (0; 0)	0,041
	Бета-аланин	1,19 (0,82; 1,61)	2,9 (1,8; 4,35)	0,014
	L-цистин	28,93 (26,49; 33,43)	2,55 (1,44; 3,81)	< 0,001
	L-гистидин	175,97 (138,84; 206,4)	141,92 (103,55; 175,91)	0,04

новорожденным после постановки диагноза COVID-19, так как отдаленные последствия для здоровья данной когорты новорожденных могут включать в себя эндокринные,

нервные и аллергические расстройства, обусловленные метаболомными нарушениями программирования производства белковых молекул в антенатальном периоде.

Литература

- Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204 (6 SUPPL.): 58.
- Song JY, Park KV, Han SW, Choi MJ, Noh JY, Cheong HJ, et al. Paradoxical long-term impact of maternal influenza infection on neonates and infants. *BMC Infect Dis*. 2020; 20 (1): 1–8.
- Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal Early-Onset Infection with SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (7): 722–5.
- Yu N, Li W, Kang Q, Zeng W, Feng L, Wu J. No SARS-CoV-2 detected in amniotic fluid in mid-pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30320-0.
- Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
- Zamaniyan M, Ebadi A, Aghajani S, Rahmani Z, Haghsheenas M, Azizi S. Preterm delivery, maternal death, and vertical transmission in a pregnant woman with COVID-19 infection. *Prenat Diagn*. 2020; 40 (13): 1759–61.
- Sisman J, Jaleel MA, Moreno W, Rajaram V, Collins RRJ, Savani RC, et al. Intrauterine Transmission of SARS-CoV-2 Infection in a Preterm Infant. *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 265–7.
- Costa S, Posteraro B, Marchetti S, Tamburrini E, Carducci B, Lanzone A, et al. Excretion of SARS-CoV-2 in human breast milk. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26 (10): 1430–2.
- Buonsenso D, Costa S, Sanguinetti M, Cattani P, Posteraro B, Marchetti S, et al. Neonatal Late Onset Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Am J Perinatol*. 2020; 37 (8): 869–72.
- Qiancheng X, Jian S, Lingling P, Lei H, Xiaogan J, Weihua L, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnancy. *Int J Infect Dis*. 2020; 95: 376–83.
- Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 from an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1846–8.
- Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (1): 51–60.
- Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers with COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1848–9.
- Sukhikh G, Petrova U, Prihodko A, Starodubtseva N, Chingin K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI: 10.3390/v13030447.
- Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–75.
- Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-020-17436-6.
- Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics*. 2016; 12 (10). DOI: 10.1007/s11306-016-1108-4.
- Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.e15.
- Wannemacher RW, Pekarek RS, Bartelloni PJ, Vollmer RT, Beisel WR. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection. *Metabolism*. 1972; 21 (1): 67–76.
- Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15. DOI: 10.1186/s13054-017-1672-7.
- Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
- Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
- Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
- Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
- Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome

- to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
26. Thaker SK, Chng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol*. 2019; 17 (1): 59.
 27. Diorio C, McNerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
 28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
 29. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*. 2020; 8 (8): 277.
 30. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 31. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc.: 2017; 30S–47S.
 32. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17. DOI: 10.21203/rs.3.rs-18796/v1.
 33. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.
- ## References
1. Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204 (6 SUPPL.): 58.
 2. Song JY, Park KV, Han SW, Choi MJ, Noh JY, Cheong HJ, et al. Paradoxical long-term impact of maternal influenza infection on neonates and infants. *BMC Infect Dis*. 2020; 20 (1): 1–8.
 3. Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal Early-Onset Infection with SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (7): 722–5.
 4. Yu N, Li W, Kang Q, Zeng W, Feng L, Wu J. No SARS-CoV-2 detected in amniotic fluid in mid-pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30320-0.
 5. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
 6. Zamaniyan M, Ebadi A, Aghajani S, Rahmani Z, Haghsheenas M, Azizi S. Preterm delivery, maternal death, and vertical transmission in a pregnant woman with COVID-19 infection. *Prenat Diagn*. 2020; 40 (13): 1759–61.
 7. Sisman J, Jaleel MA, Moreno W, Rajaram V, Collins RRJ, Savani RC, et al. Intrauterine Transmission of SARS-CoV-2 Infection in a Preterm Infant. *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 265–7.
 8. Costa S, Posteraro B, Marchetti S, Tamburrini E, Carducci B, Lanzone A, et al. Excretion of SARS-CoV-2 in human breast milk. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26 (10): 1430–2.
 9. Buonsenso D, Costa S, Sanguinetti M, Cattani P, Posteraro B, Marchetti S, et al. Neonatal Late Onset Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Am J Perinatol*. 2020; 37 (8): 869–72.
 10. Qiancheng X, Jian S, Lingling P, Lei H, Xiaogan J, Weihua L, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnancy. *Int J Infect Dis*. 2020; 95: 376–83.
 11. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 from an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1846–8.
 12. Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (1): 51–60.
 13. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers with COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1848–9.
 14. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingin K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI: 10.3390/v13030447.
 15. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–75.
 16. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-020-17436-6.
 17. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics*. 2016; 12 (10). DOI: 10.1007/s11306-016-1108-4.
 18. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.e15.
 19. Wannemacher RW, Pekarek RS, Bartelloni PJ, Vollmer RT, Beisel WR. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection. *Metabolism*. 1972; 21 (1): 67–76.
 20. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15. DOI: 10.1186/s13054-017-1672-7.
 21. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
 22. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
 23. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
 24. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
 25. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
 26. Thaker SK, Chng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol*. 2019; 17 (1): 59.
 27. Diorio C, McNerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
 28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
 29. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*. 2020; 8 (8): 277.
 30. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 31. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M,

- Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: Nutrition in Clinical Practice. SAGE Publications Inc.: 2017; 30S–47S.
32. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17. DOI: 10.21203/rs.3.rs-18796/v1.
33. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. Crit Care. 2013; 17 (1): 1–8.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА IL1 В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ ПОСЛЕ COVID-19

О. А. Радаева¹✉, А. С. Симбирцев², Ю. А. Костина¹, М. С. Искандярова¹, С. В. Машнина¹, Д. Д. Бессейнов, Е. В. Негоднова¹, В. В. Куляпкин¹

¹ Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск, Россия

² Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Механизм патогенетического утяжеления в системе SARS-CoV-2–эссенциальной гипертензии (ЭАГ) носит более сложный характер, чем взаимодействие на уровне ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Целью исследования было проанализировать динамику содержания представителей семейства IL1 (IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37) в крови больных ЭАГ через 10, 30 и 180 дней после COVID-19 для определения цитокинопосредованных звеньев прогрессирования ЭАГ в постинфекционном периоде. В исследовании участвовали четыре группы пациентов: с ЭАГ и COVID-19 в анамнезе (с пневмонией/без пневмонии), с COVID-19 в анамнезе (с пневмонией/без пневмонии) без ЭАГ. Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом. Полученные результаты демонстрируют пролонгированный характер провоспалительного иммунного ответа в постинфекционном периоде у больных с ЭАГ (сохранение более высоких уровней IL1 β , IL1 α , IL18 на 10-й, 30-й и 180-й дни после выздоровления ($p < 0,001$) при сопоставлении с периодом до инфицирования SARS-CoV-2). В группе без ЭАГ выявлено восстановление баланса анализируемых цитокинов к 30-му дню наблюдения. Двукратное увеличение содержания IL18 в крови пациентов с ЭАГ и COVID-19 в анамнезе на фоне отсутствия роста IL18BP через 30 дней наблюдения при сравнении с доинфекционным периодом ассоциируется с развитием сердечно-сосудистых осложнений в период с первого по шестой месяц наблюдения, что позволяет выдвинуть гипотезу о значимости данных иммунорегуляторных пептидов в патогенезе осложнений и актуализирует дальнейший научный поиск.

Ключевые слова: COVID-19, артериальная гипертензия, IL1 β , IL1 α , IL18, сердечно-сосудистые осложнения

Вклад авторов: О. А. Радаева — разработка дизайна исследования, анализ результатов, оформление рукописи; А. С. Симбирцев — формулирование цели исследования, итогового варианта рукописи; Ю. А. Костина — проведение лабораторных исследований, оформление рукописи; М. С. Искандярова — работа с литературой, работа над первым вариантом рукописи; С. В. Машнина — работа с литературой, наблюдение за пациентами; Д. Д. Бессейнов — статистическая обработка данных; Е. В. Негоднова — работа над первым вариантом рукописи; В. В. Куляпкин — статистическая обработка данных за 6 месяцев наблюдения.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева (протокол № 12 от 14 декабря 2008 г. и протокол № 85 от 27 мая 2020 г.) и проведено в соответствии с требованиями положений Хельсинкской декларации ВМА (2013 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999) с учетом дополнительного протокола к Конвенции по правам человека и биомедицине в области биомедицинских исследований (2005). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Александровна Радаева
ул. Ульянова, д. 26а, г. Саранск, 430020; radaevamed@mail.ru

Статья получена: 19.05.2021 **Статья принята к печати:** 02.06.2021 **Опубликована онлайн:** 07.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.026

CHANGES IN BLOOD LEVELS OF IL1 FAMILY CYTOKINES IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION AFTER HAVING COVID-19

Radaeva OA¹✉, Simbirtsev AS², Kostina YuA¹, Iskandiyarova MS¹, Mashnina SV¹, Bessheynev DD, Negodnova EV¹, Kulyapkin VV¹

¹ National Research Mordovia State University, Saransk, Russia

² State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

Pathogenetic progression mechanisms in the SARS-CoV-2–essential hypertension (EAH) system are more complex than interaction at the level of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). The study was aimed to assess the dynamic changes of the IL1 members (IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37) blood levels in patients with EAH 10, 30, and 180 days after having COVID-19 in order to define cytokine-mediated mechanisms of EAH progression during the period following infection. The study involved four groups of patients: with a history of EAH and COVID-19 (pneumonia/no pneumonia), with a history of COVID-19 (pneumonia/no pneumonia) and no EAH. Cytokine levels were determined by enzyme immunoassay. The study results demonstrate the prolonged proinflammatory immune response during the period following infection in patients with EAH (retaining higher levels of IL1 β , IL1 α , and IL18 on days 10, 30, and 180 after recovery ($p < 0.001$) compared to levels measured prior to SARS-CoV-2 infection). In the group with no EAH, the balance of assayed cytokines was restored on day 30 of follow-up. The two-fold increase of blood IL18 levels in patients, having a history of EAH and COVID-19 and showing no increase in the IL18BP levels after 30 days of follow up compared to the values measured prior to infection, is associated with cardiovascular complications occurring during the first six months of follow-up. This makes it possible to hypothesize the importance of these immunoregulatory peptides for the pathogenesis of complications and enhances the relevance of further scientific research.

Keywords: COVID-19, arterial hypertension, IL1 β , IL1 α , IL18, cardiovascular complications

Author contribution: Radaeva OA — study design, analysis of the results, manuscript editing; Simbirtsev AS — formulating research aim, final version of the article; Kostina YuA — laboratory tests, manuscript editing; Iskandiyarova MS — literature analysis, working on the first manuscript draft; Mashnina SV — literature analysis, monitoring of patients; Bessheynev DD — statistical data processing; Negodnova EV — working on the first manuscript draft; Kulyapkin VV — statistical processing of data obtained during the 6th month of follow-up.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Research Mordovia State University (protocol № 12 dated December 14, 2008, protocol № 85 dated May 27, 2020), the research was carried out in accordance with the WMA Declaration of Helsinki (2013) and the protocol of the Convention on Human Rights and Biomedicine (1999) taking into consideration the Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Biomedical Research (2005). Informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Radaeva
Ulyanova, 26a, Saransk, 430020; radaevamed@mail.ru

Received: 19.05.2021 **Accepted:** 02.06.2021 **Published online:** 07.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.026

В период пандемии усилия медицинских работников и исследователей в большей степени направлены на борьбу с непосредственным уровнем инфицирования SARS-CoV-2 и снижением острой смертности, но все чаще появляются данные о значимости изучения «продолженного COVID-19» [1]. Важно учитывать отдаленные эффекты SARS-CoV-2, реализуемые через дисбаланс цитокин-опосредованных векторов, определяющих прогрессирование ряда сердечно-сосудистых заболеваний в постинфекционном периоде с увеличением риска развития осложнений [2, 3]. Описаны данные, демонстрирующие связь между различными ОРВИ и повышением частоты сердечно-сосудистых осложнений в последующий временной период [4, 5]: до четырехкратного увеличения в первые 30 дней и полтора-кратного увеличения спустя годы, особенно у лиц с артериальной гипертензией (АГ) [6]. Длительные наблюдения за пациентами с SARS-CoV-2 указывают на формирование сердечно-сосудистых осложнений и изменение метаболизма в постинфекционном периоде, но эти данные ограничены и требуют пересмотра в аспекте SARS-CoV-2. В дополнение к выводам о том, что лица с АГ могут быть более восприимчивы к COVID-19 и характеризоваться более тяжелым течением [7, 8], в литературе также описано, что SARS-CoV-2-инфицирование может выступить триггером как для прогрессирования ранее существующего, так и для инициации иного патологического процесса [3].

Понимание связи между COVID-19 и хроническими заболеваниями имеет важное значение для ведения пациентов с коморбидными состояниями в постинфекционном периоде. Механизм патогенетического утяжеления в системе SARS-CoV-2 и эссенциальной гипертензии (ЭАГ) носит более сложный характер, чем взаимодействие на уровне ACE2. В связи со значимостью цитокин-опосредованных векторов в патогенезе ЭАГ высока вероятность, что после перенесенного COVID-19 происходит изменение принципов иммунного регулирования, ассоциированных с прогрессированием гипертонии. Иммунная система наравне с дыхательной является мишенью для SARS-CoV-2 [9], но на данный момент ограничена информация о динамике иммунорегуляторных пептидов в постковидном периоде. COVID-19 — новое инфекционное заболевание, что объясняет заявления научного сообщества о значимости получения большей информации как об отдаленных осложнениях у пациентов с хроническими неврологическими, сердечно-сосудистыми заболеваниями после SARS-CoV-2-инфицирования, так и о роли иммунорегуляторных пептидов в их патогенезе [10]. Представители семейства IL1 (IL1 β , IL1 α , IL1 γ , IL18, IL18BP, IL37), задействованные в развитии COVID-19 [2, 11–12], выступают значимыми факторами прогрессирования эндотелиальной дисфункции и ремоделирования сосудистой стенки, как через изменения баланса в системе вазопрессоров и вазодилататоров, так и за счет перепрограммирования синтеза матричных металлопротеаз [13–15].

Целью исследования стал анализ динамики содержания представителей семейства IL1 (IL1 β , IL1 α , IL1 γ , IL18, IL18BP, IL37) в сыворотке периферической крови больных ЭАГ через 10, 30 и 180 дней после перенесенной COVID-19 для определения цитокин-опосредованных звеньев потенциального прогрессирования ЭАГ в постинфекционный период.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Анализируемые данные получены в рамках третьего этапа проспективного открытого нерандомизированного исследования «Цитокины в патогенезе и диагностике ЭАГ», начатого в 2008 г. В ходе работы были сформированы четыре группы пациентов из базы данных лиц с ЭАГ II стадии (402 человека), которые находятся под наблюдением 10 (7,5–12,3) лет (комплексное функциональное, клинко-биохимическое обследование с анализом содержания 32 цитокинов проводили в 2008, 2013, январе-феврале 2020 гг.): группа 1 — пациенты с ЭАГ II стадии после COVID-19 без пневмонии; группа 2 — пациенты с ЭАГ II стадии с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией в анамнезе; группа 3 — лица без ЭАГ, после COVID-19 без пневмонии; группа 4 — лица без ЭАГ, с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией в анамнезе (группы 3 и 4 набраны из условно здоровых лиц (без гипертензии), которые длительно наблюдаются (154 человека) в рамках исследования и сопоставимы по возрасту, основным клинко-биохимическим характеристикам). Критерии включения: ЭАГ II стадии; сопоставимая гипотензивная терапия перед SARS-CoV-2-инфицированием (и-АПФ и/или тиазидные диуретики); возраст 60–65 лет; сопоставимые до SARS-CoV-2-инфицирования показатели общего холестерина, липопротеидов, триглицеридов, глюкозы; обхват талии для мужчин менее 102 см, для женщин менее 88 см, ИМТ < 25 кг/м². Критерии исключения: ассоциированные клинические состояния в анамнезе на момент начала третьего этапа исследования (острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), инфаркт миокарда (ИМ), стенокардия, коронарная реваскуляризация), почечная недостаточность, сахарный диабет 1-го или 2-го типа, аутоиммунные, аллергические заболевания, симптоматическая артериальная гипертензия, алкогольная/наркотическая зависимость, курение, отказ пациента от долгосрочного участия в исследовании. Группу сопоставления составили условно здоровые лица с систолическим артериальным давлением (САД) 100–130 мм рт. ст. и диастолическим артериальным давлением (ДАД) 70–89 мм рт. ст.

Важным аспектом дизайна представленной работы является наличие данных о цитокиновом статусе включенных в исследование пациентов в период до SARS-CoV-2-инфицирования (январь–февраль 2020 г.).

Диагноз COVID-19 был выставлен в соответствии с актуальными временными клиническими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции 2019 (COVID-19) с учетом результатов ПЦР (здесь и далее — на наличие РНК SARS-CoV-2) и выявления иммуноглобулинов класса М и класса G к SARS-CoV-2 в динамике. У пациентов зарегистрировано два клинических варианта: ОРВИ или пневмония без дыхательной недостаточности (легкое или среднетяжелое течение). Пациенты получали сопоставимую терапию в соответствии с клиническими рекомендациями, актуальными на момент проведения терапии (май–октябрь 2020 г.). Через 10, 60, 180 дней после двух отрицательных результатов ПЦР проводили забор крови в 8.00 натошак. Кровь центрифугировали, отделяли сыворотку и хранили в маркированных пробирках при температуре –30° С не более 45 суток. Уровни IL1 β , IL1 α , IL1 γ , IL18, IL18 BP, IL37 определяли методом ИФА на базе лаборатории кафедры иммунологии, микробиологии, вирусологии (микробиологическая и иммунологическая лаборатория, лицензия № 13.01.04. 0001. Л.000005.06.11, бессрочная)

сертифицированные специалисты на иммуноферментном анализаторе «Personal Lab ТМ» (Adaltis; Италия). Используемые тест-системы обладали достаточной чувствительностью и специфичностью: IL1 β (eBioscience (Bender MedSystems), диапазон измерения — 0,3–250 пг/мл; IL1 α (eBioscience (Bender MedSystems), диапазон измерения — 1,06–100,0 пг/мл; IL1ra (eBioscience (Bender MedSystems), диапазон измерения — 30–7000 пг/мл; IL18 (eBioscience (Bender MedSystems), диапазон — 9–5000 пг/мл; IL18BP (R&D Systems, USCN Life Science), диапазон — 0,51–100 нг/мл); IL37 (Fine Biotech), диапазон — 31,2–2000 пг/мл.

Ежемесячно проводили телефонный опрос для выявления факта развития сердечно-сосудистых осложнений с последующей верификацией информации в медицинском учреждении, курирующем пациента.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 13.5 (StatSoft; США). Данные представляли в виде медианы (Me) и перцентилей (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Распределение данных отличалось от распределения Гаусса–Лапласа, поэтому при сравнении зависимых выборок использовали критерий Уилкоксона, при сравнении несвязанных выборок — критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентов с ЭАГ II стадии в период до SARS-CoV-2-инфицирования были характерны более высокие уровни в сыворотке периферической крови IL1 β , IL1 α , IL18, IL18BP, IL37, чем у условно здоровых лиц ($p < 0,001$) (табл. 1 и 2). После перенесенного COVID-19 у больных с ЭАГ II стадии зарегистрированы иные количественные и качественные показатели, отражающие динамику изменения содержания в крови IL1 β , IL1 α , IL1ra, IL18, IL18BP, IL37, по сравнению с больными после SARS-CoV-2-инфицирования, но без ЭАГ. Так, у лиц с ЭАГ II стадии вне зависимости от формы COVID-19 (с пневмонией или без пневмонии) через 10 дней после второго отрицательного результата ПЦР обнаружены более высокие уровни провоспалительных представителей семейства IL1 (IL1 β , IL1 α) по сравнению с периодом до инфицирования ($p < 0,001$; см. табл. 1). У больных без гипертензии данная закономерность была характерна только для лиц с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией, при этом нормализация содержания IL1 β , IL1 α (достижение уровней до инфицирования) в крови у данной категории пациентов происходила к 30-му дню после выздоровления с сохранением и через 6 месяцев (см. табл. 2). В группе больных с ЭАГ также регистрируется

снижение IL1 β , IL1 α по сравнению с данными от 10-го дня после выздоровления, но без достижения уровней периода до инфицирования в группе больных с ЭАГ и SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией в анамнезе. Важно отметить повторный рост IL1 β , IL1 α в крови пациентов с ЭАГ (вне зависимости от пневмонии в анамнезе) через 180 дней после отрицательного результата ПЦР по сравнению с данными периода до инфицирования и 30-го дня после лабораторного выздоровления (отрицательный результат ПЦР; см. табл. 1). При анализе индивидуальных показателей выявлено, что тенденция увеличения IL1 α к концу 6-го месяца сформировалась, в первую очередь, за счет роста в группе женщин с ЭАГ (у женщин увеличение на 79% (75% ДИ [61–87]) в сравнении с данными через месяц, у мужчин — на 32% (75% ДИ [12–44]) соответственно; $p < 0,001$). Особенности динамики изменения уровня IL1 β в зависимости от половой принадлежности не выявлено. При этом рост провоспалительных IL1 β , IL1 α в постинфекционном периоде в группе пациентов с ЭАГ и COVID-19 без пневмонии происходит на фоне увеличения противовоспалительного IL1ra, что совпадает с закономерностями в группе больных без гипертензии. Больных с ЭАГ и COVID-19 с пневмонией характеризует увеличение IL1 β , IL1 α без повышения концентрации в крови естественного антагониста IL1ra (см. табл. 1).

Анализ динамики уровней IL18 и IL18 BP показал, что пациенты с ЭАГ II стадии вне зависимости от формы COVID-19 (с пневмонией или без пневмонии) через 10 дней после отрицательного результата ПЦР имели повышенный уровень IL18 в сыворотке крови по сравнению с данными «доинфекционного» периода ($p < 0,001$), и данная закономерность сохранялась через 30 и 180 дней (см. табл. 1). Важно отметить, в группе пациентов с ЭАГ и без пневмонии в анамнезе рост IL18 сопровождался увеличением IL18 BP ($p < 0,001$), которое сохранялось и через 30 и через 180 дней после лабораторного выздоровления, в группе с ЭАГ и пневмонией в анамнезе компенсаторного повышения содержания IL18 BP в постинфекционном периоде не выявлено ($p < 0,05$). Определено также, что у лиц с ЭАГ II стадии и COVID-19 без пневмонии в анамнезе через 180 дней после отрицательного результата ПЦР были достоверно более высокие уровни IL37 по сравнению как с «доинфекционным периодом» ($p < 0,001$), так и с показателями пациентов с ЭАГ II стадии и COVID-19 с пневмонией в анамнезе ($p < 0,001$). У больных без ЭАГ, перенесших COVID-19 без вовлечения в патологический процесс легких, изменения содержания IL18, IL18 BP и IL37 при сравнении «доинфекционного» и «постинфекционного» периодов выявлено не было ($p < 0,05$). В группе с SARS-

Таблица 1. Сравнительная характеристика уровней цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии до COVID-19 и через 10, 30 и 180 дней после заболевания (Me [Q₂₅–Q₇₅])

	Пациенты с ЭАГ II стадии и COVID-19							
	без пневмонии (n = 53 человек)				с пневмонией (n = 41 человек)			
	до COVID-19	через 10 дней	через 30 дней	через 180 дней	до COVID-19	через 10 дней	через 30 дней	через 180 дней
	1	2	3	4	5	6	7	8
IL1 β	18,7 [13,2–22,1]	23,9 [20,1–26,4] ^{*1}	19,6 ^{*2} [13,9–20,8]	25,7 [14,8–31] ^{*1,3}	19,3 [14–21,3]	37,8 ^{*2,4} [34,3–39,1]	30,2 ^{*3,5,6} [26,7–38,4]	42,3 [33,4–47,2] ^{*4,5,6,7}
IL1 α	13,2 [10,6–15,5]	16,9 [12,6–19,1] ^{*1}	14,4 [11–16,6] ^{*1,2}	18,3 [13–23,4] ^{*1,2,3}	20,7 [13,1–22,7] ^{*1}	26,7 [18,1–31,8] ^{*2,5}	31,1 [25,7–33,4] ^{*3,5,6}	35,6 [29,3–38,1] ^{*4,5,6,7}
IL1ra	698 [602–754]	750 [665–812] ^{*1}	690 [508–787] ^{*2}	984 [733–1187] ^{*1,2,3}	612 [524–690] ^{*1}	645 [572–735] ^{*2}	602 [518–720] ^{*3}	621 [503–668] ^{*4}
IL18	301 [243–352]	399 [243–420] ^{*1}	411 [270–452] ^{*1}	412 [264–436] ^{*1}	394 [321–658] ^{*1}	460 [345–732] ^{*2,5}	479 [345–532] ^{*3,5}	474 [387–609] ^{*1,4,5}
IL18 BP	5980 [5311–6720]	7900 ^{*1} [7132–8640]	8190 ^{*1} [7243–8930]	7870 ^{*1} [5311–6720]	5110 ^{*1} [4963–6265]	4960 ^{*2} [4872–6120]	5230 ^{*3} [4850–6334]	4890 ^{*4} [4730–5970]
IL37	65,7 [54,7–68,9]	68,3 [51,2–72,4]	64,9 [57,2–75,1]	88,3 [76,4–94,4] ^{*1,2,3}	52,7 [48,1–60,3] ^{*1}	51,3 [44,2–55,1] ^{*2}	52,1 [46,3–56,7] ^{*3}	49,7 [45,4–55,3] ^{*4}

Примечание: * — уровень достоверности $p < 0,001$, [^] — $p < 0,01$, ¹ — $p < 0,05$ (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна–Уитни для несвязанных совокупностей).

Таблица 2. Сравнительная характеристика уровней цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови больных без ЭАГ II стадии до COVID-19 и через 10, 30 и 180 дней после заболевания (Ме [Q₂₅–Q₇₅])

	Пациенты с COVID-19 без ЭАГ							
	без пневмонии (n = 41 человек)				с пневмонией (n = 44 человек)			
	до COVID-19	через 10 дней	через 30 дней	через 180 дней	до COVID-19	через 10 дней	через 30 дней	через 180 дней
	1	2	3	4	5	6	7	8
IL1β	5,12 [4,83–5,32]	5,33 [4,12–5,2]	5,29 [8,89–5,41]	4,97 [3,65–5,44]	5,38 [4,97–5,44]	17,2 [14,1–20,1] ^{*2,4}	5,72 [3,3–4,15] ^{*6}	5,42 [4,53–5,65] ^{*4,6}
IL1α	3,22 [3,04–3,41]	3,39 [3,16–3,56]	2,99 [2,56–3,45]	3,18 [2,93–3,39]	3,14 [2,97–3,24]	4,72 [3,11–5,82] ^{*2,5}	3,25 ^{*6} [2,61–2,49]	3,18 [2,67–4,14] ^{*6}
IL1ra	697 [584–791]	830 [690–914] ^{*1}	667 [458–733] ^{*1,2}	728 [602–816] ^{*2}	657 [504–731]	843 [693–913] ^{*2}	609 [515–769] ^{*6}	642 [526–712] ^{*4,6}
IL18	162 [145–197]	157 [137–172]	166 [151–183]	147 [139–203]	234 [177–267] ^{*1}	298 [235–367] ^{*2,5}	247 [224–274] ^{*3,6}	228 [207–259] ^{*1,4,6}
IL18 BP	4880 [3510–5670]	5070 [3670–5830]	4834 [3220–5470]	4993 [3440–5580]	4768 [3640–5721]	5930 ^{*2,5} [4930–8216]	6200 ^{*3} [4850–7334]	6180 ^{*4,5} [4603–7100]
IL37	80 [68,7–93,3]	76 [62,3–89,4]	78,9 [67,4–86,6]	82,3 [61,2–94,6]	77,1 [63,3–95,7]	74,4 [66,2–83,7]	75,3 [65,7–82,3]	79,5 [55,7–85,3]

Примечание: * — уровень достоверности $p < 0,001$, ^ — $p < 0,01$, ' — $p < 0,05$ (применяли критерий Уилкоксона для связанных совокупностей и критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей).

CoV-2-ассоциированной пневмонией, но без ЭАГ на 10-й день после отрицательного результата ПЦР в сыворотке крови повышался уровень IL18 и IL18 BP ($p < 0,001$) по сравнению с данными до SARS-CoV-2-инфицирования, но с возвращением к «доинфекционному» уровню через 30 дней (см. табл. 2). Динамика IL37 в группе без ЭАГ в постинфекционном периоде не зарегистрирована ($p < 0,05$).

Сопоставление цитокиновых показателей пациентов с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией на фоне ЭАГ II стадии и больных с ЭАГ и COVID-19 без пневмонии в «доинфекционном» периоде показало, что больные с ЭАГ и COVID-19 с пневмонией имели более выраженный рост уровней IL1α и IL18 в сыворотке периферической крови ($p < 0,001$) на фоне меньших концентраций IL1ra, IL18 BP и IL37 ($p < 0,001$) по сравнению с показателями у больных с ЭАГ и COVID-19 без пневмонии. Данная закономерность в группе без ЭАГ не выявлена.

Важно отметить, что при сопоставлении с классическими шкалами расчета риска сердечно-сосудистых осложнений при АГ пациенты были сопоставимы как до, так и после COVID-19, но за время наблюдения у восьми пациентов (мужчин) из группы ЭАГ и COVID-19 (пневмония) в период наблюдения 1–6 месяцев развились ОКС, ОНМК или ТНМК. Учитывая ограниченное число наблюдений лиц с осложнениями в постинфекционном периоде их индивидуальные данные были проанализированы отдельно: пациенты характеризовались двукратным ростом уровней IL18 в сыворотке периферической крови через 30 дней наблюдения по сравнению с доинфекционным периодом и увеличением на 50% по сравнению с данными 10-го дня (до инфицирования — 410 [397–426] пг/мл; 10-й день — 562 [544–681] пг/мл; 30-й день — 824 [807–903] пг/мл). В группе пациентов с ЭАГ и SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией в анамнезе, но без сердечно-сосудистых осложнений в последующие месяцы (30–180-й дни наблюдения) отсутствовала динамика содержания IL18 к 30-му дню при сопоставлении с 10-ми сутками наблюдения). Рост IL18 при развитии осложнений в последующем периоде происходил на фоне индивидуально низкого содержания в крови IL18BP (до инфицирования — 4805 [4793–4826] пг/мл; 10-й день — 4786 [4741–4798] пг/мл; 30-й день — 4630 [4665–4662] пг/мл) и IL37 (до инфицирования — 46,9 [46,7–47,3] пг/мл; 10-й день — 44,5 [44,1–44,9] пг/мл; 30-й день — 45,1 [44,6–45,5] пг/мл), что соответствовало I квартилю при анализе распределения пациентов с учетом уровня IL18BP и IL37 как в периоде до инфицирования, так и в дальнейшем. Отличий по другим представителям семейства IL1 при сопоставлении с пациентами без осложнений в первые

6 месяцев выявлено не было. Двое мужчин из группы ЭАГ и COVID-19 (без пневмонии) в анамнезе также перенесли ОНМК после лабораторного выздоровления в период с 1-го по 6-й месяц наблюдения и имели аналогичные особенности системы IL1 и индивидуальные качественные и количественные характеристики, отличные от таковых у лиц с ЭАГ и COVID-19 (без пневмонии) в анамнезе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования получены данные о динамике изменения содержания провоспалительных представителей семейства IL1 (IL1β, IL1α, IL18) и их естественных антагонистов (IL1ra, IL18BP) у пациентов после COVID-19, которые доказывают пролонгированный характер провоспалительного иммунного ответа в постинфекционном периоде у больных с ЭАГ (сохранение отличий от уровней доинфекционного периода на протяжении 6 месяцев после лабораторного выздоровления) в сравнении с условно здоровыми лицами (восстановление цитокиновых показателей до прединфекционных уровней через 30 дней после лабораторного выздоровления у лиц с SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией и через 10 дней у пациентов без пневмонии). Другие исследователи также обозначали значимость изменения ряда иммунорегуляторных пептидов (IL6, MCP1, IP10 и др.) у больных с COVID-19 [16] с указанием провоспалительного характера и связи с потенциальным прогрессированием сопутствующих заболеваний в дальнейшем. В связи с новым характером вируса эти данные ограничены и отсутствует информация о закономерностях с учетом прединфекционных уровней цитокинов у пациентов с COVID-19, что повышает актуальность представленной работы, анализирующей отличия содержания IL1β, IL1α, IL1ra, IL18, IL18 BP, IL37 в крови с учетом периода до SARS-CoV-2-инфицирования. Длительное сохранение повышенных концентраций провоспалительных IL1β, IL1α и IL18 в крови пациентов в постковидном периоде имеет принципиальное значение для «усиления» патогенетических линий прогрессирования гипертонии. Опубликованы данные о стимулирующих эффектах IL1β в отношении уровня ADMA (опосредованный вазопрессор за счет активации протеинаргининметилтрансферазы (PRMT) и торможения диметиларгининадиметиламиногидролаза (DDAH) [17, 18]. Кроме того, описан сигнальный путь IL1α-NF-κB-CCL2, способствующий миграции иммунных клеток и закреплению процессов ремоделирования сосудистой стенки [19], что подтверждено и нашими данными [13] с обоснованием большей значимости для женщин с ЭАГ.

Необходимо отметить, что у пациентов с ЭАГ и SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонией в анамнезе увеличение IL1 β и IL1 α , IL18 происходит без компенсаторного роста естественных антагонистов: IL1ra и IL18BP, IL3. Согласно опубликованным данным, функциональное комплексообразование между IL37 и IL18BP происходит за счет единых рецепторных единиц IL37 с IL18ra и направлено как на нивелирование вазопрессорных эффектов IL18, так и на прямое блокирование синтеза SDMA [20, 21]. Отсутствие их роста у больных с ЭАГ после SARS-CoV-2-инфицирования на фоне повышения IL18 увеличивает вероятность реализации вазопрессорных и ремоделирующих эффектов действия в системе IL18–IL18BP–IL37 с потенциальным повышением риска повреждения органов-мишеней при ЭАГ (миокарда, головного мозга и др.). Данную гипотезу частично подтверждает анализ индивидуальных «кривых» изменения уровней цитокинов в сыворотке периферической крови пациентов с ОКС, ОНМК и ТНМК, которые характеризуются двукратным увеличением IL18 в крови в первый месяц наблюдения при отсутствии компенсаторного повышения IL18BP и IL37. Значимый рост IL18 у больных с ЭАГ в постковидный период может быть ключевым промежуточным звеном патогенетической цепи, посредством которого АТ II способствует реконструированию сосудов [22] со вторичным прогрессированием дисфункции левого желудочка и увеличением толщины интимы-медии сонной артерии, что является нисходящим следствием АГ и маркером будущего сердечно-сосудистого риска у пациентов [23]. Увеличение синтеза IL18 в постковидном периоде возможно и за счет активации CD147, потенциального рецептора для адгезии SARS-CoV-2 [24], являющегося индуктором м-РНК IL18 через стимуляцию сайтов связывания NF- κ B и AP1 (активирующего протеина-1) с промотором гена IL18 через Rac1-опосредованную PI3K/Akt/IKK (фосфоинозитид-3-киназа/АКТ/киназа IKK)-зависимую деградацию I κ B- α (ингибиторного белка I κ B киназа α) и MKK7/JNK (киназа MKK7/c-Jun-N-терминальная киназа)-сопряженную активацию AP1 [25], что имеет большее патофизиологическое значение у лиц с предковидным высоким уровнем IL18/низким IL18BP–IL37 и выявлено в нашем исследовании.

Важно отметить, что пациенты с SARS-CoV2-ассоциированной пневмонией имели в сыворотке периферической крови более высокие прединфекционные уровни IL1 α и IL18 на фоне меньших концентраций антагонистов: IL1ra, IL18BP и IL37, по сравнению с показателями больных с ЭАГ и COVID-19 без пневмонии, что позволяет предположить значимость содержания и отношения представленных цитокинов (цитокиновый прединфекционный статус пациента) при проникновении SARS-CoV-2 для инициации патологического процесса в ткани легкого. При этом у пациентов без ЭАГ с прединфекционными низкими уровнями IL1 α и IL18 в крови отличий в зависимости от развития пневмонии не выявлено, в связи с чем можно говорить о потенциально IL1 α - и IL18-опосредованных звеньях патогенеза пневмонии при COVID-19 у больных с ЭАГ и дозозависимых эффектах представленных цитокинов у данной категории больных.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования подтверждают научную значимость изучения динамики изменения содержания представителей семейства IL1 в крови пациентов с ЭАГ и SAR-CoV-2-инфицированием в анамнезе для построения индивидуальных иммунопатогенетических схем прогрессирования гипертензии. Полученные данные актуализируют дальнейшие наблюдения для подтверждения гипотезы о роли IL18–IL18BP в иммунопатогенезе отдаленных сердечно-сосудистых осложнений у больных с ЭАГ и COVID-19 в анамнезе. Для подтверждения гипотезы, что цитокины могут выступить прогностическими маркерами в данной клинической ситуации необходимо в дальнейшем сопоставить количественные характеристики широкого спектра цитокинов, вазоактивных веществ, функциональных показателей и провести многофакторный корреляционный анализ и выделение потенциальных независимых критериев с высоким уровнем чувствительности и специфичности в отношении риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Понимание цитокин-опосредованных механизмов отдаленных сердечно-сосудистых осложнений может изменить терапевтические подходы (терапевтическую стратегию) при ведении пациентов как в острый период COVID-19, так и в постинфекционный.

Литература

1. Mitrani RD, Dabas N, Goldberger JJ. COVID-19 cardiac injury: Implications for long-term surveillance and outcomes in survivors. *Heart Rhythm*. 2020; 17 (11): 1984–90.
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 497–506.
3. Alyammahi SK, Abidin SM, Alhamad DW, Elgendy SM, Altell AT, Omar HA. The dynamic association between COVID-19 and chronic disorders: An updated insight into prevalence, mechanisms and therapeutic modalities. *Infect Genet Evol*. [Internet] 2021 [cited 2021 Mach 8]; 87: [about 1 p.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820304780?via%3Dihub>.
4. Nguyen JL, Yang W, Ito K, Matte TD, Shaman J, Kinney PL. Seasonal influenza infections and cardiovascular disease mortality. *JAMA Cardiol*. 2016; 1 (3): 274–81.
5. Brack MC, Lienau J, Kuebler WM, Witzenthath M. Cardiovascular sequelae of pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 2019; 25 (3): 257–62.
6. Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, Angus DC, Chirinos JA, Chang CC, et al. Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA*. 2015; 313 (3): 264–74.
7. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA*. 2020; 323 (20): 2052–9.
8. Коростовцева Л. С., Ротарь О. П., Конради А. О. Covid-19: каковы риски пациентов с артериальной гипертензией? *АГ*. 2020; 26 (2): 124–32.
9. Liu Y, Zhang HG. Vigilance on New-Onset Atherosclerosis Following SARS-CoV-2 Infection. *Front Med (Lausanne)*. [Internet] 2021 Jan [cited 2021 Apr 24] 20; 7: [about 1 p.]. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2091304>.
10. Carod-Artal FJ. Neurological complications of coronavirus and COVID-19. *Complicaciones neurológicas por coronavirus y COVID-19*. *Rev Neurol*. 2020; 70 (9): 311–22.
11. Van de Veerdonk FL, Netea MG. Blocking IL1 to prevent respiratory

- failure in COVID-19. *Crit Care*. [Internet] 2020 Jul 18 [cited 2021 Apr 24]; 24 (1): [about 1 p.]. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-03166-0>.
12. Rowaiye AB, Okpalefe OA, Onuh Adejoke O, Ogidigo JO, Hannah Oladipo O, Ogu AC. Attenuating the Effects of Novel COVID-19 (SARS-CoV-2) Infection-Induced Cytokine Storm and the Implications. *J Inflamm Res*. 2021; 14: 1487–510.
 13. Радаева О. А. Цитокины в патогенезе и диагностике эссенциальной артериальной гипертензии [диссертация]. М., 2019.
 14. Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res*. 2019; 115 (4): 776–87.
 15. Savoia C, Volpe M, Kreutz R. Hypertension, a Moving Target in COVID-19: Current Views and Perspectives. *Circ Res*. 2021; 128 (7): 1062–79.
 16. Siripanthong B, Nazarian S, Muser D. Recognizing COVID-19-related myocarditis: The possible pathophysiology and proposed guideline for diagnosis and management. *Heart Rhythm*. 2020; 17 (9): 1463–71.
 17. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*. 2015; 116 (6): 1022–33.
 18. Tain Y-L, Hsu C-N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins*. 2017; 9 (3): 92–97.
 19. Paish HL, Kalson NS, Smith GR, et al. Fibroblasts Promote Inflammation and Pain via IL1 α Induction of the Monocyte Chemoattractant Chemokine (C-C Motif) Ligand 2. *Am J Pathol*. 2018; 188 (3): 696–714.
 20. Conti P, Lessiani G, Kritas SK, Ronconi G, Caraffa A, Theoharides TC. Mast cells emerge as mediators of atherosclerosis: Special emphasis on IL37 inhibition. *Tissue & Cell*. 2017; 49 (3): 393–400.
 21. Радаева О. А., Симбирцев А. С. Анализ патогенетических связей IL18, IL18BP, IL37 и вазоактивных веществ (AT II, ET-1, NO, ADMA, SDMA, ENOS, INOS, NT-PROCNP и NT-PROBNP) при эссенциальной артериальной гипертензии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14 (1–2): 235–8.
 22. Valente AJ, Yoshida T, Murthy SN, Sakamuri SS, Katsuyama M, Clark RA, et al. Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 303 (3): 282–96.
 23. OZzbiçer S, Ulucam ZM. Association between Interleukin-18 Level and Left Ventricular Mass Index in Hypertensive Patients. *Korean Circulation Journal*. 2017; 47 (2): 238–44.
 24. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther*. [Internet] 2020 Dec 4 [cited 2021 Apr 24]; 5 (1): [about 1 p.]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00426-x>.
 25. Venkatesan B, Valente AJ, Prabhu SD, Shanmugam P, Delafontaine P, Chandrasekar B. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF- κ B and MKK7/JNK/AP-1 signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010; 49 (4): 655–63.

References

1. Mitrani RD, Dabas N, Goldberger JJ. COVID-19 cardiac injury: Implications for long-term surveillance and outcomes in survivors. *Heart Rhythm*. 2020; 17 (11): 1984–90.
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 497–506.
3. Alyammahi SK, Abdin SM, Alhamad DW, Elgendy SM, Altell AT, Omar HA. The dynamic association between COVID-19 and chronic disorders: An updated insight into prevalence, mechanisms and therapeutic modalities. *Infect Genet Evol*. [Internet] 2021 [cited 2021 Mach 8]; 87: [about 1 p.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820304780?via%3Dihub>.
4. Nguyen JL, Yang W, Ito K, Matte TD, Shaman J, Kinney PL. Seasonal influenza infections and cardiovascular disease mortality. *JAMA Cardiol*. 2016; 1 (3): 274–81.
5. Brack MC, Lienau J, Kuebler WM, Witzenth M. Cardiovascular sequelae of pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 2019; 25 (3): 257–62.
6. Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, Angus DC, Chirinos JA, Chang CC, et al. Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA*. 2015; 313 (3): 264–74.
7. Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA*. 2020; 323 (20): 2052–9.
8. Korostovceva LS, Rotar OP, Konradi AO. Covid-19: kakovy riski pacientov s arterial'noj gipertenzij? AG. 2020; 26 (2): 124–32. Russian.
9. Liu Y, Zhang HG. Vigilance on New-Onset Atherosclerosis Following SARS-CoV-2 Infection. *Front Med (Lausanne)*. [Internet] 2021 Jan [cited 2021 Apr 24] 20; 7: [about 1 p.]. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2091304>.
10. Carod-Artal FJ. Neurological complications of coronavirus and COVID-19. *Complicaciones neurológicas por coronavirus y COVID-19*. *Rev Neurol*. 2020; 70 (9): 311–22.
11. Van de Veerdonk FL, Netea MG. Blocking IL1 to prevent respiratory failure in COVID-19. *Crit Care*. [Internet] 2020 Jul 18 [cited 2021 Apr 24]; 24 (1): [about 1 p.]. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-03166-0>.
12. Rowaiye AB, Okpalefe OA, Onuh Adejoke O, Ogidigo JO, Hannah Oladipo O, Ogu AC. Attenuating the Effects of Novel COVID-19 (SARS-CoV-2) Infection-Induced Cytokine Storm and the Implications. *J Inflamm Res*. 2021; 14: 1487–510.
13. Radaeva OA. Citokiny v patogeneze i diagnostike jessencial'noj arterial'noj gipertenzii [dissertacija]. М., 2019. Russian.
14. Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res*. 2019; 115 (4): 776–87.
15. Savoia C, Volpe M, Kreutz R. Hypertension, a Moving Target in COVID-19: Current Views and Perspectives. *Circ Res*. 2021; 128 (7): 1062–79.
16. Siripanthong B, Nazarian S, Muser D. Recognizing COVID-19-related myocarditis: The possible pathophysiology and proposed guideline for diagnosis and management. *Heart Rhythm*. 2020; 17 (9): 1463–71.
17. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*. 2015; 116 (6): 1022–33.
18. Tain Y-L, Hsu C-N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins*. 2017; 9 (3): 92–97.
19. Paish HL, Kalson NS, Smith GR, et al. Fibroblasts Promote Inflammation and Pain via IL1 α Induction of the Monocyte Chemoattractant Chemokine (C-C Motif) Ligand 2. *Am J Pathol*. 2018; 188 (3): 696–714.
20. Conti P, Lessiani G, Kritas SK, Ronconi G, Caraffa A, Theoharides TC. Mast cells emerge as mediators of atherosclerosis: Special emphasis on IL37 inhibition. *Tissue & Cell*. 2017; 49 (3): 393–400.
21. Radaeva OA, Simbirev AS. Analiz patogeneticheskikh svyazey IL18, IL18BP, IL37 i vazoaktivnykh veshchestv (AT II, ET-1, NO, ADMA, SDMA, ENOS, INOS, NT-PROCNP i NT-PROBNP) pri jessencial'noj arterial'noj gipertenzii. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza*. 2019; 14 (1–2): 235–8.
22. Valente AJ, Yoshida T, Murthy SN, Sakamuri SS, Katsuyama M,

- Clark RA, et al. Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 303 (3): 282–96.
23. OZzbiçer S, Ulucam ZM. Association between Interleukin-18 Level and Left Ventricular Mass Index in Hypertensive Patients. *Korean Circulation Journal.* 2017; 47 (2): 238–44.
 24. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther.* [Internet] 2020 Dec 4 [cited 2021 Apr 24]; 5 (1): [about 1 p.]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00426-x>.
 25. Venkatesan B, Valente AJ, Prabhu SD, Shanmugam P, Delafontaine P, Chandrasekar B. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF-κB and MKK7/JNK/AP-1 signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2010; 49 (4): 655–63.

ЭКСТРЕННАЯ ХИРУРГИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ БОЛЬНЫМ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19 И ТУБЕРКУЛЕЗОМ В МНОГОПРОФИЛЬНОЙ КЛИНИКЕ

М. Н. Решетников , Д. В. Плоткин, О. Н. Зубань, Е. М. Богородская


Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом, Москва, Россия

Двойное бремя новой коронавирусной инфекции COVID-19 и туберкулеза является одной из глобальных проблем сегодняшнего дня. Мало изучены особенности оказания экстренной хирургической помощи этому контингенту пациентов. Целью исследования было оценить результаты лечения острой хирургической патологии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в сочетании с туберкулезом. За 2020 г. пролечено 465 пациентов с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез, при этом экстренная хирургическая помощь потребовалась в 36 (5,6%) случаях, в том числе 16 пациентам с ВИЧ-инфекцией, которым выполнено 64 экстренных оперативных вмешательства. Туберкулез органов дыхания выявлен у 13 (36,1%) больных, генерализованный — у 23 (63,9%). По данным компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки объем вовлечения легочной ткани при вирусной пневмонии COVID-19 менее 25% зарегистрирован у 61,9% больных, 25–50% — у 30,6%, 50–75% — у 5,6%. КТ органов брюшной полости позволила выявить осложнения абдоминального туберкулеза (перфорации туберкулезных язв кишечника, острую кишечную непроходимость, туберкулезный перитонит), туберкулезный спондилит, осложненный псоас-абсцессом. Распределение оперативных вмешательств было следующим: 28,2% — абдоминальных, 23,2% — торакальных, 15,6% — при гнойных заболеваниях мягких тканей, 32,8% — прочих. В послеоперационном периоде летальность составила 22,2%. По результатам исследования можно сделать вывод, что новая коронавирусная инфекция COVID-19 у пациентов с туберкулезом, подвергнутых экстренным оперативным вмешательствам, не внесла существенного вклада в увеличение послеоперационной летальности.

Ключевые слова: COVID-19, туберкулез, ВИЧ-инфекция, экстренная хирургия

Вклад авторов: М. Н. Решетников — концепция исследования, сбор материала, написание и редактирование текста; Д. В. Плоткин — подготовка текста к печати, редактирование фотографий, анализ и интерпретация данных; О. Н. Зубань — концепция исследования, редактирование текста; Е. М. Богородская — редактирование и утверждение окончательной версии для публикации.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ГБУЗ Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (протокол № 10 от 17 декабря 2020 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Михаил Николаевич Решетников
ул. Барболина, д. 3, г. Москва, 107014; taxol@bk.ru

Статья получена: 12.04.2021 **Статья принята к печати:** 19.05.2021 **Опубликована онлайн:** 31.05.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.025

EMERGENCY SURGICAL CARE FOR PATIENTS WITH COVID-19 AND TUBERCULOSIS COINFECTION AT MULTISPECIALTY HOSPITAL

Reshetnikov MN , Plotkin DV, Zuban ON, Bogorodskaya EM


Moscow Research and Clinical Center for TB Control, Moscow, Russia

The double burden of the novel coronavirus infection and tuberculosis (TB) is a global challenge. The aspects of emergency surgical care for patients with COVID-19 and TB coinfection remain understudied. The aim of this study was to assess treatment outcomes in acute surgical patients with COVID-19 and preexisting TB coinfection. In 2020, our Center delivered surgical care to 465 patients with COVID-19 and preexisting TB; a total of 64 emergency surgeries were performed on 36 (5.6%) patients, of whom 16 had HIV. Thirteen patients (36.1%) were diagnosed with pulmonary TB; 23 patients (63.9%) had disseminated TB. Chest CT scans showed >25% lung involvement in 61.9% of the patients with COVID-19 pneumonia, 25–50% lung involvement in 30.6% of the patients, and 50–75% lung involvement in 5.6% of the patients. By performing abdominal CT, we were able to detect abdominal TB complications, including perforated tuberculous ulcers of the intestine, intestinal obstruction and tuberculous peritonitis, as well as tuberculous spondylitis complicated by psoas abscess. Of all surgical interventions, 28.2% were abdominal, 23.2% were thoracic, 15.6% were surgeries for soft tissue infection, and 32.8% were other types of surgery. Postoperative mortality was 22.2%. We conclude that COVID-19 did not contribute significantly to postoperative mortality among acute surgical patients with TB.

Keywords: COVID-19, tuberculosis, HIV, emergency surgery

Author contribution: Reshetnikov MN proposed the concept, collected patient data and wrote the manuscript; Plotkin DV analyzed and interpreted the obtained data, prepared the manuscript and photos for publication; Zuban ON proposed the concept and edited the manuscript; Bogorodskaya EM edited the manuscript and prepared its final version.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Moscow Research and Clinical Center for TB Control (Protocol № 10 dated December 17, 2020). Informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Mikhail N. Reshetnikov
Barbolina, 3, Moscow, 107014; taxol@bk.ru

Received: 12.04.2021 **Accepted:** 19.05.2021 **Published online:** 31.05.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.025

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19 существенно увеличила нагрузку на мировую систему здравоохранения, в том числе на коечный фонд и медицинский персонал. Плановое оперативное лечение заболеваний на некоторый период было приостановлено в связи с карантинными мероприятиями и с временным перепрофилированием коечного фонда для оказания помощи пациентам с COVID-19. В то же время во вновь созданные инфекционные госпитали стали поступать

пациенты с острой хирургической, урологической и гинекологической патологией, травмами, полученными на фоне COVID-19 [1–4]. В период пандемии на первый план выходит эпидемиологическая безопасность медицинского персонала. Активная репликация вируса SARS-CoV-2 происходит в дыхательных путях и желудочно-кишечном тракте, что способствует аэрозольному механизму передачи вируса во время операций на этих органах [5, 6]. К сложностям диагностики и лечения указанной патологии

относят «маскирующую» роль новой коронавирусной инфекции и трудности в обеспечении безопасности медицинского персонала, отраженных в международных клинических рекомендациях по работе хирургических служб в условиях пандемии COVID-19 [7–10].

Значительные проблемы возникают при оказании хирургической помощи коморбидным больным COVID-19, в которой особое место занимает туберкулез [11–14].

Цель исследования — оценить результаты лечения острой хирургической патологии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в сочетании с туберкулезом.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С 16 апреля 2020 г. в ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» организован Ковидный Центр, в состав которого входит туберкулезное легочное отделение № 4 для лечения пациентов с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез, рентгенологическое, эндоскопическое, операционное отделение, отделение реанимации и интенсивной терапии со штатом врачей реаниматологов-анестезиологов. За 2020 г. пролечено 465 пациентов с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез, при этом экстренным хирургическим вмешательствам подвергнуто 36 (5,6%) пациентов.

В исследование включено 36 пациентов. Критерии включения: пациенты с COVID-19, подвергнутые хирургическим вмешательствам. Из них у 13 (36,1%) был диагностирован только туберкулез легких, диссеминированный процесс диагностирован у восьми (61,5%), инфильтративный — у двух (15,4%), фиброзно-кавернозный — у двух (15,4%), казеозная пневмония — у одного (7,7%). У трех (23,1%) пациентов выявлена ВИЧ-инфекция. Генерализованный туберкулез с поражением легких и других органов наблюдали у 23 из 36 больных (63,9%). Из 23 больных с генерализованным процессом абдоминальный туберкулез диагностирован у четырех (17,4%), мочеполовой — у трех (13,0%), периферических лимфатических узлов — у двух (8,7%), костей и суставов — у двух (8,7%), а у 12 (52,2%) — множественные локализации (более двух). ВИЧ-инфекция диагностирована у 13 (56,5%) человек.

Лечение пациентов с COVID-19 осуществляли в соответствии с Клиническим протоколом лечения больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19, находящихся на лечении в медицинских организациях государственной системы здравоохранения города Москвы (Москва, 2020), а туберкулеза — в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых» (Москва, 2020).

Из оперированных пациентов 23 (63,9%) были госпитализированы по направлению противотуберкулезных учреждений г. Москвы. По каналу скорой помощи 13 (36,1%) больных поступили из других медицинских организаций: семь — переведены из городских нетуберкулезных стационаров с подозрением на туберкулез, шесть — при

выявлении в КТ-центрах или из дома в порядке оказания скорой медицинской помощи. Среди госпитализированных пациентов москвичей было 19 (52,8%), жителей регионов РФ — девять (25,0%), иностранных граждан — пять (13,9%), лиц без определенного места жительства — трое (8,3%).

Госпитализированы 31 (86,1%) мужчина, 5 (13,9%) женщин в возрасте от 26 до 83 лет (средний — $41,9 \pm 15,3$ года). Туберкулез диагностирован у всех пациентов, у 16 из них (44,4%) — ВИЧ-инфекция. При поступлении всем пациентам проведено комплексное диагностическое обследование, включавшее в себя компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки, а пациентам с экстренной абдоминальной патологией — КТ и/или УЗИ органов брюшной полости. Диагностика новой коронавирусной инфекции COVID-19 была основана на результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) на обнаружение РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки, исследования органов грудной клетки с помощью КТ. Туберкулез диагностировали по результатам лучевых методов, а также исследования мокроты, мочи, каловых масс, операционного материала на предмет обнаружения характерной патоморфологической картины и/или микобактерий туберкулеза (МБТ) с помощью люминесцентной микроскопии, культурального исследования на жидких и плотных питательных средах, молекулярно-генетических методов.

Достоверность различий между количественными показателями оценивали с помощью теста расхождений, между качественными — по критерию χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжительность заболевания туберкулезом составила в среднем 6,7 месяца. У большей части пациентов (23 (63,9%) человека) МБТ в мокроте не выявлена. У 13 (36,1%) пациентов бактериовыделение было обнаружено, из них у четырех (30,8%) установлена множественная лекарственная устойчивость возбудителя к противотуберкулезным препаратам, а у одного (7,7%) — широкая лекарственная устойчивость.

У всех 36 пациентов при КТ органов грудной клетки выявлена вирусная пневмония различной степени тяжести. В мазке из рото-носоглотки у 28 (77,8%) пациентов методом ПЦР обнаружена РНК вируса SARS-CoV-2, у восьми (22,2%) тест оказался отрицательным. У последних диагноз COVID-19 поставлен на основании характерной клинико-рентгенологической картины (табл. 1).

КТ органов брюшной полости выполнена у 11 (30,6%) пациентов. В двух случаях выявлен свободный газ в брюшной полости (перфорация туберкулезных язв подвздошной кишки). У одного пациента обнаружено ограниченное скопление свободного газа в правой подвздошной области (прикрытая перфоративная язва слепой кишки). У одного пациента диагностирован

Таблица 1. Распределение больных туберкулезом по степени тяжести вирусной пневмонии и обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2

Степень тяжести пневмонии по данным КТ ОГК (объем поражения легких)	Число пациентов		в том числе РНК SARS-CoV-2 обнаружена	
	Абс.	%	Абс.	%
КТ-1 (< 25%)	23	61,9	19	52,8
КТ-2 (25–50%)	11	30,6	8	22,2
КТ-3 (50–75%)	2	5,6	1	2,8
Всего	36	100	28	77,8

Таблица 2. Вид и число выполненных оперативных вмешательств

Название оперативного вмешательства	Количество		Летальность (n = 36)	
	Абс.	%	Абс.	%
Операции на органах брюшной полости				
Санационная релапаротомия	12	18,8		
Правосторонняя гемиколэктомия	3	4,7		
Лапароскопия диагностическая	2	3,1		
Лапароцентез	1	1,6		
Итого:	18	28,2	4	11,1
Операции на органах грудной клетки				
Дренажирование плевральной полости	11	17,2		
Бронхоскопия, установка бронхоблокатора	4	6,2		
Итого:	15	23,4		
Операции при гнойных заболеваниях мягких тканей				
Некрэктомия	5	7,8		
Установка VAC-системы	3	4,7		
Вскрытие и дренирование флегмоны	2	3,1		
Итого:	10	15,6		
Прочие оперативные вмешательства				
Трахеостомия	7	10,9		
Наложение вторичных швов	4	6,2		
Первичная хирургическая обработка ран	3	4,7		
Эпицистостомия	3	4,7		
Грыжесечение при ущемленной грыже	2	3,1		
Дренажирование псоас-абсцесса	1	1,6		
Ампутация нижней конечности	1	1,6		
Итого:	21	32,8	4	11,1
Всего:	64	100	8	22,2

забрюшинный абсцесс (забрюшинная перфорация туберкулезной язвы слепой кишки). У одного больного выявлено расширение петель кишечника в связи с острой кишечной непроходимостью. Увеличение внутрибрюшных лимфатических узлов и наличие осумкованного скопления жидкости в виде туберкулезного перитонита обнаружили у двух пациентов, еще у одного больного диагностировали напряженный асцит и у одного — туберкулезный спондилит, осложненный псоас-абсцессом. Патологии в брюшной полости не выявлено у двух пациентов с ущемленной грыжей.

Всего выполнено 64 экстренных оперативных вмешательства у 36 пациентов, повторные операции понадобились 12 пациентам (табл. 2).

Наиболее часто проводили операции на органах брюшной полости. Всего оперировано восемь больных; им потребовалось 18 (28,2%) оперативных вмешательств. По поводу осложнений абдоминального туберкулеза оперировано пять пациентов: в четырех случаях специфичное поражение кишечника привело к перфорациям туберкулезных язв, в одном — к острой кишечной непроходимости, обусловленной стенозирующими туберкулезными язвами. Следует добавить, что клиническое течение абдоминальной хирургической патологии нередко принимает стертый и затяжной характер, а пациент начинает предъявлять жалобы при распространенном поражении, требующем этапного хирургического вмешательства. Все четыре пациента с перфорациями туберкулезных язв

кишечника были подвергнуты повторным оперативным вмешательствам. Операция по поводу острой кишечной непроходимости выполнена в один этап.

Два пациента с туберкулезом легких и новой коронавирусной инфекцией COVID-19 поступили в отделение с подозрением на острый аппендицит. Выполненная диагностическая лапароскопия позволила выявить у одного из них туберкулез внутрибрюшных лимфатических узлов, у другого — туберкулезный перитонит как следствие генерализации основного процесса. Интраоперационно обнаружены многочисленные просовидные высыпания на брюшине, петлях кишечника, печени и селезенке, увеличение внутрибрюшных лимфатических узлов, выпот в брюшной полости. В обоих случаях диагноз абдоминального туберкулеза подтвержден морфологически после биопсии внутрибрюшных лимфатических узлов и брюшины.

Операции на органах грудной клетки выполнены у 10 больных туберкулезом и COVID-19, из них пятерым потребовались повторные вмешательства. Дренажирование плевральной полости осуществлено всем 10 пациентам, в том числе шестерым — по поводу пневмоторакса и четверым — в связи с плевритом или эмпиемой плевры (см. рис.).

Установку бронхоблокатора при жесткой бронхоскопии и ИВЛ провели четверым больным. В двух случаях она была продиктована легочным кровотечением при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких и в двух — бронхоторакальным свищем, коллапсом легкого и отсутствием эффекта от активного дренирования плевральной

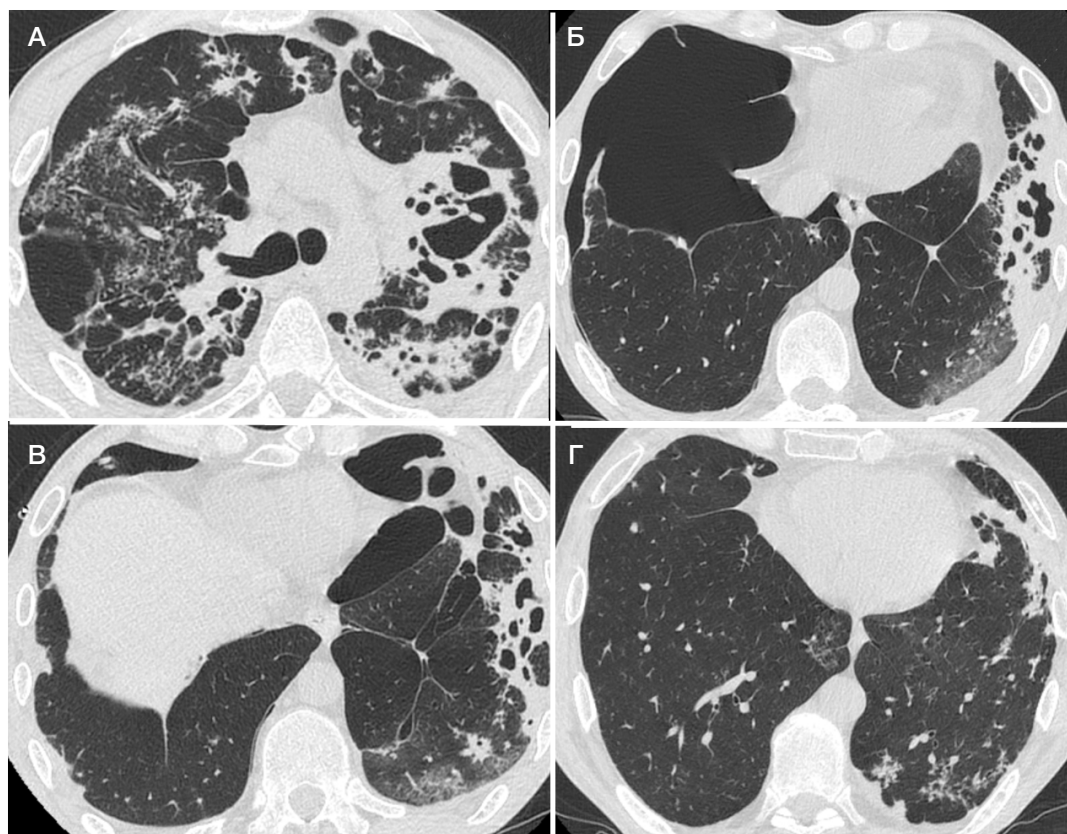


Рис. КТ-исследование ОГК. Динамика течения пневмоторакса. **А.** Дата проведения: 18.11.2020. В обоих легких определяются очагово-инфильтративные изменения с разновеликими полостями деструкции. **Б.** Дата проведения: 20.11.2020. Пневмоторакс справа. В S10 слева определяются участки «матового стекла» до 25%, КТ-1. **В.** Дата проведения: 22.11.2020. Дренаж правой плевральной полости, легкое практически расправлено. Пневмоторакс слева, в S10 слева заметно частичное рассасывание участков «матового стекла». **Г.** Дата проведения: 11.12.2020. Пневмоторакс не определяется, частичное рассасывание очагово-инфильтративных изменений легких

полости. Трахеостомия во всех семи случаях осуществлена в связи с необходимостью длительной ИВЛ у пациентов в отделение реанимации.

В послеоперационном периоде умерли восемь (22,2%) пациентов. Из них четверо с сочетанной COVID-19/туберкулез инфекцией из оперативных вмешательств перенесли только трахеостомию, потребовавшуюся при переводе пациентов с терминальной дыхательной недостаточностью на ИВЛ. У последних непосредственной причиной смерти явилась новая коронавирусная инфекция COVID-19 в сочетании с туберкулезом. Из них у двух пациентов диагностирован диссеминированный туберкулез легких и новая коронавирусная инфекция COVID-19 с объемом поражения легких КТ-3 и у двух — генерализованный туберкулез и новая коронавирусная инфекция COVID-19 с объемом поражения легких в одном случае КТ-1 и в другом КТ-3.

Двое пациентов скончались после неоднократных оперативных вмешательств по поводу осложнений абдоминального туберкулеза, перфораций туберкулезных язв кишечника, сопровождавшихся перитонитом. Один пациент, подвергнутый диагностической лапароскопии по поводу туберкулезного перитонита, умер от генерализованного туберкулеза. Один летальный исход наступил от декомпенсированного цирроза печени в сочетании с генерализованным туберкулезом, этому пациенту при жизни был выполнен лапароцентез по поводу напряженного асцита. У 50% умерших пациентов (четыре человека) диагностирована тройная инфекция COVID-19/ВИЧ/туберкулез, в том числе у двух в сочетании с гепатитом С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируя полученные данные, необходимо подчеркнуть особенности диагностики и лечения острой хирургической патологии у пациентов с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез. До пандемии COVID-19 при диагностике предпочтение отдавали экстренному выполнению УЗИ органов брюшной полости [15]. В условиях распространения новой коронавирусной инфекции необходимо уточнить не только объем поражения легких туберкулезом, но и быстро прогрессирующей в определенных случаях новой коронавирусной пневмонией [16]. По нашему мнению, одновременное выполнение КТ грудной клетки и брюшной полости пациентам с сочетанной инфекцией позволяет уточнить причину абдоминальной патологии и в некоторых случаях при стертой клинической картине — выявить потенциальную «катастрофу» в животе, что совпадает с мнением других исследователей [17, 18].

Отдельные авторы, наоборот, указывают на уменьшение частоты проведения КТ органов брюшной полости у пациентов с острой хирургической абдоминальной патологией в связи с перегруженностью кабинетов КТ и призывают чаще применять лапароскопию [19, 20]. Однако у этих пациентов нет туберкулеза, а общеизвестно, что КТ органов брюшной полости позволяет уточнить показания к лапароскопии, выявив свободный газ в брюшной полости или уровни жидкости в петлях кишечника, т. е. неинвазивным методом можно выявить осложнения абдоминального туберкулеза: перфорации туберкулезных язв кишечника или острую кишечную непроходимость. Поэтому мы являемся сторонниками выполнения КТ

органов брюшной полости при подозрении на острую хирургическую патологию у больных COVID-19/туберкулез. В наших наблюдениях всего двум пациентам, у которых КТ органов брюшной полости не внесло ясность в диагноз, выполнена диагностическая лапароскопия. Сама тактика хирургического лечения пациентов с осложнениями абдоминального туберкулеза изменений не претерпела [21, 22].

Туберкулез легких является частой причиной развития спонтанного пневмоторакса. При этом частота этого осложнения, по данным различных авторов, составляет 0,6–1,4% [23]. Механизм развития спонтанного пневмоторакса при туберкулезе заключается в разрыве каверны или буллы легкого с нарушением целостности висцеральной плеврой. Однако не всегда при туберкулезе спонтанный пневмоторакс является осложнением именно туберкулезного процесса, он может возникнуть при буллезной эмфиземе, на фоне которой развился туберкулез, и др. В последнее время появились работы, описывающие спонтанный пневмоторакс у пациентов с COVID-19 без туберкулеза легких и/или какой-либо другой патологии легких. Почти все они находились на ИВЛ, что не исключало возможность травмирования трахеи при интубации. Также отмечена очень высокая (72,7%) летальность среди таких пациентов [24–26]. Нами у шести пациентов в семи случаях пневмоторакса выполнено дренирование плевральной полости. У всех диагностирован активный туберкулез легких. Умер один из них, ранее неоднократно оперированный по поводу осложнений абдоминального туберкулеза и пневмоторакса.

Анализ структуры оперативных вмешательств в сравнении с аналогичным периодом (апрель–декабрь) предыдущего 2019 г. позволяет отметить, что характер экстренной хирургической патологии несколько изменился. Отмечено увеличение доли трахеостомий с 5,1% (12 из 234 экстренных оперативных вмешательств в 2019 г.) до 10,9%, что в первую очередь связано с необходимостью длительной ИВЛ у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Анализ послеоперационной летальности показывает, что у 50% больных основной причиной смерти, как в 2019 г., так и в 2020 г. явились осложнения абдоминального туберкулеза, а именно перфорации туберкулезных язв кишечника с развитием перитонита у пациентов с генерализованным туберкулезом. В проведенном многоцентровом когортном исследовании пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, подвергнутых экстренным оперативным вмешательствам, отмечен рост

послеоперационной летальности до 15,9%, в сравнении с пациентами без COVID-19 [27].

В наших наблюдениях достоверного роста послеоперационной летальности не отмечено — 16,5% в 2019 г. против 22,2% в 2020 г. ($\chi^2 = 0,46$; $p = 0,49$). Таким образом, можно заключить, что новая коронавирусная инфекция COVID-19 не внесла существенного вклада в увеличение послеоперационной летальности у больных туберкулезом. По данным литературы, больничная летальность от новой коронавирусной инфекции COVID-19 колеблется от 6 до 25% [28]. По нашим ранее опубликованным данным, больничная летальность у пациентов с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез составила 10,2%, а послеоперационная летальность у данной категории пациентов превышает этот показатель более чем в два раза — 22,2% [14].

Ограничениями данного исследования могут служить малый объем выборки, обусловленный специфичностью контингента пациентов, в частности наличие тройной инфекции COVID-19/ВИЧ/туберкулез, а также небольшая длительность катамнеза, возможно, не позволившая оценить отдаленные результаты экстренных оперативных вмешательств.

ВЫВОДЫ

Потребность в экстренной оперативной помощи в условиях многопрофильного специализированного туберкулезного стационара чаще возникает у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19 в сочетании с генерализованным туберкулезом (63,9%), реже — только с легочным туберкулезом (36,1%). В туберкулезном стационаре в период пандемии тройная инфекция COVID-19/ВИЧ/туберкулез была диагностирована почти у половины пациентов с острой хирургической патологией (44,4%). В структуре операций, которым были подвергнуты больные с сочетанной инфекцией COVID-19/туберкулез, доминировали вмешательства на органах брюшной полости (28,2%), реже — на органах грудной клетки (23,4%), еще реже — при гнойных заболеваниях мягких тканей (15,6%). Послеоперационная летальность была наиболее высока в группе больных, оперированных на органах брюшной полости, и достигала 50% при малом общем числе оперированных больных (восемь человек). Среди умерших в послеоперационном периоде у двоих пациентов (50%) были диагностированы две инфекции COVID-19/туберкулез, у двоих (50%) — сочетание четырех тяжелых инфекций: COVID-19/ВИЧ/туберкулез/гепатит.

Литература

1. Patrìti A, Baiocchi GL, Catena F, Marini P, Catarci M; FACS on behalf of the Associazione Chirurgi Ospedalieri Italiani (ACO). Emergency general surgery in Italy during the COVID-19 outbreak: first survey from the real life. *World J Emerg Surg.* 2020; 15 (1): 36. PubMed PMID: 32448333. DOI: 10.1186/s13017-020-00314-3.
2. De Simone B, Chouillard E, Di Saverio S, Pagani L, Sartelli M, Biffi WL et al. Emergency surgery during the COVID-19 pandemic: what you need to know for practice. *Ann R Coll Surg Engl.* 2020; 102 (5): 323–332. PubMed PMID: 32352836. DOI: 10.1308/rcsann.2020.0097.
3. Colosimo C, Kelly J, Coker J, Bhuller S, Ballman E, Baker-Sparret C, et al. Unscreened: Urgent and Emergent Surgical Outcomes in the Early COVID-19 Pandemic. *Cureus.* 2020; 12 (12): e11878. PubMed PMID: 33415031. DOI: 10.7759/cureus.11878.
4. Kruttsri C, Singhatas P, Sumpritpradit P, Thampongsa T, Phuwapraisrisan S, Gesprasert C, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the outcome, morbidity, and mortality of acute care surgery patients: A retrospective cohort study. *International Journal of Surgery Open.* 2021; (28): 50–55. DOI: 10.1016/j.ijso.2020.11.021.
5. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020; 26 (7): 1017–32. PubMed PMID: 32651579. DOI: 10.1038/s41591-020-0968-3.

6. Маев И. В., Шпектор А. В., Васильева Е. Ю., Манчуров В. Н., Андреев Д. Н. Новая коронавирусная инфекция COVID-19: экстрапульмональные проявления. *Терапевтический архив*. 2020; 92 (8): 4–11. DOI: 10.26442/00403660.2020.08.000767.
7. Ti LK, Ang LS, Foong TW, Ng BSW. What we do when a COVID-19 patient needs an operation: operating room preparation and guidance. *Can J Anaesth*. 2020; 67 (6): 756–58. PubMed PMID: 32144591. DOI: 10.1007/s12630-020-01617-4.
8. COVIDSurg Collaborative. Global guidance for surgical care during the COVID-19 pandemic. *Br J Surg*. 2020; 107 (9): 1097–03. PubMed PMID: 32293715. DOI: 10.1002/bjs.11646.
9. Welsh Surgical Research Initiative (WSRI) Collaborative. Recommended operating room practice during the COVID-19 pandemic: systematic review. *BJS Open*. 2020; 4 (5): 748–56. PubMed PMID: 32395909. DOI: 10.1002/bjs5.50304.
10. Готье С. В., Ревшвили А. Ш., Пушкарь Д. Ю., Адамян Л. В., Крылов В. В., Шелыгин Ю. А. и др. Методические рекомендации «Экстренная хирургическая помощь в условиях COVID-19». М., 2020; 14 с. Доступно по ссылке: <https://главный-хирург.рф/docs/metodrec/covid-19-recommendation.pdf> [Дата обращения 10 апреля 2021 г.]
11. Tadolini M, Codocasa LR, García-García JM, Blanc FX, Borisov S, Alfenaar JW, et al. Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 co-infection: first cohort of 49 cases. *Eur Respir J*. 2020; 56 (1): 2001398. PubMed PMID: 32457198. DOI: 10.1183/13993003.01398-2020.
12. Елькин А. В., Савина Т. А., Левина Л. Р., Ковалева Р. Г., Кондакова М. Н. Многопрофильный туберкулезный стационар города Санкт-Петербурга в период пандемии COVID-19. *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2020; (4): 10–15.
13. Gao Y, Liu M, Chen Y, Shi S, Geng J, Tian J. Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020; 10.1002/jmv.26311. PubMed PMID: 32687228. DOI: 10.1002/jmv.26311.
14. Зубань О. Н., Решетников М. Н., Устинов А. В. COVID-19 у больных туберкулезом: одноцентровое исследование. *Туберкулез и социально значимые заболевания*. 2020; (4): 58–63.
15. Плоткин Д. В., Лошкарева Е. О., Кириллова О. В., Решетников М. Н., Синицын М. В., Чаузов А. Ю. Эхо-сонографическая семиотика абдоминального туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких*. 2020; 98 (8): 32–38. DOI: 10.21292/2075-1230-2020-98-8-32-38.
16. Петриков С. С., Попугаев К. А., Бармина Т. Г., Забавская О. А., Шарифуллин Ф. А., Коков Л. С. Сопоставление клинических данных и компьютерно-томографической семиотики легких при COVID-19. *Туберкулез и болезни легких*. 2020; 98 (7): 14–25. DOI: 10.21292/2075-1230-2020-98-7-14-25.
17. Borofsky S, Taffel M, Khatri N, Zeman R, Hill M. The emergency room diagnosis of gastrointestinal tract perforation: the role of CT. *Emerg Radiol*. 2015; 22 (3): 315–27. PubMed PMID: 25417073. DOI: 10.1007/s10140-014-1283-4.
18. Deshpande SS, Joshi AR, Deshpande SS, Phajlani SA. Computed tomographic features of abdominal tuberculosis: unmask the impersonator! *Abdom Radiol (NY)*. 2019; 44 (1): 11–21. PubMed PMID: 30027495. DOI: 10.1007/s00261-018-1700-3.
19. Корольков А. Ю., Теплов В. М., Зайцев Д. А., Цибровская Е. А., Никитина Т. О. Оказание экстренной хирургической помощи в условиях многопрофильного стационара, перепрофилированного под лечение пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). *Вестник хирургии имени И. И. Грекова*. 2020; 179 (5): 11–15. DOI: 10.24884/0042-4625-2020-179-5-11-15.
20. Вечорко В. И., Аносов В. Д., Силаев Б. В. Диагностика и лечение острых хирургических заболеваний у пациентов с COVID-19. *Вестник РГМУ*. 2020; (3): 71–76. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.038.
21. Решетников М. Н., Скопин М. С., Синицын М. В., Плоткин Д. В., Зубань О. Н. Выбор хирургической тактики при перфоративных туберкулезных язвах кишечника у больных ВИЧ-инфекцией. *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 95 (9): 19–24. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-9-19-24.
22. Gerstein S, Khatri A, Roth N, Wallach F. Coronavirus disease 2019 and extra-pulmonary tuberculosis co-infection — A case report and review of literature. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2021; 22: 100213. PubMed PMID: 33521333. DOI: 10.1016/j.jctube.2021.100213.
23. Freixinet JL, Caminero JA, Marchena J, Rodríguez PM, Casimiro JA, Hussein M. Spontaneous pneumothorax and tuberculosis: long-term follow-up. *Eur Respir J*. 2011; 38 (1): 126–31. PubMed PMID: 20947681. DOI: 10.1183/09031936.00128910.
24. Михеев А. В., Афтаева Е. В., Казакова С. С., Зиновьева З. В., Гаврикова Н. В. Спонтанный пневмоторакс как осложнение поражения легких при COVID-19. *Туберкулез и болезни легких*. 2021; 99 (3): 18–22. DOI: 10.21292/2075-1230-2021-99-3-18-22.
25. Xu Y, Li S, Liu H. Clinical outcomes of pleural drainage on pneumothorax and hydrothorax in critically ill patients with COVID-19: A case series with literature review. *Heart & Lung*. 2020; 50 (2): 213–19. PubMed PMID: 33310504. DOI: 10.1016/j.hrtlung.2020.12.007.
26. Martinelli AW, Ingle T, Newman J, Nadeem I, Jackson K, Lane ND, et al. COVID-19 and pneumothorax: a multicentre retrospective case series. *Eur Respir J*. 2020; 56 (5): 2002697. PubMed PMID: 32907891. DOI: 10.1183/13993003.02697-2020.
27. Carrier FM, Amzallag É, Lecluyse V, Côté G, Couture ÉJ, D'Arçon F, et al. Postoperative outcomes in surgical COVID-19 patients: a multicenter cohort study. *BMC Anesthesiol*. 2021; 21 (1): 15. PubMed PMID: 33435887. DOI: 10.1186/s12871-021-01233-9.
28. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*. 2021; 93 (3): 1449–58. PubMed PMID: 32790106. DOI: 10.1002/jmv.26424.

References

1. Patriti A, Baiocchi GL, Catena F, Marini P, Catarci M; FACS on behalf of the Associazione Chirurghi Ospedalieri Italiani (ACOI). Emergency general surgery in Italy during the COVID-19 outbreak: first survey from the real life. *World J Emerg Surg*. 2020; 15 (1): 36. PubMed PMID: 32448333. DOI: 10.1186/s13017-020-00314-3.
2. De Simone B, Chouillard E, Di Saverio S, Pagani L, Sartelli M, Biffi WL et al. Emergency surgery during the COVID-19 pandemic: what you need to know for practice. *Ann R Coll Surg Engl*. 2020; 102 (5): 323–332. PubMed PMID: 32352836. DOI: 10.1308/rcsann.2020.0097.
3. Colosimo C, Kelly J, Coker J, Bhuller S, Ballman E, Baker-Sparret C, et al. Unscreened: Urgent and Emergent Surgical Outcomes in the Early COVID-19 Pandemic. *Cureus*. 2020; 12 (12): e11878. PubMed PMID: 33415031. DOI: 10.7759/cureus.11878.
4. Krutsri C, Singhatas P, Sumpritpradit P, Thampongsat T, Phuwapraisirisan S, Gesprasert C, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the outcome, morbidity, and mortality of acute care surgery patients: A retrospective cohort study. *International Journal of Surgery Open*. 2021; (28): 50–55. DOI: 10.1016/j.ijso.2020.11.021.
5. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. 2020; 26 (7): 1017–32. PubMed PMID: 32651579. DOI: 10.1038/s41591-020-0968-3.
6. Maev IV, Shpektor AV, Vasilyeva EY, Manchurov VN, Andreev DN Novel coronavirus infection COVID-19: extrapulmonary manifestations. *Ter Arkh*. 2020; 92 (8): 4–11. PubMed PMID: 33346454. DOI: 10.26442/00403660.2020.08.000767. Russian.
7. Ti LK, Ang LS, Foong TW, Ng BSW. What we do when a COVID-19 patient needs an operation: operating room preparation and

- guidance. *Can J Anaesth*. 2020; 67 (6): 756–58. PubMed PMID: 32144591. DOI: 10.1007/s12630-020-01617-4.
8. COVIDSurg Collaborative. Global guidance for surgical care during the COVID-19 pandemic. *Br J Surg*. 2020; 107 (9): 1097–03. PubMed PMID: 32293715. DOI: 10.1002/bjs.11646.
 9. Welsh Surgical Research Initiative (WSRI) Collaborative. Recommended operating room practice during the COVID-19 pandemic: systematic review. *BJS Open*. 2020; 4 (5): 748–56. PubMed PMID: 32395909. DOI: 10.1002/bjs.5.50304.
 10. Gote SV, Revishvili ASH, Pushkar DYU, Adamyan LV, Krylov VV, Shelygin YuA, i dr. Metodicheskie rekomendacii "Jekstrennaja hirurgicheskaja pomoshh' v uslovijah COVID-19". M., 2020. Available from: <https://главный-хирург.pdf/docs/metodrec/covid-19-recommendation.pdf> [Accessed Apr 10, 2021]. Russian.
 11. Tadolini M, Codecasa LR, García-García JM, Blanc FX, Borisov S, Alfenaar JW, et al. Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 co-infection: first cohort of 49 cases. *Eur Respir J*. 2020; 56 (1): 2001398. PubMed PMID: 32457198. DOI: 10.1183/13993003.01398-2020.
 12. Elkin AV, Savina TA, Levina LR, Kovaleva RG, Kondakova MN. Mnogoprofil'nyj tuberkuleznyj stacionar goroda Sankt-Peterburga v period pandemii COVID-19. Tuberkulez i social'no znachimye zabojevanija. 2020; (4): 10–15. Russian.
 13. Gao Y, Liu M, Chen Y, Shi S, Geng J, Tian J. Association between tuberculosis and COVID-19 severity and mortality: A rapid systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020; 10.1002/jmv.26311. PubMed PMID: 32687228. DOI: 10.1002/jmv.26311.
 14. Zuban ON, Reshetnikov MN, Ustinov AV. COVID-19 u bol'nyh tuberkulezom: odnocentrovoe issledovanie. Tuberkulez i social'no znachimye zabojevanija. 2020; (4): 58–63. Russian.
 15. Plotkin DV, Loshkareva EO, Kirillova OV, Reshetnikov MH, Sinicyn MV, Chazov AYU. Jeho-sonograficheskaja semiotika abdominal'nogo tuberkuleza. Tuberkulez i bolezni legkih. 2020; 98 (8): 32–38. DOI: 10.21292/2075-1230-2020-98-8-32-38. Russian.
 16. Petrikov SS, Popugaev KA, Barmina TG, Zabavskaja OA, Sharifullin FA, Kokov LS. Sopotavlenie klinicheskikh dannyh i komp'yuternotomograficheskoy semiotiki legkih pri COVID-19. Tuberkulez i bolezni legkih. 2020; 98 (7): 14–25. DOI: 10.21292/2075-1230-2020-98-7-14-25. Russian.
 17. Borofsky S, Taffel M, Khatri N, Zeman R, Hill M. The emergency room diagnosis of gastrointestinal tract perforation: the role of CT. *Emerg Radiol*. 2015; 22 (3): 315–27. PubMed PMID: 25417073. DOI: 10.1007/s10140-014-1283-4.
 18. Deshpande SS, Joshi AR, Deshpande SS, Phajlani SA. Computed tomographic features of abdominal tuberculosis: unmask the impersonator! *Abdom Radiol (NY)*. 2019; 44 (1): 11–21. PubMed PMID: 30027495. DOI: 10.1007/s00261-018-1700-3.
 19. Korolkov AYU, Teplov VM, Zajcev DA, Cebrovskaja EA, Nikitina TO. Okazanie jekstrennoj hirurgicheskoy pomoshhi v uslovijah mnogoprofil'nogo stacionara, pereprofilirovannogo pod lechenie pacientov s novoj koronavirusnoj infekciej (COVID-19). *Vestnik hirurgii imeni I. I. Grekova*. 2020; 179 (5): 11–15. DOI: 10.24884/0042-4625-2020-179-5-11-15. Russian.
 20. Vechorko VI, Anosov VD, Silaev BV. Diagnosis and treatment of acute surgical diseases in patients with COVID-19. *Bulletin of RSMU*. 2020; (3): 65–69. DOI: 10.24075/brsmu.2020.038.
 21. Reshetnikov MN, Skopin MS, Sinicyn MV, Plotkin DV, Zuban ON. Vybor hirurgicheskoy taktiki pri perforativnyh tuberkuleznyh jazvah kishhechnika u bol'nyh VICH-infekciej. Tuberkulez i bolezni legkih. 2017; 95 (9): 19–24. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-9-19-24. Russian.
 22. Gerstein S, Khatri A, Roth N, Wallach F. Coronavirus disease 2019 and extra-pulmonary tuberculosis co-infection — A case report and review of literature. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2021; 22: 100213. PubMed PMID: 33521333. DOI: 10.1016/j.jctube.2021.100213.
 23. Freixinet JL, Caminero JA, Marchena J, Rodríguez PM, Casimiro JA, Hussein M. Spontaneous pneumothorax and tuberculosis: long-term follow-up. *Eur Respir J*. 2011; 38 (1): 126–31. PubMed PMID: 20947681. DOI: 10.1183/09031936.00128910.
 24. Miheev AB, Aftaeva EV, Kazakova SS, Zinoveva ZV, Gavrikova NV. Spontannyj pnevmotoraks kak oslozhenie porazhenija legkih pri COVID-19. Tuberkulez i bolezni legkih. 2021; 99 (3): 18–22. DOI: 10.21292/2075-1230-2021-99-3-18-22. Russian.
 25. Xu Y, Li S, Liu H. Clinical outcomes of pleural drainage on pneumothorax and hydrothorax in critically ill patients with COVID-19: A case series with literature review. *Heart & Lung*. 2020; 50 (2): 213–19. PubMed PMID: 33310504. DOI: 10.1016/j.hrtlng.2020.12.007.
 26. Martinelli AW, Ingle T, Newman J, Nadeem I, Jackson K, Lane ND, et al. COVID-19 and pneumothorax: a multicentre retrospective case series. *Eur Respir J*. 2020; 56 (5): 2002697. PubMed PMID: 32907891. DOI: 10.1183/13993003.02697-2020.
 27. Carrier FM, Amzallag É, Lecluyse V, Côté G, Couture ÉJ, D'Aragnon F, et al. Postoperative outcomes in surgical COVID-19 patients: a multicenter cohort study. *BMC Anesthesiol*. 2021; 21 (1): 15. PubMed PMID: 33435887. DOI: 10.1186/s12871-021-01233-9.
 28. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*. 2021; 93 (3): 1449–58. PubMed PMID: 32790106. DOI: 10.1002/jmv.26424.

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СФИНГОЛИПИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ НА ФОНЕ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

А. А. Рогожина^{1,2}, А. В. Алесенко³, И. Н. Курочкин³, Л. О. Минушкина¹✉, У. А. Гутнер³, М. А. Шупик³, О. А. Малошицкая⁴, А. Т. Лебедев⁴, Д. А. Затеищikov^{1,2}

¹ Центральная государственная медицинская академия управления делами президента РФ, Москва, Россия

² Городская клиническая больница № 51, Москва, Россия

³ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля, Москва, Россия

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

Гиполипидемические препараты влияют на стандартные липопротеины, но как изменяются при лечении другие липиды плазмы — не известно. Целью работы было оценить динамику холестерина (ХС), липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛВП и ЛНП), триглицеридов (ТГ) и сфинголипидов у пациентов с преждевременно развившейся ишемической болезнью сердца, атеросклерозом и гиперхолестеринемией на фоне гиполипидемической терапии. В исследование включено 18 больных (средний возраст $53 \pm 6,7$ года): в 1-й группе 6 пациентов получили стартовые дозы статинов; во 2-ю группу вошли 6 пациентов, не достигших на фоне стартовой терапии статинами целевых уровней ЛНП и принимавших увеличенные дозы статинов; 7 пациентов 3-й группы не достигли целевых уровней ЛНП на фоне терапии максимально переносимыми дозами статинов и эзетимиба и получали алирокумаб. Исследование уровня сфинголипидов проводили методом масс-спектрометрии. В 1-й группе отмечено снижение уровня церамида Cer 14:1 ($p = 0,046$) и сфингомиелинов SM 22:1, SM 22:0, SM 24:0 ($p = 0,028$). Уровни общего ХС (ОХС), ХС ЛНП, ХС ЛВП и ТГ существенно не изменились. Во 2-й группе отмечено достоверное снижение уровня ОХС ($p = 0,028$), ЛНП ($p = 0,043$), сфингомиелинов SM 18:1, SM 24:1 и SM 26:1, церамида Cer 16:1 ($p = 0,028$). Cer 22:1 достоверно увеличился ($p = 0,028$). В 3-й группе ОХС снизился на 36,2%, ХС ЛНП ($p = 0,018$) — на 60,1% от исходных значений (Δ ХС ЛНП = $-2,67 \pm 3,12$), выявлено повышение уровня церамида Cer 22:1 ($p = 0,028$). Показано, что снижение содержания сфингомиелинов происходит на фоне терапии статинами и коррелирует со снижением уровня ХС ЛНП. Значимой динамики церамидов и церамидного риска на фоне терапии статинами не зарегистрировано, однако при добавлении к терапии ингибитора PCSK9 произошло уменьшение соотношения Cer 16:0/24:0.

Ключевые слова: атеросклероз, сфингомиелины, сфингозин, церамиды, гиполипидемическая терапия

Финансирование: грант РФФИ 19-04-00870А «Сфинголипидный анализ маркеров сердечно-сосудистых заболеваний».

Вклад авторов: А. А. Рогожина — отбор материала, сбор данных; А. В. Алесенко — руководитель проекта; И. Н. Курочкин — анализ данных; Л. О. Минушкина — анализ данных, написание статьи; У. А. Гутнер, М. А. Шупик, О. А. Малошицкая — пробоподготовка, проведение лабораторных исследований, анализ данных; А. Т. Лебедев, Д. А. Затеищikov — планирование работы, анализ данных, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Городской клинической больницы № 51 г. Москва (протокол № 02/19 от 7 февраля 2019 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Лариса Олеговна Минушкина
ул. М. Тимошенко, д. 19, стр. 1А, г. Москва, 121359; minushkina@mail.ru

Статья получена: 24.05.2021 **Статья принята к печати:** 13.06.2021 **Опубликована онлайн:** 23.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.030

CHANGES IN PLASMA SPHINGOLIPID LEVELS AGAINST THE BACKGROUND OF LIPID-LOWERING THERAPY IN PATIENTS WITH PREMATURE ATHEROSCLEROSIS

Rogozhina AA^{1,2}, Alessenko AV³, Kurochkin IN³, Minushkina LO¹✉, Gutner UA³, Shupik MA³, Maloshitskaya OA⁴, Lebedev AT⁴, Zateyshchikov DA^{1,2}

¹ Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russia

² City Clinical Hospital № 51, Moscow, Russia

³ Institute of Biochemical Physics named after N. M. Emanuel, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Lipid-lowering drugs affect standard lipoproteins. However, we have no knowledge of changes in other plasma lipids upon treatment. The study was aimed to assess the dynamic changes in cholesterol, high- and low-density lipoproteins (HDL and LDL), triglycerides, and sphingolipids against the background of lipid-lowering therapy in patients with premature coronary artery disease, atherosclerosis and hypercholesterolemia. A total of 18 patients were enrolled (the average age was 53 ± 6.7 years): in group 1, six patients received starting statin doses; group 2 included six patients, who failed to achieve LDL target levels against the background of treatment with starting statin doses, and received escalated statin doses; seven patients in group 3 failed to achieve LDL target levels against the background of treatment with maximum tolerated doses of statins and ezetimibe, and received alirocumab. Sphingolipid levels were assessed by mass spectrometry. In group 1, the decreased levels of ceramide Cer 14:1 ($p = 0,046$) and sphingomyelins SM 22:1, SM 22:0, SM 24:0 ($p = 0,028$) were observed. There were no significant changes in the levels of total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and triglycerides. In group 2, the significantly decreased levels of total cholesterol ($p = 0,028$), LDL ($p = 0,043$), sphingomyelins SM 18:1, SM 24:1 and SM 26:1, and ceramide Cer 16:1 ($p = 0,028$) were observed. The level of Cer 22:1 significantly increased ($p = 0,028$). In group 3, total cholesterol decreased by 36.2%, and LDL-C ($p = 0,018$) decreased by 60.1% compared to baseline (Δ LDL-C = -2.67 ± 3.12); the elevated levels of ceramide Cer 22:1 ($p = 0,028$) were observed. It has been shown, that decreased sphingomyelin levels are associated with statin therapy and correlate with decreased levels of LDL-C. No significant dynamic changes in ceramides and ceramide risk against the background of statin therapy were observed, however, PCSK9 inhibitor added to therapy reduced the Cer 16:0/24:0 ratio.

Keywords: atherosclerosis, sphingomyelins, sphingosine, ceramides, lipid-lowering therapy

Funding: RFBR grant 19-04-00870A, Sphingolipidome Analysis of Cardiovascular Disease Markers.

Author contribution: Rogozhina AA — sampling, data acquisition; Alessenko AV — project management; Kurochkin IN — data analysis; Minushkina LO — data analysis, manuscript writing; Gutner UA, Shupik MA, Maloshitskaya OA — sample preparation, laboratory tests, data analysis; Lebedev AT, Zateyshchikov DA — study planning, data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of City Clinical Hospital № 51, Moscow (protocol № 02/19 dated February 7, 2019). Informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Larisa O. Minushkina
Marshala Timoshenko, 19, str. 1A, Moscow, 121359; minushkina@mail.ru

Received: 24.05.2021 **Accepted:** 13.06.2021 **Published online:** 23.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.030

В связи с ростом инвалидизации и смертности среди молодых пациентов от ишемической болезни сердца (ИБС) [1], а также появлением новых методик диагностики более глубокое изучение факторов риска, методов профилактики и развития осложнений «ранней» ИБС, т. е. дебютировавшей в возрасте до 55 лет у мужчин и до 60 лет у женщин [2], приобретает все большую актуальность.

Наиболее значимым фактором риска развития атеросклероза является дислипидемия и, прежде всего, повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП). Оно напрямую ассоциировано с повышением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [3], гиперхолестеринемия более 4,9 ммоль/л шестикратно увеличивает риск развития ИБС [4].

В связи с развитием масс-спектрометрических методов, все чаще стали определять новые лабораторные параметры в качестве дополнительных маркеров сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС, в том числе и сфинголипиды.

Сфинголипиды содержат в своем составе молекулу алифатического спирта сфингозина. Установлено, что катаболизм сфинголипидов связан с катаболизмом холестерина [5]. Содержание холестерина в мембране четко коррелирует с содержанием сфинголипидов (церамидов, сфингозинов и сфингозин-1-фосфата). Сфингомиелины входят в состав клеточных мембран миелиновой оболочки, а также выявляются в атеросклеротической бляшке [6], а церамиды играют роль в пролиферации, апоптозе и воспалении при атеросклерозе [7]. В настоящее время появились данные о том, что уровень церамидов и прежде всего Cer16:0 коррелирует в риском осложнений атеросклероза. Эти данные послужили основой для расчета специфического показателя церамидного риска (ceramide risk score — CRS) [8].

Всем пациентам, относящимся к категориям высокого и очень высокого риска атеросклероза, показано назначение высокоинтенсивной гиполипидемической терапии с целью коррекции дислипидемии и снижения риска прогрессирования атеросклероза.

Целью исследования было оценить динамику стандартных липидных показателей и сфинголипидов у пациентов с преждевременно развившейся ИБС, атеросклерозом и гиперхолестеринемией на фоне гиполипидемической терапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Городской клинической больницы № 51 г. Москвы в 2019–2020 гг. В него вошли 18 пациентов (4 женщины и 14 мужчин) в возрасте $53 \pm 6,7$ года (от 35 до 65 лет), имеющих показания для интенсивной гиполипидемической терапии. Критерии включения пациентов в исследование: клиническая манифестация ИБС или периферического атеросклероза у мужчин в возрасте до 55 лет, у женщин — до 60 лет или наличие гиперлипидемии (ХС ЛНП выше 4,9 ммоль/л). Критерии исключения: отсутствие подписанного добровольного информированного согласия. 15 пациентов ранее перенесли острый инфаркт миокарда со стентированием коронарных артерий, 2 из них имели многососудистое поражение и перенесли аортокоронарное шунтирование (АКШ), у остальных был выявлен атеросклероз периферических артерий или дислипидемия. Среди всех пациентов 16 (36,4%) страдали гипертонической болезнью, 3 (6,8%) — сахарным диабетом, 11 (25%) — курили на момент включения и 4 (9,1%) курили ранее.

Все пациенты были разделены на три группы в зависимости от приема гиполипидемической терапии на момент включения (см. рис.). Динамику липидов крови во всех группах оценивали до начала терапии и через 4–8 недель после начала лечения. Эффективность стартовой терапии статинами была проанализирована в группе 1 ($n = 6$). Все пациенты этой группы до момента включения не принимали гиполипидемические препараты, как минимум за три месяца до включения в исследование по причине самостоятельной отмены.

Все пациенты группы 2 ($n = 6$) имели в анамнезе инфаркт миокарда, перенесенный в молодом возрасте (средний возраст $54,5 \pm 1,87$ лет). На момент включения пациенты уже принимали гиполипидемические препараты, назначенные лечащими врачами вне рамок исследования, однако не достигали целевых значений ХС ЛНП ($<1,4$ ммоль/л). Пять человек принимали аторвастатин в дозе 20–40 мг, один — розувастатин 10 мг. Всем больным была проведена коррекция гиполипидемической терапии и увеличена дозировка препаратов.

Отдельно были проанализированы все пациенты, принимавшие статины (группы 1 и 2) ($n = 12$).

Группа 3 ($n = 7$) включала 5 мужчин и 2 женщины (среднего возраста $52,29 \pm 9,1$ лет; одна пациентка перешла в группу 3, закончив исследование по протоколу в группе 2). Пятеро пациентов имели в анамнезе инфаркт миокарда. Все принимали гиполипидемические препараты (аторвастатин 40–80 мг 1 р/д или розувастатин 40 мг 1 р/д в комбинации с эзетемибом 10 мг 1 р/д или, в связи с непереносимостью статинов или наличием противопоказаний, только эзетемиб 10 мг 1 р/д). На фоне этой терапии все пациенты имели ХС ЛНП выше 1,7 ммоль/л на момент включения в исследование. Всем больным в соответствии с протоколом исследования был назначен алирокумаб 150 мг 1 р/2 недели. Также в группу 3 были включены двое пациентов с вероятным или установленным диагнозом семейной гиперхолестеринемии, определенной по шкале голландских липидных клиник. Один из них не мог получать статины в связи с наличием сопутствующей патологии гепатобилиарной системы (хронический панкреатит, вирусный гепатит С) и повышением уровня трансаминаз, у второй пациентки со стабильной ИБС не было достигнуто целевых значений ЛНП на фоне максимально переносимой дозы статинов.

Взятие крови для биохимического и масс-спектрометрического анализа осуществляли в день включения пациентов в исследование (утром натощак, после 12-часового голодания) и через 4–8 недель терапии из кубитальной вены в стерильные пробирки типа «вакутейнер». Сыворотку получали путем центрифугирования крови на скорости 3000 об./мин в течение 15 мин. Для определения параметров сыворотки использовали биохимический анализатор CLIMA MC-15 (RAL; Испания). Референсными принимали значения: ОХС — 2,0–5,2 ммоль/л; ХС ЛНП — до 3,3 ммоль/л; ХС ЛВП — 0,91–1,56 ммоль/л; ТГ сыворотки крови — 0,50–1,70 ммоль/л.

Измерение содержания сфинголипидов в плазме крови

Сфинголипиды определяли в плазме крови указанных пациентов. При пробоподготовке кровь центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин, отбирали 1,5 мл супернатанта. Далее 1,5 мл супернатанта центрифугировали 10 мин при 15 000 об./мин для полного осаждения клеток. Для масс-

спектрометрического анализа липиды выделяли из плазмы по методу Блайя–Дайера [9].

Масс-спектрометрическое детектирование различных молекулярных видов сфингомиелинов, церамидов и сфингоидных оснований (сфингозина и сфинганина) проводили с помощью масс-спектрометра TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific; Германия) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) при давлении в ячейке соударений 2,0 мТорр. Разрешение на Q1 и Q3 составляло 1,2 Да. Для церамидов фрагментацию исходных протонированных и дегидратированных молекул проводили при энергии 20 эВ до иона с отношением массы к заряду (m/z) 264,2 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфингомиелинов фрагментацию исходных протонированных молекул проводили при энергии 20 эВ до иона с m/z 184,1 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфингозина и его дейтерированного стандарта (d7, Avanti; США) фрагментацию протонированных молекул проводили при энергии 12,5 эВ до ионов с m/z 259,3 и 252,3 Да соответственно, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфинганина фрагментацию исходной протонированной молекулы проводили при энергии 12,5 эВ до иона с m/z 266,3 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Использовали следующие параметры источника ионизации: температура нагревателя — 300 °С, температура капилляра — 340 °С, поток газа завесы — 45 п.е. (приборных единиц), поток вспомогательного газа — 13 п.е., поток продувочного газа — 1 п.е. В качестве стандартов использовали сфингозин d7, сфинганин, сфингомиелин d18:1/16:0, сфингомиелин d18:1/18:0, церамид d18:1/16:0, церамид d18:1/18:1, церамид d18:1/18:0, церамид d18:1/24:1, церамид d18:1/24:0 (Avanti; США). Хроматографическое разделение проводили с использованием системы Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific; Германия) на колонке Eclipse Plus C8 3,0 × 150 мм (Agilent; США), размер частиц 3,5 мкм. Температура составляла 50 °С, поток — 400 мкл/мин. При определении сфингозина, церамидов и сфингомиелина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А — вода + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б — метанол + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты

(0,7 мин 55% фазы Б, 100% фазы Б к 7-й мин, 100% фазы Б до 12-й мин, 55% фазы Б от 13-й до 17-й мин, 55% фазы Б к 13-й мин). При определении сфинганина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А — вода + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б — 50% метанол + 50% ацетонитрил + 0,1% (по объему) муравьиной кислоты (1,5 мин 20% фазы Б, 100% фазы Б к 2-й мин, 100% фазы Б до 7-й мин, 20% фазы Б к 7 мин, 20% фазы Б до 10-й мин). Относительное содержание церамидов оценивали по внешней калибровке (метод стандарта). В качестве стандарта использовали смесь церамидов Ceramide Porcine Brain 860052P (Avanti; США) с содержанием церамида d18:1/18:0 (50%) и d18:1/24:1 (20%). Вычисления проводили по площадям пиков ММР-переходов $MH^+ \rightarrow m/z$ 264,4 Да и $(M+H-H_2O)^+ \rightarrow m/z$ 264,4 Да. Содержание сфингозина d18:1 определяли по внутренней калибровке (метод внутреннего стандарта, стандарт D-erythro-sphingosine d7, Sigma; США) по площадям ММР-переходов (m/z 300+ $\rightarrow m/z$ 252,3 Да для недейтерированного и m/z 307+ $\rightarrow m/z$ 259,3 Да для дейтерированного сфингозина). Содержание сфинганина d18:0 определяли по внешней калибровке (стандарт — DL-erythro-dihydrosphingosine, Sigma; США) по площадям ММР-переходов m/z 302+ $\rightarrow m/z$ 266,3 Да.

CRS, описанный как прогностический маркер смертности от ИБС, рассчитывали по шкале, описанной ранее с использованием определенных молекулярных видов церамидов [8]. Для оценки церамидного риска были рассчитаны соотношения Cer16:0/Cer24:0, Cer18:0/Cer24:0, Cer24:1/Cer24:0. Уровни Cer16:0, Cer18:0, Cer24:1 и значения, полученные для соотношения этих церамидов к Cer24:0, были разделены на квартили. Больные, относящиеся к третьему квартилю, по каждому из шести параметров получали 1 балл, к четвертому квартилю — 2 балла. Сумму баллов считали значением церамидного риска.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ SPSS версия 21.0. (An IBM Company; США). Количественные переменные

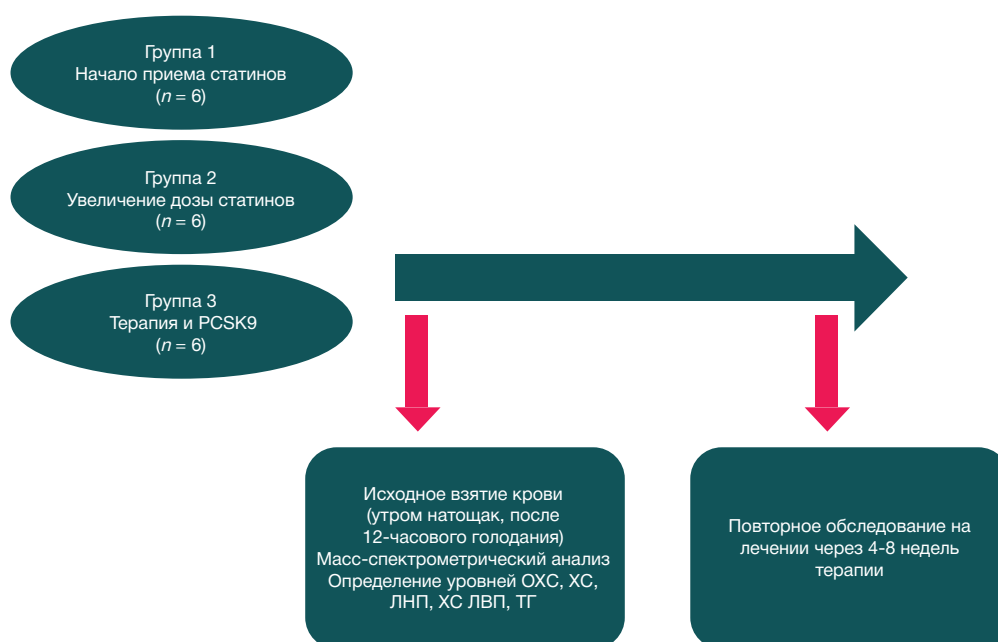


Рисунок. Протокол исследования

Таблица 1. Динамика уровней липидов в исследуемых группах

Показатели		Группа 1 (n = 6)		Группа 2 (n = 6)		Все больные, принимавшие статины (группы 1 и 2) (n = 12)		Группа 3 (n = 7)	
		M ± SD	p	M ± SD	p	M ± SD	p	M ± SD	p
Стандартные липидные показатели (ммоль/л)									
ОХС	до	7,42 ± 2,39	0,249	4,75 ± 1,46	0,028*	6,09 ± 2,35	0,028*	7,51 ± 5,36	0,063
	после	5,83 ± 1,38		4,31 ± 1,36		5,07±1,53	4,79 ± 1,49		
ХС ЛНП	до	4,98 ± 2,45	0,116	3,07 ± 1,29	0,043*	4,03 ± 2,12	0,021*	4,44 ± 2,87	0,018*
	после	3,42 ± 0,83		2,57 ± 1,22		2,99 ± 1,09	1,77 ± 1,46		
ХС ЛВП	до	1,09 ± 0,16	0,528	1,01 ± 0,32	0,686	1,05 ± 0,25	0,755	1,12 ± 0,39	0,176
	после	1,18 ± 0,33		0,98± 0,23		1,08 ± 0,29	1,51 ± 1,08		
ТГ	до	2,93 ± 1,77	0,463	1,5± 0,34	0,463	2,22 ± 1,43	0,814	3,4 ± 4,34	0,753
	после	2,69 ± 2,20		1,65±0,59		2,17 ± 1,63	4,85 ± 8,2		
ЦЕРАМИДЫ (нг/мл)									
Cer 14:1	до	0,96 ± 0,16	0,046*	0,71 ± 0,09	0,463	0,83 ± 0,18	0,158	0,39 ± 0,42	0,612
	после	0,7 ± 0,11		0,76 ± 0,09		0,73 ± 0,1	0,49 ± 0,4		
Cer 14:0	до	38,52 ± 18,73	0,463	22,93 ± 8,55	0,345	30,72 ± 16,09	1	20,29 ± 12,3	0,866
	после	33,61 ± 9,85		23,81 ± 6,93		28,71 ± 9,6	22,3 ± 5,42		
Cer 16:1	до	9,10 ± 2,26	0,173	11,32 ± 1,90	0,028*	10,21 ± 2,31	0,937	7,17 ± 3,35	0,612
	после	13,26 ± 6,34		9,62 ± 2,18		11,44 ± 4,91	7,09 ± 2,96		
Cer 16:0	до	470,34 ± 221,52	0,6	222,07 ± 23,74	0,753	346,2 ± 198,42	0,583	370,49 ± 353,84	0,612
	после	438,73 ± 145,74		222,27 ± 55,34		330,5 ± 154,36	338,64 ± 240,77		
Cer 18:1	до	2,01 ± 0,98	0,6	2,48 ± 0,46	0,6	2,24 ± 0,77	0,48	1,7 ± 0,74	0,176
	после	2,37 ± 0,49		2,60 ± 0,71		2,48 ± 0,6	2,01 ± 0,64		
Cer 18:0	до	45,10 ± 31,72	0,463	40,67 ± 7,68	0,463	42,89 ± 22,13	0,754	34,78 ± 11,13	1
	после	46,63 ± 18,84		38,31 ± 7,83		42,47 ± 14,43	33,36 ± 9,92		
Cer 20:1	до	0,66 ± 0,12	0,345	0,64 ± 0,12	0,463	0,65 ± 0,11	0,388	0,46 ± 0,5	0,499
	после	0,7 ± 0,8		0,71 ± 0,16		0,71 ± 0,12	0,59 ± 0,2		
Cer 20:0	до	71,84 ± 36,27	0,917	81,88 ± 23,78	0,917	76,86 ± 29,71	1	61,72 ± 31,72	0,237
	после	72,3 ± 18,41		78,59 ± 17,31		75,45 ± 17,35	81,18 ± 50,40		
Cer 22:1	до	5,44 ± 3,96	0,753	4,08 ± 1,10	0,028*	4,76 ± 2,86	0,182	3,47 ± 2,34	0,028*
	после	4,73 ± 1,04		5,62 ± 0,81		5,18 ± 1	6,20 ± 5,03		
Cer 22:0	до	1948,4 ± 1113,75	0,753	1254,62 ± 181,13	0,345	1601,51 ± 842,63	0,695	979,11 ± 715,92	0,499
	после	1821,5 ± 765,99		1358,95 ± 299,06		1590,22 ± 604,74	1336,47 ± 743,56		
Cer 24:1	до	578,1 ± 147,68	0,249	537,41 ± 77,21	0,753	557,76 ± 114,34	0,308	585,77 ± 362,55	0,612
	после	632,9 ± 179,15		541,90 ± 122,05		587,4 ± 153,68	538,53 ± 299,16		
Cer 24:0	до	2083,59 ± 1180,12	0,345	1451,87 ± 143,86	0,917	1767,73 ± 866,77	0,48	1205,09 ± 719,65	0,176
	после	1896,72 ± 833,38		1490,96 ± 245,89		1693,84 ± 622,96	1777,98 ± 1078,81		
Cer 26:1	до	12,50 ± 8,24	0,116	13,10 ± 8,14	0,6	12,80 ± 7,82	0,388	11,36 ± 7,62	0,398
	после	16,35 ± 8,14		11,30 ± 4,55		13,83 ± 6,82	15,19 ± 11,41		
Cer 26:0	до	49,67 ± 7,68	0,917	45,48 ± 3,33	0,917	47,57 ± 6,05	1	28,75 ± 14,25	0,31
	после	50,28 ± 5,59		45,40 ± 5,72		47,84 ± 5,96	37,56 ± 6,61		
Cer 16:0/24:0	до	0,24 ± 0,12	0,753	0,15 ± 0,02	0,6	0,2 ± 0,1	0,875	0,29 ± 0,09	0,043*
	после	0,24 ± 0,86		0,15 ± 0,03		0,2 ± 0,08	0,19 ± 0,04		
Cer 18:0/24:0	до	0,028 ± 0,027	0,345	0,03 ± 0,01	0,6	0,03 ± 0,02	0,814	0,04 ± 0,02	0,128
	после	0,03 ± 0,01		0,03 ± 0,01		0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01		
Cer 24:1/24:0	до	0,33 ± 0,16	0,249	0,37 ± 0,03	0,917	0,35 ± 0,11	0,347	0,58 ± 0,28	0,063
	после	0,37 ± 0,17		0,37 ± 0,08		0,37 ± 0,13	0,33 ± 0,11		
Ceramide risk score	до	4,83 ± 3,71	0,336	2,67 ± 2,07	0,593	3,75 ± 3,08	0,231	5,57 ± 2,44	0,233
	после	5,83 ± 4,17		3,33 ± 2,73		4,58 ± 3,60	4,0 ± 2,58		
СФИНГОМИЕЛИНЫ (нг/мл)									
SM 14:1	до	1243,79 ± 579,25	0,345	1076,05 ± 456,93	0,345	1159,92±505,07	0,158	578,70 ± 721,70	0,866
	после	1107,35 ± 539,53		969,59 ± 329,81		1038,47 ± 432,36	655,45 ± 463,86		
SM 14:0	до	15560,92 ± 7789,49	0,249	10218,99 ± 4643,12	0,753	12889,95 ± 6720,27	0,308	5379,57 ± 6666,57	0,866
	после	13293,42 ± 4925,96		9803,30 ± 3771,31		11548,36 ± 4562,52	6516,82 ± 4797,92		
SM 16:1	до	27147,34 ±9245,24	0,345	14994,30 ± 4552,79	0,463	21070,82 ± 9410,35	0,209	9288,60 ± 11795,93	0,866
	после	24289,12 ± 8455,16		14567,22 ± 4838,38		19428,17 ± 8301,39	12154,21 ± 9026,99		

Таблица 1 (продолжение).

SM 16:0	до	68884,57 ± 29300,16	0,6	43109,35 ± 5476,51	0,249	55996,96 ± 24187,79	0,53	29457,23 ± 26795,25	0,612
	после	58719,28 ± 18464,01		41511,66 ± 8959,72		50115,47 ± 16498,73		42283,32 ± 25753,31	
SM 18:1	до	4998,28 ± 2970,69	0,917	4138,09 ± 957,21	0,028*	4568,18 ± 2151,66	0,182	3513,39 ± 2645,09	0,612
	после	4254,22 ± 2140,22		3786,43 ± 1074,09		4020,32 ± 1632,83		3483,78 ± 1193,06	
SM 18:0	до	18597,76 ± 10587,79	0,345	14163,76 ± 1608,14	0,116	16380,76 ± 7582,39	0,071	8957,79 ± 7701,24	0,612
	после	15006,64 ± 5504,22		12963,34 ± 2468,85		13984,99 ± 4204,79		10214,96 ± 5423,62	
SM 20:1	до	19571,11 ± 9063,27	0,463	34801,84 ± 6713,68	0,249	27186,47 ± 11004,16	0,182	19003,09 ± 7981,50	0,499
	после	15399,44 ± 4090,53		33308,30 ± 7232,94		24353,87 ± 10902,14		21255,95 ± 11508,78	
SM 20:0	до	122191,42 ± 61041,05	0,463	107398,59 ± 12787,35	0,463	114795,00 ± 42750,99	0,239	83678,97 ± 38585,26	0,31
	после	95985,48 ± 23943,68		104156,92 ± 15085,34		100071,20 ± 19550,99		108695,09 ± 50687,07	
SM 22:1	до	32751,55 ± 7675,39	0,028*	37536,42 ± 11536,91	0,046*	35143,98 ± 9670,69	0,004*	14233,44 ± 15712,63	0,866
	после	27480,53 ± 7931,12		33221,35 ± 10422,30		30350,94 ± 9324,97		18164,23 ± 11614,33	
SM 22:0	до	49975,11 ± 7453,47	0,028*	50443,83 ± 11076,52	0,753	50209,47 ± 9004,42	0,071	17147,95 ± 18892,94	1
	после	39664,55 ± 10888,20		49134,09 ± 16770,24		44399,32 ± 14358,99		25262,43 ± 16913,88	
SM 24:1	до	86437,81 ± 20948,28	0,173	87494,43 ± 21994,99	0,028*	86966,12 ± 20485,92	0,012*	31116,71 ± 31595,14	1
	после	80493,43 ± 14190,94		76736,87 ± 22166,55		78615,15 ± 17853,01		43885,51 ± 28272,08	
SM 24:0	до	44680,38 ± 11292,01	0,028*	41334,09 ± 7361,87	0,463	43007,24 ± 9254,61	0,028*	11042,64 ± 12530,05	0,735
	после	33338,06 ± 6060,00		38593,57 ± 12040,46		35965,82 ± 9493,26		15850,33 ± 10223,83	
SM 26:1	до	992,02 ± 541,84	0,116	944,03 ± 417,87	0,028*	968,02 ± 462,01	0,010*	248,38 ± 269,04	0,499
	после	769,60 ± 301,79		752,44 ± 269,19		761,02 ± 272,79		398,84±285,35	
СФИНГОИДНЫЕ ОСНОВАНИЯ (нг/мл)									
SPN	до	5,26 ± 6,71	0,345	3,18 ± 1,59	0,753	4,22 ± 4,77	0,433	2,30 ± 1,21	0,735
	после	3,20 ± 0,92		3,28 ± 1,14		3,24 ± 0,99		2,47 ± 1,50	
SPH	до	13,32 ± 17,58	0,463	9,39 ± 4,25	0,753	11,35 ± 12,36	0,388	7,00 ± 2,98	0,237
	после	10,85 ± 5,28		9,85 ± 4,61		10,35 ± 4,75		8,27 ± 4,78	
S1P	до	17,28 ± 5,13	0,753	19,32 ± 2,88	0,116	18,30 ± 4,11	0,433	14,57 ± 2,75	0,31
	после	16,84 ± 2,01		17,54 ± 1,50		17,19 ± 1,73		16,18 ± 3,61	

Примечание: SPN — сфингазин, SPH — сфингонин, S1P — сфингазин-1-фосфат.

представлены в виде средних величин и стандартных отклонений от среднего ($M \pm SD$). Для всех количественных переменных выполняли проверку на соответствие нормальному распределению с использованием теста Шапиро–Уилка. Распределение всех количественных переменных отличалось от нормального. Для сравнения зависимых совокупностей использовали критерий Уилкоксона. Статистическую значимость различий оценивали для двух независимых выборок по критерию Манна–Уитни. Значимость корреляций оценивали по критерию Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменение уровня ХС и сфинголипидов оценивали в группах пациентов, на этапах инициации или коррекции гиполипидемической терапии (статины или алирокумаб) (табл. 1).

В 1-й группе пациентов было отмечено достоверное снижение уровня короткоцепочечных церамидов Cer 14:1 ($p = 0,046$). У всех пациентов этой группы достоверно снижались длинноцепочечные сфингомиелины SM 22:1, SM 22:0, SM 24:0 ($p = 0,028$) на фоне начала гиполипидемической терапии.

Во 2-й группе на фоне увеличения дозировки статина было отмечено достоверное снижение уровня ОХС ($p = 0,028$), ХС ЛНП ($p = 0,043$), а также длинноцепочечных сфингомиелинов SM18:1, SM 24:1 и SM 26:1, церамида Cer 16:1 ($p = 0,028$), и SM 22:1 ($p = 0,046$). Cer 22:1 достоверно увеличивался ($p = 0,028$).

После коррекции гиполипидемической терапии у всех пациентов выявлено снижение уровня ХС на 9,5% ($\Delta\text{ХС} = -0,45 \pm 0,40$), а ХС ЛНП на 16,2% ($\Delta\text{ХС ЛНП} = -0,50 \pm 0,44$). Целевые значения ХС ЛНП были достигнуты только у одного пациента, остальным были даны рекомендации по коррекции образа жизни и повышены дозировки гиполипидемического препарата или добавлен второй препарат эзетимиб 10 мг 1 р/день. У одной пациентки сохранялись значения ХС ЛНП $\geq 2,6$ ммоль/л на фоне двойной гиполипидемической терапии (максимально переносимые дозы статинов аторвастатина — 80 мг и эзетимиба — 10 мг), ей была назначена терапия алирокумабом.

При анализе данных всех больных, принимавших статины, отмечено достоверное снижение ХС ($p = 0,028$), ХС ЛНП ($p = 0,021$) и длинноцепочечных сфингомиелинов SM 24:1 ($p = 0,012$), SM 24:0 ($p = 0,028$), SM 26:1 ($p = 0,010$), SM 22:1 ($p = 0,004$).

В 3-й группе на фоне терапии алирокумабом уровень ОХС снизился на 36,2% ($\Delta\text{ОХС} = -2,72 \pm 4,48$), уровень ХС ЛНП ($p = 0,018$) — на 60,1% от исходных значений ($\Delta\text{ХС ЛНП} = -2,67 \pm 3,12$).

Из всех определенных соотношений церамидов (Cer 16:0/24:0, 18:0/24:0, 24:1/24:0) только соотношение Cer 16:0/24:0 достоверно снижалось в группе алирокумаба ($p = 0,043$). Показатель церамидного риска существенно не изменялся ни в одной из групп.

Сравнение динамики уровней сфинголипидов было проведено между пациентами, впервые начавшими терапию и на фоне усиления дозировки статинов (группы 1 и 2), а также в каждой из групп с пациентами на алирокумабе (группа 3) (табл. 2).

Таблица 2. Динамика показателей липидома в исследуемых группах

	Группа 1 (n = 6)	Группа 2 (n = 6)	Все больные, принимавшие статины (группы 1 и 2) (n = 12)	Группа 3 (n = 7)	p			
	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	1vs2	1vs3	2vs3	1+2vs3
ΔОХС, ммоль/л	-1,59 ± 2,26	-0,45 ± 0,40	-1,02 ± 1,66	-2,72 ± 4,48	1	1	0,366	0,592
ΔХС ЛНП, ммоль/л	-1,57 ± 2,05	-0,50 ± 0,44	-1,03 ± 1,52	-2,67 ± 3,12	0,589	0,445	0,101	0,142
ЦЕРАМИДЫ (нг/мл)								
Δ Cer 14:1	-0,26 ± 0,259	0,05 ± 0,10	-0,10 ± 0,25	0,10 ± 0,35	0,065	0,022*	0,731	0,299
Δ Cer 14:0	-4,9 ± 16,8	0,87 ± 6,07	-2,01 ± 12,41	2,01 ± 14,44	0,699	0,445	0,534	0,967
Δ Cer 16:1	4,1 ± 7,17	-1,70 ± 1,32	1,23 ± 5,79	-0,08 ± 5,64	0,015*	0,181	0,945	0,482
Δ Cer 16:0	-31,61 ± 128,6	0,20 ± 39,22	-15,70 ± 92,17	-31,85 ± 186,90	0,485	0,731	0,295	0,384
Δ Cer 18:1	0,36 ± 1,44	0,12 ± 1,10	0,24 ± 1,23	0,31 ± 0,87	0,699	1	0,731	0,837
Δ Cer 18:0	1,53 ± 22,4	-2,36 ± 8,61	-0,41 ± 16,33	-1,42 ± 14,20	0,24	0,534	0,945	0,773
Δ Cer 20:1	0,04 ± 0,96	0,07 ± 0,22	0,05 ± 0,16	0,13 ± 0,49	0,937	0,534	0,836	0,592
Δ Cer 20:0	0,46 ± 31,2	-3,30 ± 23,91	-1,42 ± 26,57	19,45 ± 33,98	1	0,366	0,366	0,261
Δ Cer 22:1	-0,71 ± 3,12	1,55 ± 0,86	0,42 ± 2,48	2,73 ± 3,13	0,24	0,073	0,731	0,196
Δ Cer 22:0	-126,9 ± 455,6	104,33 ± 253,10	-11,29 ± 371,56	357,35 ± 684,10	0,699	0,366	0,628	0,837
Δ Cer 24:1	54,8 ± 80,02	4,48 ± 76,78	29,64 ± 79,25	-47,24 ± 276,47	0,24	0,366	0,836	0,482
Δ Cer 24:0	-186,9 ± 377	39,09 ± 303,56	-73,89 ± 347,01	572,89 ± 946,70	0,394	0,366	0,731	0,432
Δ Cer 26:1	3,85 ± 5,3	-1,80 ± 8,47	1,03 ± 7,35	3,83 ± 8,54	0,31	0,731	0,445	0,837
Δ Cer 26:0	0,60 ± 9,61	-0,09 ± 3,01	0,26 ± 6,80	8,82 ± 16,90	0,818	0,534	0,731	0,536
СФИНГОМИЕЛИНЫ (нг/мл)								
Δ SM 14:1	-136,44 ± 264,64	-106,46 ± 222,84	-121,45 ± 233,78	76,75 ± 597,50	1	0,945	0,628	0,711
Δ SM 14:0	-2267,50 ± 4319,4	-415,69 ± 2599,93	-1341,60 ± 3533,89	1137,25 ± 7185,34	0,394	0,534	0,731	0,536
Δ SM 16:1	-2858,22 ± 5090,2	-427,07 ± 2668,56	-1642,65 ± 4077,53	2865,61 ± 12002,14	0,589	1	0,945	0,967
Δ SM 16:0	-10165,3 ± 42892,64	-1597,70 ± 4740,43	-5881,49 ± 29436,31	12826,09 ± 39663,43	1	0,445	0,945	0,592
Δ SM 18:1	-744,05 ± 3065,24	-351,66 ± 255,92	-547,86 ± 2083,88	-29,60 ± 2322,63	0,394	0,366	0,234	0,196
Δ SM 18:0	-3591,13 ± 9189,7	-1200,41 ± 1637,43	-2395,77 ± 6415,91	1257,17 ± 7871,83	0,699	0,366	0,445	0,299
Δ SM 20:1	-4171,7 ± 10715,9	-1493,53 ± 3174,60	-2832,60 ± 7663,77	2252,86 ± 10836,10	0,699	0,295	0,366	0,227
Δ SM 20:0	-26205,9 ± 68374,9	-3241,66 ± 9337,83	-14723,80 ± 48047,04	25016,12 ± 54734,68	0,699	0,234	0,234	0,142
Δ SM 22:1	-5271,02 ± 2725,40	-4315,07 ± 3580,24	-4793,04 ± 3074,40	3930,79 ± 13493,31	0,485	0,101	0,101	0,045*
Δ SM 22:0	-10310,6 ± 7398,5	-1309,75 ± 15485,82	-5810,15 ± 12489,23	8114,48 ± 20690,12	0,24	0,035*	0,534	0,1
Δ SM 24:1	-5944,38 ± 9369,28	-10757,56 ± 7584,82	-8350,97 ± 8507,03	12768,79 ± 34445,18	0,485	0,445	0,138	0,167
Δ SM 24:0	-11342,31 ± 7409,98	-2740,53 ± 7497,64	-7041,42 ± 8407,70	4807,69 ± 13661,89	0,132	0,022*	0,445	0,068
Δ SM 26:1	-222,42 ± 267,17	-191,58 ± 204,63	-207,00 ± 227,46	150,46 ± 270,72	1	0,073	0,005*	0,005*

При сравнении динамики сфинголипидов каждой из групп было отмечено, что в 1-й группе уровень церамида Cer 16:1 несколько повышался (Δ Cer 16:1 = 4,1 ± 7,17), а в группе 2 снижался (Δ Cer 16:1 = -1,70 ± 1,32). Различия достоверно значимы ($p = 0,015$).

На фоне терапии алирокумабом отмечено повышение уровня Cer 14:1 (Δ Cer 14:1 = 0,10 ± 0,35) ($p = 0,022$), в отличие от пациентов, начавших прием статинов, у которых этот церамид снижался (Δ Cer 14:1 = -0,26 ± 0,259). При сравнении динамики в группах 1 и 3 были показаны существенные различия для SM 22:0 (Δ SM 22:0 = -10310,6 vs 8114,48) ($p = 0,035$) и SM 24:0 (Δ SM 24:0 = -11342,31 vs 4807,69) ($p = 0,022$). У больных, принимавших статины, и у пациентов, получивших алирокумаб, различалась динамика SM 22:1 (Δ SM 22:1 = -4793,04 vs 3930,79) ($p = 0,045$) и SM 26:1 (Δ SM 26:1 = -207,00 vs 150,46) ($p = 0,005$) соответственно, в группах 2 и 3 (Δ SM 26:1 = -191,58 vs 150,46).

При проведении корреляционного анализа в группе 1 была установлена статистически значимая прямая корреляционная связь высокой тесноты динамики церамида Cer 14:1 с изменением уровня ХС ЛНП ($p = 0,829$;

$p = 0,042$), а с исходным уровнем ХС ЛНП обратная связь высокой тесноты ($p = -0,829$; $p = 0,042$) (табл. 3). В этой же группе были отмечены прямые корреляционные связи динамики длинноцепочечных сфингомиелинов с изменением уровня ЛНП — Δ SM 24:1 с Δ ЛНП ($p = 0,943$; $p = 0,005$), Δ SM 26:1 с Δ ЛНП ($p = 0,829$; $p = 0,042$) и обратные связи с исходным уровнем ХС ЛНП — с Δ SM 24:1 ($p = -0,943$; $p = 0,005$), с Δ SM 26:1 ($p = -0,829$; $p = 0,042$). В группе 2 только изменение SM 18:0 имело прямую корреляцию с исходным уровнем ЛНП ($p = 0,812$; $p = 0,05$).

В 1-й группе отмечена значимая корреляция высокой тесноты динамики Δ SM 26:1 с исходным уровнем ХС ЛВП ($p = -0,829$; $p = 0,042$), у пациентов 2-й группы значимых корреляций не было. У всех больных, принимавших статины, значимые корреляции с исходным уровнем ЛВП были отмечены для Δ SM 14:1 ($p = -0,602$; $p = 0,038$), Δ SM 14:0 ($p = -0,676$; $p = 0,016$), Δ SM 16:1 ($p = -0,630$; $p = 0,028$), Δ SM 24:0 ($p = -0,581$; $p = 0,047$), Δ SM 26:1 ($p = -0,595$; $p = 0,041$). В 3-й группе выявлено наличие обратной связи высокой тесноты изменения SM 20:1 ($p = -0,929$; $p = 0,003$) и SM 20:0 ($p = -0,929$; $p = 0,003$) с исходным уровнем ХСЛВП.

Таблица 3. Корреляционный анализ динамики сфинголипидов с исходными уровнями ХС ЛНП, ХС ЛВП и динамикой ХС ЛНП

	Исходный уровень ХС ЛНП	Δ ХС ЛНП	Исходный уровень ХС ЛВП
Группа 1 (n = 6)			
Δ Cer 14:1	$\rho = -0,829; p = 0,042$	$\rho = 0,829; p = 0,042$	$\rho = -0,6; p = 0,208$
Δ SM 24:1	$\rho = -0,943; p = 0,005$	$\rho = 0,943; p = 0,005$	$\rho = -0,657; p = 0,156$
Δ SM 26:1	$\rho = -0,829; p = 0,042$	$\rho = 0,829; p = 0,042$	$\rho = -0,829; p = 0,042$
Группа 2 (n = 6)			
Δ SM 18:0	$\rho = 0,812; p = 0,05$	$\rho = -0,200; p = 0,704$	$\rho = 0,029; p = 0,957$
Все больные, принимавшие статины (группы 1 и 2) (n = 12)			
Δ SM 14:1	$\rho = -0,329; p = 0,296$	$\rho = 0,606; p = 0,037$	$\rho = -0,602; p = 0,038$
Δ SM 14:0	$\rho = -0,417; p = 0,178$	$\rho = 0,504; p = 0,094$	$\rho = -0,676; p = 0,016$
Δ SM 16:1	$\rho = -0,109; p = 0,737$	$\rho = 0,245; p = 0,442$	$\rho = -0,630; p = 0,028$
Δ SM 24:0	$\rho = -0,235; p = 0,463$	$\rho = 0,343; p = 0,275$	$\rho = -0,581; p = 0,047$
Δ SM 26:1	$\rho = -0,452; p = 0,140$	$\rho = 0,480; p = 0,114$	$\rho = -0,595; p = 0,041$
Группа 3 (n = 7)			
Δ SM 20:1	$\rho = -0,143; p = 0,760$	$\rho = -0,036; p = 0,939$	$\rho = -0,929; p = 0,003$
Δ SM 20:0	$\rho = -0,179; p = 0,702$	$\rho = 0,107; p = 0,819$	$\rho = -0,929; p = 0,003$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время в качестве основных классов гиполипидемических препаратов используют ингибиторы ГМГ-КлА-редуктазы (статины), блокирующие печеночный синтез холестерина, блокаторы обратного всасывания холестерина в кишечнике (эзетимиб) и ингибиторы пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), механизм действия которых основан на блокаде связывания этого фермента с рецептором ЛНП и увеличении числа таких рецепторов на поверхности гепатоцитов. При проведении гиполипидемической терапии основным клиническим ориентиром является снижение уровня ХС ЛНП до целевых уровней [2]. Различия в механизме действия могут обуславливать и наличие различий во влиянии на уровень других липидных фракций, и, в частности, сфингомиелинов и церамидов. Известно, что уровень церамидов можно рассматривать как дополнительный фактор риска осложнений атеросклероза (инфаркта миокарда и инсульта). Это было показано в когортном исследовании Rochester Epidemiology Project (REP) при наблюдении за 1131 здоровыми лицами старше 45 лет. Основными предикторами неблагоприятных исходов оказались соотношения Cer 16:0/Cer 24:0, Cer 18:0/Cer 24:0, Cer 24:1/Cer 24:0 и показатель церамидного риска [10]. Эти же церамиды и их соотношения оказались независимыми предикторами сердечно-сосудистой смерти в когорте из 1704 больных с ИБС [11]. В нашей работе мы тоже проводили оценку динамики этих соотношений и показателя церамидного риска на фоне проводимой гиполипидемической терапии.

Повышение уровня сфингомиелинов тоже можно рассматривать как независимый предиктор неблагоприятных исходов. Это было показано при анализе когорт больных с семейной дислипидемией при применении методов анализа больших данных и машинного обучения [12]. Прогностическое значение некоторых сфингомиелинов показано и для цереброваскулярной болезни [13].

Данных о влиянии терапии статинами, ингибиторами PCSK9 и эзетимибом на уровень сфинголипидов в литературе немного. В рандомизированном исследовании было показано, что комбинация аторвастатина и фибратов приводила к снижению уровня ацилглицеролов и большинства

церамидов и увеличению уровня сфингомиелинов. Увеличение дозы аторвастатина приводило к умеренному снижению уровня лизофосфатидилхолина. [14]. В рандомизированном исследовании при сравнении влияния симвастатина в дозе 80 мг и комбинации симвастатина 10 мг и эзетимиба было показано отличающееся влияние этих режимов терапии на уровень липидных и сфинголипидных фракций. Терапия увеличенной дозой статина приводила к более значимым изменениям уровня сфинголипидов. При этом динамика уровня ОХС и ХС ЛНП была сопоставимой. Большая доза статина в значительно большей степени снижала уровень сфингомиелинов и церамидов, а также влияла на уровень фосфотидилхолина, что отчасти может объяснить плеiotропность действия статинов [15].

В рандомизированном исследовании с применением двух разных доз розувастатина (10 и 40 мг) у больных с метаболическим синдромом и низкие и высокие дозы статина значимо снижали уровень церамидов и сфинголипидов. Существенные дозозависимые различия были показаны для динамики фосфатидилхолина, лизофосфатидилхолина, алкилфосфатидилхолина, алкенилфосфатидилхолина (плазмалоген) и фосфатидилинозитола. Дозозависимый эффект был показан и для сфинголипидов после нормализации их уровня к уровню фосфатидилхолина [16].

При лечении розувастатином динамика уровня церамидов крови демонстрировала обратную корреляцию по сравнению с динамикой уровня ApoB100 липопротеинов очень низкой плотности. Не было выявлено также ассоциации динамики уровня церамидов и сфингомиелинов с динамикой уровня ОХС, ХС ЛНП, ТГ и ApoA1 ЛНП. Обнаруженная ассоциация между динамикой ApoB ЛОНП и динамикой церамидов на фоне приема розувастатина демонстрирует возможные особенности механизма действия этого статина [17].

В нашем исследовании стартовая терапия статинами приводила к статистически значимому снижению уровня Cer 14:1 и уменьшению уровня сфингомиелинов SM 22:1, SM 22:0 и SM 24:0. Снижение уровня Cer 14:1 и длинноцепочечных сфингомиелинов коррелировало с исходным уровнем ХС ЛНП и динамикой ЛНП. При интенсификации гиполипидемической терапии (увеличении дозы статинов и добавлении у части больных эзетимиба) в

целом динамика сфингомиелинов была более выраженной, что коррелирует с данными приведенных исследований. Существенного влияния на уровень церамидов и церамидный риск не зарегистрировано.

Ассоциация между уровнем PCSK9 и уровнем сфинголипидов и церамидов крови была изучена в исследовании на 31 пациенте с заболеваниями печени различной этиологии. У пациентов с высоким уровнем PCSK9 уровень ХС ЛНП был выше ожидаемого. При этом уровни ОХС, сфинголипидов и церамидов с уровнем PCSK9 не коррелировали. При разбиении пациентов на группы с высоким и низким уровнем PCSK9 оказалось, что у больных с уровнем PCSK9 плазмы крови выше медианы оказался существенно ниже уровень некоторых типов сфинголипидов и церамидов: CE 16:0, CE 20:5, CE 20:4, CE 22:6, CE 22:4, SM 18:0, SM 20:1, SM 24:2, SM 24:1. Механизм подобной ассоциации на сегодняшний день неясен [18].

В исследовании EQUATOR при применении моноклонального антитела к PCSK9 RG7652 было показано преимущественное снижение уровня церамидов CE 24:1, CE 24:0 и CE 26:0, преимущественно содержащихся в ЛНП [19]. В другом исследовании, где ингибиторы PCSK9 назначали на фоне проведения терапии максимально переносимыми дозами статинов, тоже было зарегистрировано прежде всего снижение уровня церамидов, а также снижение показателя церамидного риска — интегрального параметра, коррелирующего с риском неблагоприятного исхода у больных с дислипидемиями [20]. Ранее в исследовании Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) было показано, что гомозиготное носительство редкого аллеля мутации R46L гена PCSK9, характеризующегося сниженной активностью фермента, ассоциировано с 30%-м снижением показателя церамидного риска по сравнению с носителями другого аллеля [21]. В этом же исследовании продемонстрировано 13%-е снижение церамидного риска на фоне терапии симвастатином и отсутствие динамики церамидов при применении эзетимиба.

В нашем исследовании добавление к терапии алирокумаба привело к значимому снижению ХС ЛНП, но существенно не изменило уровень сфингомиелинов и церамидов. Отмечено лишь значимое увеличение Cer 22:1 и снижение величины соотношения Cer 16:0/24:0, являющегося одним из маркеров церамидного риска. В нашем исследовании добавление к терапии алирокумаба проводили у больных, уже принимавших максимально переносимые дозы статинов в соответствии с зарегистрированными для этого препарата показаниями [2, 22]. При этом исходные уровни сфинголипидов были достаточно низкими, существенно ниже, чем в группах 1 и 2 на фоне четырехнедельной терапии статинами. На фоне исходно низких уровней сфингомиелинов ингибитор PCSK9 не оказал существенного влияния на уровни сфингомиелинов и церамидов. Возможно, это связано и с отличным от статинов механизмом действия данного препарата.

Исследование имело следующие ограничения: выполнено на малой выборке больных и проведено с использованием в качестве базовой терапии различных статинов.

Выводы

Снижение содержания сфингомиелинов происходит на фоне терапии статинами и при лечении стартовыми дозами статинов коррелирует со снижением уровня ХС ЛНП. При эскалации гиполипидемической терапии корреляция динамики сфингомиелинов и ЛНП становится менее значимой. Терапия ингибиторами PCSK9 приводит к существенному снижению уровня ХС ЛНП, но не влияет на уровень сфингомиелинов. Существенной динамики церамидов и церамидного риска на фоне терапии статинами не зарегистрировано, но при добавлении к терапии ингибитора PCSK9 произошло уменьшение соотношения Cer 16:0/24:0, что может быть маркером снижения сердечно-сосудистых рисков.

Литература

1. Bossard M, Latifi Y, Fabbri M, Kurmann R, Brinkert M, Wolfrum M, et al. Increasing Mortality From Premature Coronary Artery Disease in Women in the Rural United States. *J Am Heart Assoc.* 2020; 9 (9): e015334. DOI: 10.1161/JAHA.119.015334.
2. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al; ESC Scientific Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020; 41 (1): 111–88. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455.
3. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017; 38 (32): 2459–72. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx144.
4. Khera AV, Won HH, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67 (22): 2578–89. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.03.520.
5. Barenholz Y. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell Biochem.* 2004; 37: 167–215. DOI: 10.1007/978-1-4757-5806-1_5.
6. Manicke NE, Nefliu M, Wu C, Woods JW, Reiser V, Hendrickson RC, et al. Imaging of lipids in atheroma by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009; 81 (21): 8702–7. DOI: 10.1021/ac901739s.
7. Brunkhorst R, Friedlaender F, Ferreirós N, Schwalm S, Koch A, Grammatikos G, et al. Alterations of the Ceramide Metabolism in the Peri-Infarct Cortex Are Independent of the Sphingomyelinase Pathway and Not Influenced by the Acid Sphingomyelinase Inhibitor Fluoxetine. *Neural Plast.* 2015; 2015: 503079. DOI: 10.1155/2015/503079.
8. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J.* 2016; 37 (25): 1967–76. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.
9. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37 (8): 911–7.
10. Vasile VC, Meeusen JW, Medina Inojosa JR, Donato LJ, Scott CG, Hyun MS, et al. Ceramide Scores Predict Cardiovascular Risk in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021; 41 (4): 1558–69. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315530.
11. Li Q, Wang X, Pang J, Zhang Y, Zhang H, Xu Z, et al. Associations between plasma ceramides and mortality in patients with coronary

- artery disease. *Atherosclerosis*. 2020; 314: 77–83. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.004.
12. Poss AM, Maschek JA, Cox JE, Hauner BJ, Hopkins PN, Hunt SC, et al. Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease. *J Clin Invest*. 2020; 130 (3): 1363–76. DOI: 10.1172/JCI131838.
 13. You Q, Peng Q, Yu Z, Jin H, Zhang J, Sun W, et al. Plasma lipidomic analysis of sphingolipids in patients with large artery atherosclerosis cerebrovascular disease and cerebral small vessel disease. *Biosci Rep*. 2020; 40 (9): BSR20201519. DOI: 10.1042/BSR20201519.
 14. Han JS, Kim K, Jung Y, Lee JH, Namgung J, Lee HY, et al. Metabolic Alterations Associated with Atorvastatin/Fenofibrate Acid Combination in Patients with Atherogenic Dyslipidaemia: A Randomized Trial for Comparison with Escalated-Dose Atorvastatin. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14642. DOI: 10.1038/s41598-018-33058-x.
 15. Snowden SG, Grapov D, Settergren M, D'Alexandri FL, Haeggström JZ, Fiehn O, et al. High-dose simvastatin exhibits enhanced lipid-lowering effects relative to simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7 (6): 955–64. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000606.
 16. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Weir JM, Meikle PJ, et al. Dose-dependent effects of rosuvastatin on the plasma sphingolipidome and phospholipidome in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99 (11): E2335–40. DOI: 10.1210/jc.2014-1665.
 17. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, Barrett PH. Association of Plasma Ceramides and Sphingomyelin With VLDL apoB-100 Fractional Catabolic Rate Before and After Rosuvastatin Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100 (6): 2497–501. DOI: 10.1210/jc.2014-4348.
 18. Feder S, Wiest R, Weiss TS, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) levels are not associated with severity of liver disease and are inversely related to cholesterol in a cohort of thirty eight patients with liver cirrhosis. *Lipids Health Dis*. 2021; 20 (1): 6. DOI: 10.1186/s12944-021-01431-x.
 19. Hilvo M, Simolin H, Metso J, Ruuth M, Öörni K, Jauhiainen M, et al. PCSK9 inhibition alters the lipidome of plasma and lipoprotein fractions. *Atherosclerosis*. 2018; 269: 159–65. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.004.
 20. Ye Q, Svatikova A, Meeusen JW, Kludtke EL, Kopecky SL. Effect of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitors on Plasma Ceramide Levels. *Am J Cardiol*. 2020; 128: 163–7. DOI: 10.1016/j.amjcard.2020.04.052.
 21. Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvänne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99 (1): E45–52. DOI: 10.1210/jc.2013-2559.
 22. Инструкция к препарату Пралуэнт. Доступно по ссылке: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e7885c43-2824-42ee-8673-f6221d7f2f5a&t=

References

1. Bossard M, Latifi Y, Fabbri M, Kurmann R, Brinkert M, Wolfrum M, et al. Increasing Mortality From Premature Coronary Artery Disease in Women in the Rural United States. *J Am Heart Assoc*. 2020; 9 (9): e015334. DOI: 10.1161/JAHA.119.015334.
2. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020; 41 (1): 111–88. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455.
3. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017; 38 (32): 2459–72. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx144.
4. Khera AV, Won HH, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67 (22): 2578–89. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.03.520.
5. Barenholz Y. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell Biochem*. 2004; 37: 167–215. DOI: 10.1007/978-1-4757-5806-1_5.
6. Manicke NE, Neffliu M, Wu C, Woods JW, Reiser V, Hendrickson RC, et al. Imaging of lipids in atheroma by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009; 81 (21): 8702–7. DOI: 10.1021/ac901739s.
7. Brunkhorst R, Friedlaender F, Ferreirós N, Schwalm S, Koch A, Grammatikos G, et al. Alterations of the Ceramide Metabolism in the Peri-Infarct Cortex Are Independent of the Sphingomyelinase Pathway and Not Influenced by the Acid Sphingomyelinase Inhibitor Fluoxetine. *Neural Plast*. 2015; 2015: 503079. DOI: 10.1155/2015/503079.
8. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, Hilvo M, Vihervaara T, Kauhanen D, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J*. 2016; 37 (25): 1967–76. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.
9. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37 (8): 911–7.
10. Vasile VC, Meeusen JW, Medina Inojosa JR, Donato LJ, Scott CG, Hyun MS, et al. Ceramide Scores Predict Cardiovascular Risk in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021; 41 (4): 1558–69. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315530.
11. Li Q, Wang X, Pang J, Zhang Y, Zhang H, Xu Z, et al. Associations between plasma ceramides and mortality in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2020; 314: 77–83. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.004.
12. Poss AM, Maschek JA, Cox JE, Hauner BJ, Hopkins PN, Hunt SC, et al. Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease. *J Clin Invest*. 2020; 130 (3): 1363–76. DOI: 10.1172/JCI131838.
13. You Q, Peng Q, Yu Z, Jin H, Zhang J, Sun W, et al. Plasma lipidomic analysis of sphingolipids in patients with large artery atherosclerosis cerebrovascular disease and cerebral small vessel disease. *Biosci Rep*. 2020; 40 (9): BSR20201519. DOI: 10.1042/BSR20201519.
14. Han JS, Kim K, Jung Y, Lee JH, Namgung J, Lee HY, et al. Metabolic Alterations Associated with Atorvastatin/Fenofibrate Acid Combination in Patients with Atherogenic Dyslipidaemia: A Randomized Trial for Comparison with Escalated-Dose Atorvastatin. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14642. DOI: 10.1038/s41598-018-33058-x.
15. Snowden SG, Grapov D, Settergren M, D'Alexandri FL, Haeggström JZ, Fiehn O, et al. High-dose simvastatin exhibits enhanced lipid-lowering effects relative to simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7 (6): 955–64. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000606.
16. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Weir JM, Meikle PJ, et al. Dose-dependent effects of rosuvastatin on the plasma sphingolipidome and phospholipidome in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99 (11): E2335–40. DOI: 10.1210/jc.2014-1665.
17. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, Chan DC, Meikle PJ, Barrett PH. Association of Plasma Ceramides and Sphingomyelin With VLDL apoB-100 Fractional Catabolic Rate Before and After Rosuvastatin Treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100 (6): 2497–501. DOI: 10.1210/jc.2014-4348.
18. Feder S, Wiest R, Weiss TS, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) levels are not associated with severity of liver disease and are inversely related to cholesterol in a cohort of thirty eight

- patients with liver cirrhosis. *Lipids Health Dis.* 2021; 20 (1): 6. DOI: 10.1186/s12944-021-01431-x.
19. Hilvo M, Simolin H, Metso J, Ruuth M, Öörni K, Jauhiainen M, et al. PCSK9 inhibition alters the lipidome of plasma and lipoprotein fractions. *Atherosclerosis.* 2018; 269: 159–65. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.01.004.
 20. Ye Q, Svatikova A, Meeusen JW, Kludtke EL, Kopecky SL. Effect of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitors on Plasma Ceramide Levels. *Am J Cardiol.* 2020; 128: 163–7. DOI: 10.1016/j.amjcard.2020.04.052.
 21. Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, Kauhanen D, Sylvänne T, Hurme R, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99 (1): E45–52. DOI: 10.1210/jc.2013–2559.
 22. Инструкция к препарату Пралужент. Доступно по ссылке: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e7885c43-2824-42ee-8673-f6221d7f2f5a&t=. Russian.

ПРОИЗВОДНОЕ БЕНЗИМИДАЗОЛА КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО В ОТНОШЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ ЛЕГКОГО

Е. Ф. Комарова^{1,2}, О. Н. Жуковская³, Е. А. Лукбанова¹ ✉, М. А. Енгибарян¹, Л. Н. Ващенко¹, Д. А. Харагезов¹, В. В. Позднякова¹, Н. Д. Ушакова¹, Ю. С. Шатова¹, Ю. В. Пржедецкий¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, Ростов-на-Дону, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

³ Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

Значительное число применяемых в клинике противоопухолевых средств недостаточно эффективно и безопасно, что обуславливает поиск новых лекарственных субстанций. Цель работы — изучить влияние дигидробромид 2-(3,4-дигидроксибензил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола (РУ-185) на рост и метастазирование перевиваемой экспериментальной опухоли легкого Льюис (LLC). LLC прививали 55 мышам-самкам C57/Bl6 массой 18–20 г подкожно. Внутривенное (0,5 мл в сут.) введение препарата начинали через 48 ч после перевивки опухоли 1 раз в сутки 10 дней в разовых дозах 50, 220, 500 мг/кг (группы 1, 2 и 3 соответственно). Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор. При внутривенном введении субстанции происходило достоверное увеличение продолжительности жизни животных только в группе 2 (162,3%), а также значимое уменьшение объемов опухоли уже на 1-е сутки после окончания лечения. На 7-е и 14-е сутки от момента окончания лечения размеры опухоли в группах 2 и 3 были снижены по сравнению с контрольной группой в 3,4 и 1,3 раза (на 7-е сутки) и в 2,2 и 1,3 раза (на 14-е сутки) соответственно ($p < 0,05$). Индекс торможения роста опухоли сохранился в группе 2 к 14-м суткам после окончания лечения и у 20% животных отмечен регресс опухоли. Число метастазов в легких в группах 1 и 2 было снижено относительно контроля в 2,6 и 3,1 раза соответственно, а индекс ингибирования метастазирования составил 68,1 и 80% соответственно. Исследованный РУ-185 оказывает противоопухолевое действие, что выражено в увеличении продолжительности жизни животных, снижении скорости роста первичной опухоли, а также частоты развития и количества легочных метастазов экспериментальной эпидермоидной карциномы легкого Льюис мышей.

Ключевые слова: эпидермоидная карцинома легкого Льюис, дигидробромид 2-(3,4-дигидроксибензил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола, противоопухолевая активность, антиметастатическая активность, внутривенное введение

Финансирование: синтез исследуемого соединения осуществляли при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание в области научной активности, Южный федеральный университет, 2020, проект FENW-2020-0031 (0852-2020-0031). Исследования *in vivo* проводили в рамках государственного задания «Изучение противоопухолевой активности фармакологических субстанций *in vivo* и *in vitro*» (121031100253-3).

Вклад авторов: Е. Ф. Комарова — дизайн исследования, написание рукописи, проведение эксперимента; О. Н. Жуковская — редактирование рукописи, синтез вещества; Е. А. Лукбанова — оформление рукописи, проведение эксперимента; М. А. Енгибарян — редактирование рукописи; Л. Н. Ващенко — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи; Д. А. Харагезов — написание рукописи; В. В. Позднякова — статистический анализ данных; Н. Д. Ушакова — концепция и дизайн рукописи; Ю. С. Шатова — оформление библиографии, редактирование рукописи; Ю. В. Пржедецкий — техническое редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ (протокол № 18 от 10 сентября 2015 г.); все манипуляции с животными, в том числе выведение из эксперимента, осуществляли в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Алексеевна Лукбанова
ул. Азовская, д. 163, 346783, г. Азов; katya.samarskaja@yandex.ru

Статья получена: 01.06.2021 **Статья принята к печати:** 15.06.2021 **Опубликована онлайн:** 25.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.031

BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE AS ANTITUMOR DRUG AGAINST EXPERIMENTALLY INDUCED LUNG CARCINOMA

Komarova EF^{1,2}, Zhukovskaya ON³, Lukbanova EA¹ ✉, Yengibaryan MA¹, Vashenko LN¹, Kharagezov DA¹, Pozdnyakova VV¹, Ushakova ND¹, Shatova YuS¹, Przhedetsky YuV¹

¹ National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

³ Research Institute for Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Most cancer drugs used in a clinical setting are insufficiently effective and insufficiently safe. This prompts the search for novel substances to fight cancer. The aim of this study was to explore the effects of dihydrobromide 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a] benzimidazole (RU-185) on the growth and metastasis of experimentally induced transplantable Lewis lung carcinoma (LLC). Fifty-five C57/Bl6 male mice (weight 18–20 g) were subcutaneously inoculated with LLC cells. The tested substance (0.5 ml) was administered intragastrically at 50, 220, and 500 mg/kg (groups 1, 2 and 3, respectively) once a day for 10 days starting at 48 h after inoculation. The control group received normal saline. Intragastric administration of the tested substance resulted in significantly longer survival in group 2 only (162.3%) and in the significant reduction of tumor size on day 1 after treatment in all groups. After the end of treatment, tumor sizes in groups 2 and 3 were 3.4 and 1.3 times smaller, respectively, on day 7 and 2.2. and 1.3 times smaller, respectively, on day 14 than in the control group ($p < 0,05$). The growth delay rate was sustained in group 2 by day 14 after the end of treatment; tumor regression was observed in 20% of the animals. The number of metastases in the lungs was lower in groups 1 and 2 than in the control group (2.6 and 3.1-fold, respectively), and the metastasis inhibition was 68.1% and 80%, respectively. The tested substance RU-185 has an anticancer effect in mice: it results in longer survival, slower growth of the primary tumor and fewer lung metastases of Lewis lung carcinoma.

Keywords: Lewis lung carcinoma, dihydrobromide 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a] benzimidazole, antitumor activity, antimetastatic activity, intragastric administration.

Funding: synthesis of the tested compound was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education under the state assignment for the Southern Federal University, 2020, Project FENW-2020-0031 (0852-2020-0031). *In vivo* experiments were part of the state assignment *Study of antitumor activity of pharmacological substances in vivo and in vitro* (121031100253-3).

Author contributions: Komarova EF proposed the design, conducted the experiment and wrote the draft version of the manuscript; Zhukovskaya ON synthesized the tested compound and edited the manuscript; Lukbanova EA conducted the experiment and contributed to writing the manuscript; Yengibaryan MA edited the manuscript; Vashenko LN proposed the concept and design for the study, edited the manuscript; Kharagezov DA contributed to writing the manuscript; Pozdnyakova VV performed statistical analysis; Ushakova ND proposed the concept and design for the study; Shatova YuS prepared the list of references and edited the manuscript; Przhedetsky YuV performed technical editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of National Medical Research Center for Oncology (Protocol № 18 dated September 10, 2015); the experiment complied with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Lukbanova
Azovskaya, 163, 346783, Azov; katya.samarskaja@yandex.ru

Received: 01.06.2021 **Accepted:** 15.06.2021 **Published online:** 25.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.031

Многочисленные исследования в современной онкологии, направленные на изучение механизмов опухолевого роста и прогрессирования злокачественных новообразований, закладывают фундаментальную основу поиска мишеней для терапии [1–3]. В связи с этим идет разработка новых противоопухолевых и антиметастатических средств, в основе эффективности которых лежит воздействие на эти мишени. Однако значительное число применяемых в клинике противоопухолевых средств недостаточно эффективно и безопасно, что определяет приоритетные направления экспериментальной медицины — поиск новых лекарственных субстанций.

Молекула ДНК служит главной мишенью, на которую направлено действие многих противоопухолевых и антиметастатических препаратов разных классов и разных химических групп, реализующих свою активность с помощью разнообразных механизмов. Исследования показали, что родоначальник ряда трициклических систем на основе бензимидазола, 3Н-триазоло[1,5-а]бензимидазол, весьма эффективно связывается с АТФ-сайтом фермента *check point kinase 2* и тем самым ингибирует его. Поскольку эта киназа играет решающую роль в активации путей передачи сигнала, участвующих в клеточном ответе на повреждения ДНК, ее ингибирование в опухолевых клетках должно блокировать репарацию ДНК и индуцировать апоптоз злокачественных клеток [4]. Производные бензимидазола могут проявлять противоопухолевую активность и за счет влияния на другие клеточные мишени, задействованные в процессах репарации (например, ингибируя ключевой энзим системы репарации ДНК — поли(АДФ-рибоза) полимеразу (PARP-1 и -2) и потенцируя цитотоксичность повреждающих ДНК агентов) [5]. При переходе от производных бензимидазола к соединениям ряда более простой моноциклической имидазольной системы возникает возможность противоопухолевого действия за счет блокирования возможности эффективной репликации ДНК путем электростатических взаимодействий, интеркаляции и связывания с бороздками ДНК [6].

Другой весьма важной мишенью для противоопухолевых препаратов служит белок тубулин, связывание с которым препятствует критически важным, в том числе для клеточного деления, процессам его полимеризации и деполимеризации. И здесь в роли ингибиторов тубулина могут выступать различные производные бензимидазола, затрудняющие образование микротрубочек [7]. Отдельные их представители обладают хорошими фармакокинетическими свойствами и способны преодолеть множественную лекарственную устойчивость, формирующуюся у многих клеточных линий. В частности, широкий спектр активности в качестве ингибиторов β -тубулина демонстрируют производные бензимидазола-2-мочевины, которые, по данным литературы, оказывают цитотоксическое действие в отношении культур клеток человека NCI-H460, Colo205, K562, A431, HepG2, Hela, MDA-MB-435S [8].

Цитотоксический эффект производных бензимидазола в отношении клеток аденокарциномы легких человека A549 в условиях гипоксии связывают с активацией их каспаззависимого апоптоза [9]. Показано, что одно из довольно сложных по структуре соединений бензимидазольного ряда обладает ингибирующей активностью в отношении онкогенных киназ MEK1 и PI3K [10].

Целью работы было исследовать влияние дигидробромида 2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола (РУ-185) на рост и метастазирование LLC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали 55 самцов мышей линии С57В1/6 весом 18–20 г. Животные были получены из вивария филиала «Андреевка» (Московская область).

Для проведения исследований использовали перевивную опухоль эпидермоидной карциномы LLC, для которой характерно 100%-е спонтанное метастазирование в легкие. Штамм был получен в банке опухолевых материалов лаборатории комбинированной терапии опухолей Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н. Н. Блохина. Поддержание и подкожную перевивку опухолевого штамма осуществляли в соответствии с общепринятыми методами.

Исследуемое вещество было получено из 1-диэтиламиноэтил-2-аминобензимидазола, его кватернизацией 3,4-диметоксифенацилбромидом с последующей циклизацией образующейся четвертичной соли действием 48%-й бромистоводородной кислоты при кипячении, сопровождающейся О-деметилованием [11]. Синтез РУ-185 осуществляли в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета.

Исследуемое соединение предварительно растворяли в физиологическом растворе. Введение веществ трем группам лабораторных животных осуществляли внутрижелудочно с помощью назогастрального зонда в разовых дозах 50 мг/кг (1-я группа), 220 мг/кг (2-я группа) и 500 мг/кг (3-я группа) (что соответствовало 1/40, 1/8 и 1/4 ЛД₅₀) раз в день в течение 10 дней, через 48 ч после перевивки опухоли LLC мышам указанной линии (табл. 1). Контрольную группу составляли животные с перевитой LLC, которым внутрижелудочно вводили физиологический раствор (плацебо) в аналогичных объемах и по той же схеме.

На 26-е сутки после перевивки опухоли часть животных всех групп подвергали эктаназии в CO₂-камере и проводили некропсию. Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности вещества выполняли в соответствии с методическими рекомендациями [12]. Степень противоопухолевой и антиметастатической активности вещества определяли по стандартным показателям, таким как объем опухоли, увеличение продолжительности жизни (Т/С%), рассчитанное как соотношение средней продолжительности жизни животных, подвергнутых воздействию, к контрольным показателям, а также количество метастатических узлов. По полученным результатам рассчитывали индекс торможения роста опухоли (ТРО%) и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ%) [12].

Предварительно была определена величина острой токсичности ЛД₅₀ для РУ-185 при внутрижелудочном введении, которая составила 1980,4 мг/кг, что согласно гармонизированной системе классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС) соответствует 4-й категории опасности. В соответствии с нормативными документами [13] он может быть отнесен к умеренно-опасным веществам (3-й класс опасности).

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.; США). Оценку нормальности распределения признаков осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий средних величин независимых выборок оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента. Уровень значимости для использованных методов был установлен как $p \leq 0,05$.

Таблица 1. Дизайн эксперимента

Основные показатели	Группы животных			
	Экспериментальные			Контрольная
	1-я	2-я	3-я	
Число животных в группе	18	18	19	10
Вводимые вещества	Дигидробромид 2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламино-этилимидазо[1,2-а]бензимидазола			Физиологический раствор
Разовые дозы, мг/кг	50	220	500	
Длительность введения	10 дней			
Вводимые объемы	0,5 мл в сутки			
Способ введения вещества	Внутрижелудочно, назогастральным зондом			

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты оценки противоопухолевой эффективности РУ-185 при внутрижелудочном введении представлены в табл. 2. Применение РУ-185 в исследуемых дозах по-разному влияло на продолжительность жизни животных в трех группах. Достоверное увеличение продолжительности жизни животных наблюдали только во 2-й группе, для которой показатель Т/С составил 162,3%. Продолжительность жизни животных в 3-й группе была выше контроля, но Т/С статистически значимо не отличался от контрольных показателей. Продолжительность жизни животных в 1-й группе, наоборот, была снижена относительно контроля.

Динамику роста первичной опухоли оценивали на 1-е, 7-е и 14-е сутки после окончания введения субстанции по объемам опухоли. Объемы первичного очага различались в группах уже в 1-е сутки после перевивки опухоли. При применении РУ-185 в средней и большой дозе (2-я и 3-я группы) объем опухоли уменьшался относительно показателя контрольной группы, о чем свидетельствовал индекс ТРО. Впрочем, значимое изменение объемов опухоли к этому сроку исследования отмечено лишь для 2-й группы. В 1-й группе было обнаружено усиление роста опухоли, ее размеры превышали контроль в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Измерение объемов опухолей на 7-е и 14-е сутки от момента окончания введения препаратов показало подобную динамику роста опухоли по сравнению с первыми сутками после введения в каждой исследуемой группе. Так, размеры опухоли в 1-й группе превышали контрольные показатели, тогда как во 2-й и 3-й группах они были уменьшены по сравнению с контрольной в 3,4 и 1,3 раза (на 7-е сутки) и 2,2 и 1,3 раза (на 14-е сутки) соответственно ($p < 0,05$). При этом индекс ТРО указывал на значимую эффективность применения субстанции

в разовой дозе 220 мг/кг, торможение роста опухоли отмечалось на сроке 14 суток после окончания лечения. Важно также, что в этой же группе у 20% животных был отмечен и регресс опухоли (табл. 2), подтвержденный данными некропии на момент вывода животных из эксперимента.

Интересно, что исследуемая субстанция при ее внутрижелудочном применении обладает и антиметастатическим действием в отношении LLC (табл. 3).

Данный эффект выражается в снижении как частоты метастазирования, так и количества метастатических узлов в легком животных, наблюдавшемся в 1-й и во 2-й группах. Выявлено выраженное снижение частоты метастазирования и количества метастатических узлов в легком животных в 1-й и 2-й группах: число метастазов в этих группах было меньше относительно контроля в 2,6 и 3,1 раза соответственно, а ИИМ составил 68,1% и 80% соответственно. В 3-й группе животных при применении большой дозы препарата также обнаружено ингибирование метастазирования.

Таким образом, можно заключить, что РУ-185 при его внутрижелудочном применении обладает противоопухолевой активностью в отношении экспериментальной злокачественной опухоли легкого, индуцируемой клеточной линией карциномы LLC, тормозя как ее рост, так и метастазирование. При разовой дозе, равной 220 мг/кг, отмечено также увеличение средней продолжительности жизни животных, а в 20% случаев у животных к 14 суткам после начала лечения наблюдался регресс опухоли. Наиболее выраженный противоопухолевый и антиметастатический эффект исследуемого производного бензимидазола отмечен при дозе 220 мг/кг. Снижение количества метастазов в легком, а также частоты метастатического поражения, характеризуемой индексом ингибирования метастазирования, наблюдавшееся для

Таблица 2. Влияние дигидробромид 2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола при внутрижелудочном введении на динамику роста LLC

Разовая доза, мг/кг	Т/С, %	Объем опухоли (см ³), $M \pm m$ (ТРО, %)		
		сутки после окончания лечения		
50	94,3	$2,34 \pm 0,42$	$8,63 \pm 1,3^{1,2}$	$10,4 \pm 0,52$
220	162,3	$0,41 \pm 0,3^{1,2}$	$2,04 \pm 0,5^{1,2}$	$4,5 \pm 0,11,2$ (55,0) – 80% животных 0 (100) – 20% животных
500	112,9	$1,08 \pm 0,45^{1,2}$ (30,1)	$5,21 \pm 1,21,2$ (22,1)	$7,4 \pm 0,3^{1,2}$ (28,6)
Контроль	0	$1,56 \pm 1,4$	$6,7 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,7$

Примечание: 1 — различия достоверны относительно контроля ($p < 0,05$); 2 — различия достоверны относительно подгрупп экспериментальной группы ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние дигидробромид 2-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола при внутрижелудочном введении на метастазирование LLC

Разовая доза, мг/кг	Число метастазов на одного животного	ИИМ, %
50	12,3 ± 1,0 ^{1,2}	68,1 ± 2,1 ^{1,2}
220	10,3 ± 0,6 ^{1,2}	80,0 ± 3,1 ^{1,2}
500	27,5 ± 0,92	13,9 ± 1,1
Контроль	32,2 ± 1,2	–

Примечание: 1 — различия достоверны относительно контроля ($p < 0,05$); 2 — различия достоверны относительно подгрупп экспериментальной группы ($p < 0,05$).

всех исследуемых доз, свидетельствует о выраженном антиметастатическом эффекте РУ-185 в отношении легочных метастазов LLC.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранние исследования влияния РУ-185 на рост и развитие подкожно перевитой меланомы В16 при внутрижелудочном введении животным показали, что субстанция оказывает большее ингибирующее влияние на метастазирование в легких, чем на рост первичной опухоли [14, 15]. Однако в настоящем исследовании выявлено выраженное противоопухолевое действие как на первичную, так и на метастатическую опухоль экспериментальной LLC. Возможно, особенности в противоопухолевой эффективности исследуемой субстанции в отношении первичной опухоли связаны с различиями фенотипических характеристик меланомы и опухоли легкого [16, 17]. Выявленное ингибирование метастазирования этих различных типов опухолей в ткань легкого наводит на мысль о существовании общих факторов, определяющих адаптацию опухолевых клеток к метастатической нише и рост метастазов в конкретной метаболической среде, обуславливая механизм действия изученной субстанции [18]. Метастатический протеом и транскриптом опухоли динамически модулируются

метаболизмом. Индуцированные метаболизмом сигнальные каскады могут управлять опухолевой агрессией и метастазированием посредством различных путей, участвующих на каждом этапе каскада метастазирования [19]. Однако для подтверждения предположения о возможных механизмах противоопухолевого действия изученной фармакологической субстанции необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

Фармакологическая субстанция РУ-185 при введении внутрижелудочно в разовой дозе 220 мг/кг однократно в день оказывает противоопухолевое действие, что выражается в достоверном увеличении продолжительности жизни животных, снижении скорости роста первичной опухоли, а также частоты развития и количества легочных метастазов экспериментальной эпидермоидной LLC. Антиметастатическое действие субстанции в отношении данной перевиваемой опухоли показано также в дозах 50 и 500 мг/кг. Выяснение метаболических механизмов антитуморогенного и антиметастатического эффекта изученной химической субстанции позволит выявить ее терапевтические мишени и использовать в качестве фармакологического препарата в клинической практике для лечения онкопатологии легкого.

Литература

1. Кит О. И., Шапошников А. В., Златник Е. Ю., Никипелова Е. А., Новикова И. А. Местный клеточный иммунитет при аденокарциноме и полипах толстой кишки. Сибирское медицинское обозрение. 2012; 4 (76): 11–16.
2. Кит О. И., Франциянц Е. М., Никипелова Е. А., Комарова Е. Ф., Козлова Л. С., Таварян И. С., и др. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазмидогена в ткани рака прямой кишки. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; 2 (114): 40–45.
3. Bashraheel SS, Domling A, Goda SK. Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. Biomed Pharmacother. 2020; 125: 110009.
4. Silva-Santisteban MC, Westwood IM, Boxall K. Fragment-based screening maps inhibitor interactions in the ATP-binding site of checkpoint kinase 2. PLoS One. 2013; 8 (6): e65689.
5. Penning TD, Zhu G-D, Gandhi VB, Gong J, Liu X, Shi Y, et al. Discovery of the Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor 2-[(R)-2-Methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the Treatment of Cancer. J Med Chem. 2009; 52: 514.
6. Ali I, Lone MN, Aboul-Enein H.Y. Imidazoles as potential anticancer agents. Medchemcomm. 2017; 8 (9): 1742–73.
7. Torres FC, Garcia-Rubino ME, Lozano-Lopez C, Kawano DF, Eifler-Lima VL, von Poser GL. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. Curr Med Chem. 2015; 14: 306–18.
8. Khatlab M. Theoretical study of the geometric and electronic characterization of carbendazim-based drug (Nocodazole). Heliyon. 2020; 6 (6): e04055.
9. Blaszczyk-Swiatkiewicz K, Olszewska P, Mikiciuk-Olasik E. Biological approach of anticancer activity of new benzimidazole derivatives. Pharmacological Reports. 2014; 66 (1): 100–6.
10. Marcian E, Dort V, Hong H, Wang H, Nino CA, Lombardi RL. Discovery of Bifunctional Oncogenic Target Inhibitors against Allosteric Mitogen-Activated Protein Kinase (MEK1) and Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Journal of Medicinal Chemistry. 2016; 59 (6): 2512–22.
11. Анисимова В. А., Косолапов В. А., Минкин В. И., и др., патентообладатель. Дигидробромид 9-(3,4-дигидроксифенил)-9-диэтиламино-этилимидазо[1,2-а]бензимидазола и фармацевтическая композиция на его основе. Патент РФ № 2391979/ 12.05.2008.
12. Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. ГОСТ 12.1.007-76. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/5200233>.
13. Миронова А. Н., редактор. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, М.: Гриф и К, 2013; 944 с.
14. Кит О. И., Комарова Е. Ф., Спасов А. А., Морковник А. С., Жуковская О. Н., Коробейникова Е. П., Ванжа Л. В., Шихлярова А. И., Брагина М. И., Бартерева Т. А., Лукбанова Е. А., Ширнина Е. А., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Позднякова В. В.,

- Максимов А. Ю., Анисимова В. А., авторы; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», патентообладатель. Средство для ингибирования метастазирования в легких. Патент РФ № 2632703. 12.12.2016.
15. Комарова Е. Ф., Шихлярова А. И., Брагина М. И., Ширнина Е. А., Бартенева Т. А., Коробейникова Е. П. и др. Оценка противоопухолевой активности антиоксиданта эноксифол на модели меланомы В16 в эксперименте. Известия Вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017; 3–2: 67–73.
 16. Aminzadeh-Gohari S, Weber DD, Catalano L, Feichtinger RG, Kofler B, Lang R. Targeting Mitochondria in Melanoma. *Biomolecules*. 2020; 10 (10): 1395.
 17. Wu M. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292: 125–36.
 18. Ohshima K, Morii E. Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. *Metabolites*. 2021; 11 (1): 28.
 19. Wei Q, Qian Y, Yu J, Wong CC. Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene*. 2020; 39 (39): 6139–56.
- ## References
1. Kit OI, Shaposhnikov AV, Zlatnik EYu, Nikipelova EA, Novikova IA. Mestnyy kletochnyy immunitet pri adenokarcinome i polipah tolstoj kishki. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie*. 2012; 4 (76): 11–16. Russian.
 2. Kit OI, Franciyanc EM, Nikipelova EA, Komarova EF, Kozlova LS, Tavarjan IS, i dr. Izmeneniya markerov proliferacii, neoangiogeneza i sistemy aktivacii plazminogena v tkani raka prjamoj kishki. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2015; 2 (114): 40–45. Russian.
 3. Bashraheel SS, Domling A, Goda SK. Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. *Biomed Pharmacother*. 2020; 125: 110009.
 4. Silva-Santisteban MC, Westwood IM, Boxall K. Fragment-based screening maps inhibitor interactions in the ATP-binding site of checkpoint kinase 2. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65689.
 5. Penning TD, Zhu G-D, Gandhi VB, Gong J, Liu X, Shi Y, et al. Discovery of the Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor 2-[(R)-2-Methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the Treatment of Cancer. *J Med Chem*. 2009; 52: 514.
 6. Ali I, Lone MN, Aboul-Enein H.Y. Imidazoles as potential anticancer agents. *Medchemcomm*. 2017; 8 (9): 1742–73.
 7. Torres FC, Garcia-Rubino ME, Lozano-Lopez C, Kawano DF, Eifler-Lima VL, von Poser GL. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2015; 14: 306–18.
 8. Khattab M. Theoretical study of the geometric and electronic characterization of carbendazim-based drug (Nocodazole). *Heliyon*. 2020; 6 (6): e04055.
 9. Blaszczyk-Swiatkiewicz K, Olszewska P, Mikiciuk-Olasik E. Biological approach of anticancer activity of new benzimidazole derivatives. *Pharmacological Reports*. 2014; 66 (1): 100–6.
 10. Marcian E, Dort V, Hong H, Wang H, Nino CA, Lombardi RL. Discovery of Bifunctional Oncogenic Target Inhibitors against Allosteric Mitogen-Activated Protein Kinase (MEK1) and Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 59 (6): 2512–22.
 11. Anisimova VA, Kosolapov VA, Minkin VI, i dr., patentoobladatel'. Digidrobromid 9-(3,4-digidroksifenil)-9-dijetilamino-jetilimidazo[1,2-a]benzimidazola i farmacevticheskaja kompozicija na ego osnove. Patent RF # 2391979/ 12.05.2008.
 12. Mezghosudarstvennyj standart. Sistema standartov bezopasnosti truda. Vrednye veshhestva. Klassifikacija i obshhie trebovanija bezopasnosti. GOST 12.1.007-76. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/5200233>.
 13. Mironova AN, redaktor. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast 1, M.: Grif i K, 2013; 944 s.
 14. Kit OI, Komarova EF, Spasov AA, Morkovnik AS, Zhukovskaya ON, Korobejnikova EP, Vanzha LV, Shihljaraova AI, Bragina MI, Barteneva TA, Lukbanova EA, Shimina EA, Zlatnik EJu, Novikova IA, Pozdnjakova VV, Maksimov AJu, Anisimova VA, avtory; FGBU «Nacional'nyj medicinskij issledovatel'skij centr onkologii», patentoobladatel'. Sredstvo dlja ingibirovanija metastazirovanija v legkih. Patent RF # 2632703. 12.12.2016. Russian.
 15. Komarova EF, Shihljaraova AI, Bragina MI, Shimina EA, Barteneva TA, Korobejnikova EP, i dr. Ocenka protivopuholevoj aktivnosti antioksidanta jenoksifol na modeli melanomy V16 v jeksperimente. *Izvestija Vuzov. Severo-Kavkazskij region. Estestvennye nauki*. 2017; 3–2: 67–73. Russian.
 16. Aminzadeh-Gohari S, Weber DD, Catalano L, Feichtinger RG, Kofler B, Lang R. Targeting Mitochondria in Melanoma. *Biomolecules*. 2020; 10 (10): 1395.
 17. Wu M. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292: 125–36.
 18. Ohshima K, Morii E. Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. *Metabolites*. 2021; 11 (1): 28.
 19. Wei Q, Qian Y, Yu J, Wong CC. Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene*. 2020; 39 (39): 6139–56.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАВИГАЦИОННОЙ РИТМИЧЕСКОЙ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ МАГНИТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ В ЛЕЧЕНИИ НЕВРАЛГИИ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА

А. Г. Пойдашева , Д. О. Синицын, И. С. Бакулин, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов


Научный центр неврологии, Москва, Россия

У пациентов с невралгией тройничного нерва (НТН), не отвечающих на фармакотерапию, в качестве альтернативы можно применять ритмическую транскраниальную магнитную стимуляцию (рТМС). Однако эффект рТМС варьирующ. Целью исследования был поиск нейровизуализационных биомаркеров клинической эффективности навигационной рТМС. Семнадцати пациентам с НТН (14 женщин; медиана возраста — 56 лет) проведено 10 сессий высокочастотной рТМС моторной коры полушария, контрлатеральной локализации боли. Проводили анализ корреляций функциональной коннективности (ФК) и объема серого вещества головного мозга (СВГМ) со снижением интенсивности боли. Показана положительная корреляция между снижением средней интенсивности боли и объемом СВГМ в области хвостатых ядер ($p(\text{unc}) = 0,03$), мозжечка билатерально ($p(\text{unc}) = 0,002$) и контрлатеральной постцентральной извилины ($p(\text{unc}) = 0,005$); между снижением максимальной интенсивности боли и объемом СВГМ в области хвостатого ядра контрлатерально боли ($p(\text{unc}) = 0,04$) и мозжечка ипсилатерально ($p(\text{unc}) = 0,03$). Продemonстрирована положительная связь снижения средней интенсивности боли с ФК между таламусом (контрлатерально локализации боли) и ипсилатеральной постцентральной извилиной и покрывкой островка ($p(\text{FWE}) = 0,018$), между поясной корой и передними отделами поясной коры ипсилатерально боли ($p(\text{FWE}) = 0,017$), между контрлатеральной паратерминальной извилиной и мозжечком ипсилатерально ($p(\text{FWE}) = 0,018$); отрицательная корреляция для ФК между контрлатеральной скорлупой и затылочными долями обоих полушарий ($p(\text{FWE}) = 0,001$). Полученные результаты могут стать предпосылкой к разработке индивидуальных предикторов эффективности рТМС у пациентов с хроническими болевыми синдромами.

Ключевые слова: невралгия, тройничный нерв, воксель-ориентированная морфометрия, функциональная коннективность, биомаркеры, транскраниальная магнитная стимуляция

Вклад авторов: А. Г. Пойдашева, И. С. Бакулин, Н. А. Супонева — планирование и дизайн исследования; А. Г. Пойдашева — анализ литературы; А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын — сбор и анализ данных, подготовка черновика рукописи статьи; все авторы — интерпретация данных; все авторы — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 9–4/16 от 05 октября 2016 г.) и соответствовало принципам Хельсинкской декларации; все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Александра Георгиевна Пойдашева
Волоколамское шоссе, 80, г. Москва, 125367; poydasheva@neurology.ru

Статья получена: 18.05.2021 **Статья принята к печати:** 02.06.2021 **Опубликована онлайн:** 12.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.027

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BIOMARKERS OF EFFICACY OF NAVIGATED REPETITIVE TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION IN THERAPY FOR TRIGEMINAL NEURALGIA

Poydasheva AG , Sinitsyn DO, Bakulin IS, Suponeva NA, Piradov MA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is an alternative treatment option for patients with drug-resistant trigeminal neuralgia (TN). However, the effect of rTMS is variable. The aim of this study was to find neuroimaging biomarkers of clinical efficacy of navigated rTMS. Seventeen patients with TN (14 women and 3 men, median age 56 years) received 10 sessions of high-frequency rTMS of the motor cortex contralateral to pain side. The data were analyzed for correlations between functional connectivity (FC), the grey matter (GM) volume and the reduction in pain intensity. Positive correlations were established between the reduction in average pain intensity and GM volume in caudate nuclei in both hemispheres ($p(\text{unc}) = 0.03$), both cerebellar hemispheres ($p(\text{unc}) = 0.002$) and the postcentral gyrus contralateral to pain side ($p(\text{unc}) = 0.005$); between the reduction in peak pain intensity and GM volume in the caudate nucleus contralateral to pain side ($p(\text{unc}) = 0.04$) and the cerebellar hemisphere ipsilateral to pain ($p(\text{unc}) = 0.03$). Significant positive correlations were discovered between the reduction in average pain intensity and FC between the thalamus contralateral to pain side, the postcentral gyrus and the insular operculum (both ipsilateral to pain side; $p(\text{FWE}) = 0.018$), as well as between the cingulate cortex and the anterior cingulate cortex ipsilateral to pain ($p(\text{FWE}) = 0.017$), between the contralateral subcallosal gyrus and the cerebellar hemisphere ipsilateral to pain ($p(\text{FWE}) = 0.018$). A negative correlation was established for FC between the contralateral putamen and the occipital lobes in both hemispheres ($p(\text{FWE}) = 0.001$). Our findings may spur the development of individual predictors of rTMS efficacy in patients with chronic pain.

Keywords: neuralgia, trigeminal nerve, voxel-based morphometry, functional connectivity, biomarker, transcranial magnetic stimulation

Author contribution: Poydasheva AG, Bakulin IS, Suponeva NA designed and planned the study; Poydasheva AG analyzed the literature; Poydasheva AG, Sinitsyn DO collected and analyzed the obtained data, wrote the draft version of the manuscript; All authors participated in editing the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee of the Research Center of Neurology (Protocol № 9–4/16 dated October 5, 2016) and complied with the Declaration Helsinki; informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Alexandra G. Poydasheva
Volokolamskoe shosse, 80, Moscow, 125367; poydasheva@neurology.ru

Received: 18.05.2021 **Accepted:** 02.06.2021 **Published online:** 12.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.027

Невралгия тройничного нерва (НТН) характеризуется возникновением кратковременных пароксизмов острой высокоинтенсивной боли в зоне кожной иннервации ветвей тройничного нерва. По разным оценкам, распространенность НТН в популяции составляет 0,03–0,3% [1]. Несмотря на высокую клиническую

эффективность блокаторов натриевых каналов с течением времени до половины пациентов становятся резистентными к лекарственной терапии [2]. Альтернативой фармакотерапии у таких больных могут быть инвазивные манипуляции (например, микроваскулярная декомпрессия), а также транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) [3–5].

TMS — метод неинвазивной стимуляции мозга, основанный на способности модулировать возбудимость целевой (стимулируемой) зоны с помощью воздействия переменного магнитного поля высокой индукции. Ритмическая транскраниальная магнитная стимуляция (рТМС) состоит в последовательном нанесении с заданной частотой большого числа магнитных стимулов (как правило, более 1000), причем направленность эффекта на возбудимость стимулируемой области зависит от частоты стимуляции. В качестве потенциальных механизмов воздействия рТМС наиболее часто обсуждают индукцию феноменов, подобных долговременной потенциации или депрессии (long term potentiation, LTP; long term depression, LTD), а также влияние на синтез нейротрансмиттеров и генетический аппарат клеток [6]. В контексте обезболивающего эффекта рТМС показана способность метода модулировать опиоидную нейротрансмиссию в структурах антиноцицептивной системы, а также восстанавливать нарушение корковой возбудимости и внутрикорковых взаимодействий [7]. Согласно рекомендациям группы Европейских экспертов, применение рТМС при хронической нейропатической боли имеет наибольший уровень достоверности доказательности эффекта (А) [4]. По данным систематического обзора, включившего 11 исследований эффективности рТМС при хронической нейропатической боли орофациальной локализации, в том числе невралгии тройничного нерва, продемонстрированы эффективность и безопасность метода [8]. В то же время использование рекомендованного для лечения хронической боли протокола стимуляции (высокочастотная стимуляция первичной моторной коры полушария, контралатерального локализации боли) у пациентов с НТН и атипичной лицевой болью не оказало статистически значимого анальгетического эффекта [9]. Причиной неоднородности результатов исследований, а также одним из основных факторов, ограничивающих более широкое использование рТМС в клинической практике, является выраженная вариабельность эффекта [10]. В контексте поиска решений проблемы высокой вариабельности эффекта перспективным направлением выглядит поиск предикторов эффективности рТМС [11]. Одним из подходов к решению данной задачи является выявление регионов, структурные или функциональные изменения в которых коррелируют с эффективностью рТМС. В наибольшей степени этот подход разработан у пациентов с депрессивными расстройствами. Например, продемонстрирована возможность разделения на основе данных фМРТ покоя пациентов на четыре биотипа с различным ответом на рТМС [12]. В других исследованиях показана возможность использования функциональной связности (ФК) между отдельными регионами в прогнозировании эффекта рТМС, однако результаты работ разнородны, а четкая концепция использования конкретных связей для отбора пациентов с ожидаемым высоким эффектом не сформирована [11, 13]. Показана также принципиальная возможность использования структурных данных в качестве предикторов ответа на рТМС у пациентов с депрессивными расстройствами, тиннитом, шизофренией [14, 15]. У пациентов с невралгией тройничного нерва подобные исследования ранее не проводили.

Целью исследования было найти нейровизуализационные биомаркеры клинической эффективности навигационной рТМС у пациентов с невралгией тройничного нерва.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Методика исследования

В исследование вошли пациенты с классической НТН согласно критериям классификации ICHD-3 (The International Classification of Headache Disorders 3rd edition, 2013) в возрасте 18–80 лет. Критерии включения пациентов: исключение вторичного характера невралгии; средняя интенсивность болевого синдрома не менее 4 баллов по числовой аналоговой шкале; недостаточная эффективность или непереносимость стандартной фармакологической терапии, применяемой при НТН. Критерии исключения: наличие противопоказаний к проведению МРТ и рТМС; отказ пациента от участия; развитие тяжелых нежелательных явлений; наступление беременности. Всем пациентам проводили терапию блокаторами натриевых каналов в неизменной дозировке в течение не менее месяца перед включением в исследование. Другие препараты, воздействующие на ЦНС, пациенты не получали.

Нейровизуализационное обследование

Всем пациентам проводили нейровизуализационное обследование на магнитно-резонансном томографе Siemens Magnetom Verio (Erlangen, Siemens; Германия) с величиной магнитной индукции 3 Тл.

С целью получения анатомических данных был использован режим T1-взвешенных изображений с изотропным вокселем с возможностью реконструкции изображений в любых проекциях (MPR) (TR 1900 мс, TE 2,47 мс, толщина среза 1 мм, число срезов 176, время сканирования 4 мин 18 с). Полученные структурные данные были использованы как для анализа методом воксель-ориентированной морфометрии (BOM), так и для нейронавигации и ориентирования катушки при рТМС. Для анализа BOM предобработку структурных изображений проводили с использованием программного пакета SPM 12 по методу Dartel для воксель-ориентированной морфометрии [16]; предобработка включала следующие шаги: сегментация изображений на компоненты, соответствующие различным тканям; создание общего шаблона для группы испытуемых (пациентов с НТН) и определение нелинейных преобразований, приводящих изображения в соответствие с шаблоном, с помощью алгоритма Dartel; нормализация к шаблону MNI с модуляцией, сохраняющей количество вещества ткани, и сглаживание с гауссовским ядром (FWHM = 10 мм). Статистический анализ полученных изображений проводили с помощью пакета SPM 12. Анализировали относительные объемы серого вещества головного мозга (CBGM), для чего изображение для каждого испытуемого нормировали на объем мозга.

С целью получения данных фМРТ покоя для проведения анализа ФК был использован режим «мультипланарное градиентное эхо» (ep2d_bold_moco: TR 2400 мс, TE 30 мс; flip angle 90°, matrix 64 × 64; FoV 192 × 192 мм², 36 срезов в аксиальной проекции). Препроцессинг полученных нейровизуализационных данных проводили с помощью ПО CONN functional connectivity toolbox, версия 17f (Alfonso Nieto-Castanon; США), и SPM12 (The Wellcome Centre for Human Neuroimaging; Великобритания); он состоял из следующих шагов: выравнивание функциональных изображений (коррекция движений головы в томографе

Таблица 1. Зоны интереса (по Henssen, 2019), использованные для анализа клиничко-нейровизуализационных корреляций между выраженностью клинического эффекта рТМС и структурными и функциональными особенностями головного мозга

Кластер	Извилина/область	Зона по Бродману	П/Л	Объем кластера, мм ³	Координаты кластера (MNI) x, y, z, мм		
1	Подушка таламуса		Л	880	-11,1	-27,2	7,1
2	Верхняя височная извилина	22	Л	736	-49,8	-17,8	4,7
3	Паратерминальная извилина	47	Л	592	-13,7	22,2	-10
4	Островок	13	П	552	29,3	-21,9	16,2
5	Таламус		П	520	5,2	-8,7	5,4
6	Поясная извилина	31	П	520	4,9	-42,7	28,3
7	Средняя височная извилина	21	П	496	39	-6,8	-12,8
8	Головка хвостатого ядра		П	360	7,6	8,2	-5,1
9	Скорлупа		Л	296	-23,3	-7,8	7,7
10	Поперечная височная извилина	41	П	216	35,8	-32,3	11
11	Головка хвостатого ядра		Л	136	-8,5	7,8	1,9
12	Прецентральная извилина	6	Л	136	-55,9	0,7	27,5
13	Передняя поясная кора	24	Л	128	-1,7	33,7	8
14	Скорлупа		Л	120	-20,6	7,7	3,7
15	Передняя мозжечковая доля		Л	112	-3,6	-43,9	-7,3
16	Медиальная лобная извилина	10	П	112	17,8	60,6	2,1
17	Средняя лобная извилина	9	П	112	48,7	12	33,3
18	Постцентральная извилина	1	Л	112	-53,5	-18,7	45,8
19	Островок	13	П	104	34,3	12,7	-8,3
20	Кулмен		П	104	6,3	-48	-5,4
21	Предклинье	31	П	104	9,7	-62,3	27,2
22	Медиальная лобная извилина	9	П	104	10	27,4	32,3

Примечание: П — правое полушарие; Л — левое полушарие.

во время проведения исследования); коррекция времени срезов; корегистрация структурных и функциональных изображений; сегментация структурных изображений, нормализация в стандартное пространство MNI (Montreal Neurological Institute); обнаружение/удаление выбросов с помощью инструмента для обнаружения артефактов (ART) и пространственное сглаживание с гауссовским ядром шириной 8 мм. При этом для каждого пациента проводили контроль общего числа сканов-выбросов (менее половины). Полученный в результате вышеописанной обработки сигнал был отфильтрован по частоте в интервале 0,008–0,09 Гц.

Навигационная рТМС

Навигационную рТМС проводили на аппарате Magstim Rapid2 (The Magstim Company Ltd; Великобритания), калиброванном под навигационную систему NBS Eximia Nexstim (Nexstim Plc.; Финляндия). Всем пациентам проводили 10 сессий (по 5 сессий в неделю, ежедневно с перерывом на два выходных дня) высокочастотной рТМС первичной моторной коры полушария, контрлатерального локализации боли (частота стимуляции — 10 Гц, интенсивность стимуляции — 90% моторного порога покоя, длительность пачки импульсов — 4 с, интервал между пачками — 26 с, 1600 стимулов/сессия). В качестве мишени использовали «горячую точку» короткой мышцы, отводящий большой палец кисти на одноименной с локализацией боли стороне тела. Моторный порог покоя определяли однократно перед началом первой сессии стимуляции согласно алгоритму Rossini–Rothwell. В течение сессии, а также в последующие дни стимуляции с помощью системы нейронавигации проводили контроль

постоянства локализации катушки в пределах заданной мишени. Клинический обезболивающий эффект рТМС оценивали с помощью числовой аналоговой шкалы. Оценивали как максимальную, так и среднюю интенсивность болевого синдрома до и непосредственно после завершения 10 сессий рТМС. Статистический анализ проводили с помощью ПО MATLAB R2017a (Mathworks, Inc.; США); использовали W-критерий Уилкоксона. Порог статистической значимости был установлен на уровне $p = 0,05$.

Исследование клиничко-нейровизуализационных корреляций

Для анализа нейровизуализационных биомаркеров клинической эффективности ритмической транскраниальной магнитной стимуляции проводили анализ корреляций изменения средней (и максимальной — при анализе BOM) интенсивности боли по числовой аналоговой шкале с ФК и объемом СВГМ (до рТМС) в зонах, в которых по данным метаанализа [17] объем серого вещества у пациентов значимо меньше, чем у здоровых добровольцев (табл. 1).

У пациентов с левосторонней локализацией болевого синдрома ($n = 4$) проводили зеркальное обращение данных таким образом, чтобы у всех пациентов сторона боли была справа. Для анализа функциональных биомаркеров проводили оценку корреляции среднего сигнала в каждой зоне интереса со всеми вокселями мозга (seed-based analysis). Значимость эффектов в полученных статистических параметрических картах оценивали на основе теории гауссовских случайных полей. Применяли воксельный порог, соответствующий уровню значимости 0,001 (без коррекции), с последующим отбором значимых

Таблица 2. Корреляции объема серого вещества и эффекта рТМС

Клинический параметр	Зона, объем серого вещества в которой положительно коррелирует с эффектом рТМС	ROI (координаты), x, y, z (по Henssen et al., 2019)	p (unc)
Снижение средней интенсивности болевого синдрома	Хвостатое ядро (И)	7,6 8,2 -5,1	0,033
	Хвостатое ядро (К)	-8,5 7,8 1,9	0,034
	Передняя доля мозжечка (К)	-3,6 -43,9 -7,3	0,002
	Постцентральная извилина (К)	-53,5 -18,7 45,8	0,005
	Кульмен (И)	6,3 -48 -5,4	0,003
Снижение максимальной интенсивности болевого пароксизма	Хвостатое ядро (К)	-8,5 7,8 1,9	0,04
	Кульмен (И)	6,3 -48 -5,4	0,033

Примечание: К — область локализована в полушарии, контрлатеральном локализации болевого синдрома; И — область локализована в полушарии, ипсилатеральном локализации болевого синдрома.

кластеров с контролем групповой вероятности ошибки первого рода (FWER) на уровне 0,05 (двусторонний тест). Коррекцию на число зон интереса не производили. Для оценки структурных биомаркеров проводили также регрессионный анализ связи объема серого вещества в зонах интереса с изменением средней и максимальной интенсивности боли. Данный анализ осуществляли с использованием инструмента MarsBaR (Matthew Brett; Великобритания) для пакета SPM, с порогом значимости 0,05 без коррекции на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Информированное согласие на участие в исследовании подписали 20 пациентов. Два пациента выбыли из исследования по собственному желанию после 4-й и 7-й сессий рТМС соответственно из-за логистических трудностей, данные еще одного пациента были исключены

из анализа в связи с наличием выраженных артефактов от движения. Таким образом, в итоговый анализ вошли данные 17 пациентов (медиана возраста — 56 лет [38; 65]).

При оценке эффектов навигационной ритмической транскраниальной магнитной стимуляции было выявлено статистически значимое уменьшение как максимальной ($p = 0,01$), так и средней ($p < 0,01$) интенсивности болевого синдрома по числовой аналоговой шкале боли. При этом у половины пациентов анальгетический эффект был клинически значимым: максимальная интенсивность болевого синдрома снизилась более чем на 30% от исходного уровня.

При анализе корреляций между снижением максимальной и средней интенсивности болевого синдрома по числовой аналоговой шкале и объемом СВГМ в зонах интереса, найденных в метаанализе [17], было показано, что снижение средней интенсивности болевого синдрома тем сильнее, чем выше объем СВГМ

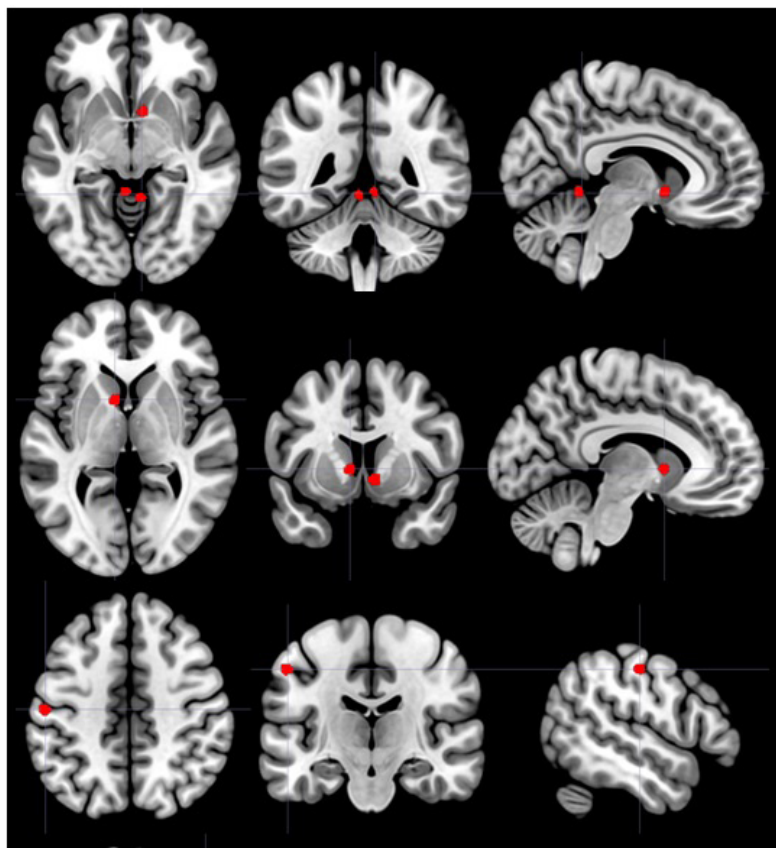


Рис. 1. Области головного мозга, объем серого вещества в которых положительно коррелирует со снижением максимальной или средней интенсивности болевого синдрома ($p(\text{unc}) < 0,05$)

Таблица 3. Корреляции функциональной коннективности областей головного мозга и эффекта рТМС на снижение средней интенсивности болевого синдрома. Представлены значения p с коррекцией FWE для кластеров в рамках каждой из карт коннективности для зон интереса, без коррекции на число этих зон (описаны кластеры с $p(\text{FWE}) < 0,05$)

Область интереса	Анатомические области	Координаты кластера (MNI) x, y, z, мм	Объем кластера, мм ³	p (FWE)	Знак корреляции
Таламус (К)	Постцентральная извилина (И) Покрышка островка (И)	+60 -16 +18	133	0,018	+
Паратерминальная извилина (К)	Полушарие и ножка мозжечка (И)	+32 -62 -38	126	0,018	+
Поясная кора (И)	Передняя поясная кора (И)	+26 +34 +06	151	0,017	+
Скорлупа (К)	Затылочный полюс (И) Веретенообразная извилина (И)	+20 -100 +00	211	0,001	-
	Затылочный полюс (К) Латеральная затылочная кора (К)	-18 -100 -08	195	0,002	-

Примечание: К — область локализована в полушарии, контрлатеральном локализации болевого синдрома; И — область локализована в полушарии, ипсилатеральном локализации болевого синдрома.

в области хвостатых ядер билатерально, в постцентральной извилине, контрлатеральной локализации болевого синдрома и в мозжечке билатерально (табл. 2).

Снижение максимальной интенсивности болевого синдрома, в свою очередь, положительно коррелировало с объемом СВГМ в области хвостатого ядра контрлатерально локализации болевого синдрома и мозжечка ипсилатерально (табл. 2; рис. 1).

При анализе корреляций между клиническим эффектом рТМС и функциональной коннективностью в регионах интереса, найденных в метаанализе [17], была продемонстрирована положительная связь снижения средней интенсивности болевого синдрома по числовой аналоговой шкале с коннективностью между таламусом (контрлатерально локализации болевого синдрома) и постцентральной извилиной и покрывшей островка ипсилатерально локализации болевого синдрома (табл. 3).

Кроме того, положительная корреляционная связь со снижением средней интенсивности болевого синдрома была показана для ФК между поясной корой полушария, ипсилатерального локализации боли, и передними отделами поясной коры того же полушария, а также для

ФК между паратерминальной извилиной полушария, контрлатерального боли, и противоположным полушарием и ножкой мозжечка. Отрицательная корреляция со снижением средней интенсивности боли показана для ФК между скорлупой, контрлатеральной локализации боли, и затылочными долями обоих полушарий (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования у пациентов с НТН после курса высокочастотной навигационной ритмической ТМС продемонстрировано значимое уменьшение максимальной и средней интенсивности боли. Кроме того, показано, что эффект стимуляции коррелирует с рядом анатомических и функциональных изменений структур центральной нервной системы, регистрируемых до начала стимуляции. В частности, выявлены разнонаправленные корреляционные связи между эффектом рТМС и функциональной коннективностью зон, осуществляющих первичный процессинг болевого сигнала (например, таламуса, постцентральной извилины), а также участвующих в аффективной оценке боли и формировании

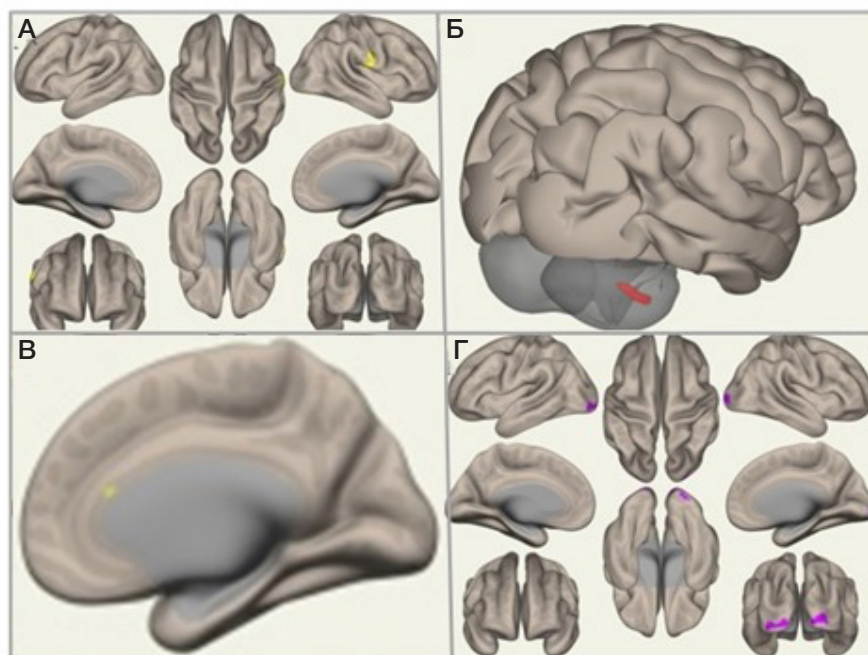


Рис. 2. Области головного мозга, для которых показана связь ФК со снижением средней интенсивности болевого синдрома ($p(\text{FWE}) < 0,05$). А. Таламус, контрлатерально локализации боли. Б. Паратерминальная извилина контрлатерально локализации боли. В. Поясная кора ипсилатерально локализации боли. Г. Скорлупа ипсилатерально локализации боли

поведенческих реакций (например, островок, поясная кора). При исследовании структурных биомаркеров было продемонстрировано, что эффект рТМС тем сильнее, чем выше объем СВГМ в области хвостатых ядер, постцентральной извилины и мозжечка.

Перед более подробным обсуждением конкретных зон, их роли и функциональной значимости в развитии обсуждаемой нозологии и эффектов стимуляции необходимо отметить такую методологическую особенность нашего исследования, как использование зеркального обращения нейровизуализационных данных: данные пациентов с левосторонней локализацией болевого синдрома были обращены, таким образом, при групповом анализе у всех пациентов левое полушарие оказывалось контрлатеральным болевому синдрому. Целью обращения было получение более однородных данных в первую очередь в областях, ассоциированных с передачей и первичной обработкой болевого сигнала (таламус, первичные соматосенсорные области, островок контрлатерального полушария и др.). В то же время подобное обращение привело к повышению гетерогенности сигнала от структур, для которых показана структурная и функциональная право-левая асимметрия. Например, в исследованиях на больших выборках с использованием метода BOM показана асимметрия в области лобного, височного, затылочного полюсов, извилин Гешля, гиппокампа, речевых зон и др. [18]. Схожая ситуация продемонстрирована и при исследовании функциональной коннективности, причем зонами с наибольшей асимметрией тоже являлись ассоциативные зоны лобных, височных и затылочных долей, речевые зоны [19]. В исследовании [20] при сопоставлении объема СВГМ у пациентов с НТН и здоровых добровольцев при использовании необращенных данных были выявлены те же зоны, что и при использовании обращенных, но сила эффекта была меньше. Таким образом, опираясь на полученные ранее результаты, мы применили обращение данных. Однако стоит отметить, что это могло стать одной из причин отсутствия выявления ожидаемых корреляций эффекта рТМС в зонах дорсолатеральной префронтальной коры, верхней и средней височной извилин, для которых продемонстрированы структурные и функциональные изменения у пациентов с НТН по сравнению со здоровыми добровольцами.

Среди зон, функциональная коннективность между которыми, по результатам нашего исследования, связана с эффектом рТМС, обращает на себя внимание таламус в полушарии, контрлатеральном локализации болевого синдрома. Ядра таламуса являются центральным реле для ноцицептивной импульсации, поступающей от чувствительных ядер тройничного нерва по пути в первичную соматосенсорную кору, таким образом таламус представляет собой ключевой регион, участвующий в процессинге болевой чувствительности. Деструкция определенного комплекса ядер таламуса с использованием гамма-ножа у пациентов с фармакорезистентной НТН эффективно уменьшает выраженность боли, не приводя к формированию сенсорного дефицита [21]. Важно учитывать также возможную роль таламуса непосредственно в генерации рТМС-вызванного анальгетического эффекта. В экспериментах на крысах, например, продемонстрировано, что инвазивная электрическая стимуляция моторной коры подавляет активность нейронов отдельных ядер таламуса [22]. Таким образом, выявленные корреляции ФК таламуса с эффектом

рТМС могут быть ассоциированы с разнообразной ролью ядер таламуса в процессинге болевой чувствительности, формировании хронического болевого синдрома и ответа на стимуляцию моторной коры.

В нашем исследовании была также выявлена корреляция между эффектом рТМС и функциональной коннективностью передних отделов поясной коры. Принято считать, что передняя поясная кора играет важную роль в формировании и поддержании нейропатической боли, в частности, участвует в модуляции и обработке болевого аффекта [23]. Более того, ингибирование передней поясной коры с помощью методов оптогенетики у крыс с моделью нейропатии тройничного нерва уменьшает выраженность поведения, ассоциированного с болью, а также ингибирует патологическую активность сенсорных нейронов таламуса [24]. Однако на моделях деафферентационной боли продемонстрировано, что обезболивающий эффект прямой электрической стимуляции моторной коры ассоциирован с активацией передней поясной коры [25]. Несмотря на противоречивые данные о связи активности передней поясной коры и болевого синдрома очевидно, что модуляция этой области может быть ассоциирована с изменением интенсивности болевого синдрома, преимущественно за счет воздействия на аффективную обработку болевых сигналов.

В ходе исследования продемонстрирована связь между объемом СВГМ и функциональной коннективностью структур полосатого тела, таких как скорлупа и хвостатое ядро, с эффектом рТМС. Полученные данные находят подтверждение и в экспериментальных работах: например, в исследовании на макаках с применением ПЭТ после проведения рТМС первичной моторной коры отмечалось увеличение концентрации внеклеточного дофамина в вентральных отделах полосатого тела и уменьшение — в области скорлупы [26]. В свою очередь, влияние на дофаминергическую нейротрансмиссию рассматривается как один из механизмов обезболивающего эффекта рТМС [7].

Наконец, интересной находкой исследования является выявление связи объема СВГМ структур мозжечка и эффекта рТМС. В одной из экспериментальных работ на животных моделях с применением ПЭТ показано уменьшение коннективности между мозжечком и отдельными префронтальными регионами у животных с нейропатической болью [27]. Получены подтверждения роли мозжечка в процессинге болевой чувствительности и формировании хронической боли, в частности, в структуры мозжечка поступает первичная ноцицептивная афферентация [28], в моделях острой и хронической боли зарегистрирована активация структур мозжечка [29], а электрическая стимуляция мозжечка может модулировать процессинг болевого сигнала [30]. Показано уменьшение объема СВГМ в структурах мозжечка у пациентов с НТН [17, 20].

Важно отметить, что выявленные в ходе нашего исследования зоны совпадают с зонами, изменения которых ассоциированы не только с НТН, но и с другими видами хронической боли [31], и это может свидетельствовать о том, что биомаркеры эффекта рТМС связаны с восприятием, интеграцией и процессингом болевого стимула, а также с механизмами, обеспечивающими хронизацию болевого синдрома, без четкой связи с конкретным заболеванием, что подтверждает эффективность рТМС при различных хронических болевых синдромах [32].

Одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед исследователями, является оптимизация

отбора конкретных методов терапии, которые улучшат состояние пациента в более короткие сроки, с меньшим числом побочных эффектов и меньшими финансовыми затратами. Методы отбора пациентов на основе нейровизуализационных данных интенсивно разрабатывают в психиатрии: изучают биомаркеры ответа на фармакологическую терапию, психотерапию, рТМС [12; 33]. Перспективным представляется развитие этого подхода и для других нозологий. Полученные нами результаты служат предпосылкой к разработке нейровизуализационных предикторов эффективности рТМС у пациентов с хроническими болевыми синдромами и подтверждают принципиальную осуществимость этого подхода в контексте методов неинвазивной стимуляции мозга.

Ограничения

К ограничениям проведенного исследования следует отнести отсутствие устранения эффекта множественных сравнений, связанного с числом исследованных зон. Ввиду этого найденные корреляции указывают зоны мозга с наибольшей вероятностью нахождения эффектов и требуют верификации в дальнейших исследованиях. Кроме того, возможность обобщения полученных результатов ограничена небольшим размером выборки. Наконец, в исследовании

отсутствовала контрольная группа, что не позволяет с полной уверенностью утверждать, что выявленные биомаркеры специфичны именно для активной, а не для плацебо-рТМС. Однако в предыдущих контролируемых исследованиях были получены убедительные доказательства преимущества эффекта активной рТМС над плацебо у пациентов с НТН [8], доля же респондеров в нашем исследовании соответствовала ранее полученным литературным данным [4].

Выводы

В ходе проведенного исследования впервые выявлены наиболее вероятные структурные и функциональные биомаркеры обезболивающего эффекта навигационной транскраниальной магнитной стимуляции у пациентов с НТН. Получены данные в пользу существования положительных и отрицательных корреляций эффекта рТМС с функциональной коннективностью таламуса, постцентральной извилины, коры островка, передней поясной коры и других регионов, а также с объемом СВГМ в области хвостатых ядер, постцентральной извилины и мозжечка. Результаты могут стать предпосылкой для разработки индивидуальных предикторов эффекта и персонализации методов неинвазивной стимуляции мозга у пациентов с хроническими болевыми синдромами.

Литература

- De Toledo IP, Conti Réus J, Fernandes M, Porporatti AL, Peres MA, Takaschima A, et al. Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2016; 147 (7): 570–6.e2.
- Bendtsen L, Zakrzewska JM, Abbott J, Braschinsky M, Di Stefano G, Donnet A, et al. European Academy of Neurology guideline on trigeminal neuralgia. *Eur J Neurol.* 2019; 26 (6): 831–49.
- Tomasello F, Esposito F, Abbritti RV, Angileri FF, Conti A, Cardali SM, et al. Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: Technical Refinement for Complication Avoidance. *World Neurosurg.* 2016; 94: 26–31.
- Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol.* 2020; 131 (2): 474–528.
- Хохлова Т. Ю., Степанченко А. В., Мамедов Т. Р., Григорьева С. Е., Жихорева Е. А. Транскраниальная магнитная стимуляция — современный метод лечения обострения невралгии тройничного нерва. Нейродиагностика и высокие биомедицинские технологии. 2007; (3): 32–38.
- Terranova C, Rizzo V, Cacciola A, Chillemi G, Calamuneri A, Milardi D, et al. Is There a Future for Non-invasive Brain Stimulation as a Therapeutic Tool? *Front Neurol.* 2019; 9: 1146.
- DosSantos MF, Oliveira AT, Ferreira NR, Carvalho ACP, Rosado de Castro PH. The Contribution of Endogenous Modulatory Systems to TMS- and tDCS-Induced Analgesia: Evidence from PET Studies. *Pain Res Manag.* 2018; 2018: 2368386.
- Herrero Babiloni A, Guay S, Nixdorf DR, de Beaumont L, Lavigne G. Non-invasive brain stimulation in chronic orofacial pain: a systematic review. *J Pain Res.* 2018; 11: 1445–57.
- Ayache SS, Ahad R, Chalah MA, Farhat WH, Mylius V, Goujon C, et al. Analgesic effects of navigated motor cortex rTMS in patients with chronic neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2016; 20 (9): 1413–22.
- Guerra A, López-Alonso V, Cheeran B, Suppa A. Variability in non-invasive brain stimulation studies: Reasons and results. *Neurosci Lett.* 2020; 719: 133330.
- Kar SK. Predictors of Response to Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Depression: A Review of Recent Updates. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2019; 17 (1): 25–33.
- Drysdale AT, Grosenick L, Downar J, Dunlop K, Mansouri F, Meng Y, et al. Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nat Med.* 2017; 23 (1): 28–38.
- Ge R, Downar J, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Vila-Rodriguez F. Functional connectivity of the anterior cingulate cortex predicts treatment outcome for rTMS in treatment-resistant depression at 3-month follow-up. *Brain Stimul.* 2020; 13 (1): 206–14.
- Furtado CP, Hoy KE, Maller JJ, Savage G, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. An investigation of medial temporal lobe changes and cognition following antidepressant response: a prospective rTMS study. *Brain Stimul.* 2013; 6 (3): 346–54.
- Poepl TB, Langguth B, Lehner A, Frodl T, Rupprecht R, Kreuzer PM, et al. Brain stimulation-induced neuroplasticity underlying therapeutic response in phantom sounds. *Hum Brain Mapp.* 2018 Jan; 39 (1): 554–62.
- Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *NeuroImage.* 2007; 38(1): 95–113.
- Henssen D, Dijk J, Kneplé R, Sieffers M, Winter A, Vissers K. Alterations in grey matter density and functional connectivity in trigeminal neuropathic pain and trigeminal neuralgia: A systematic review and meta-analysis. *Neuroimage Clin.* 2019; 24: 102039.
- Ocklenburg S, Friedrich P, Güntürkün O, Genç E. Voxel-wise grey matter asymmetry analysis in left- and right-handers. *Neurosci Lett.* 2016; 633: 210–4.
- Liang X, Zhao C, Jin X, Jiang Y, Yang L, Chen Y, et al. Sex-related human brain asymmetry in hemispheric functional gradients. *Neuroimage.* 2021; 229: 117761.
- Obermann M, Rodriguez-Raecke R, Naegel S, Holle D, Mueller D, Yoon MS, et al. Gray matter volume reduction reflects chronic pain in trigeminal neuralgia. *Neuroimage.* 2013; 74: 352–8.
- Lovo EE, Torres B, Campos F, Caceros V, Reyes WA, Barahona KC, et al. Stereotactic Gamma Ray Radiosurgery to the Centromedian and Parafascicular Complex of the Thalamus for Trigeminal Neuralgia and Other Complex Pain Syndromes. *Cureus.* 2019; 11 (12): e6421.
- Henssen D, Giesen E, van der Heiden M, Kerperien M, Lange S, van Cappellen van Walsum AM, et al. A systematic review of the

- proposed mechanisms underpinning pain relief by primary motor cortex stimulation in animals. *Neurosci Lett*. 2020; 719: 134489.
23. Xiao X, Zhang YQ. A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018; 90: 200–11.
 24. Moon HC, Heo WI, Kim YJ, Lee D, Won SY, Kim HR, et al. Optical inactivation of the anterior cingulate cortex modulate descending pain pathway in a rat model of trigeminal neuropathic pain created via chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *J Pain Res*. 2017; 10: 2355–64.
 25. Kudo K, Takahashi T, Suzuki S. The changes of c-Fos expression by motor cortex stimulation in the deafferentation pain model. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014; 54 (7): 537–44.
 26. Ohnishi T, Hayashi T, Okabe S, Nonaka I, Matsuda H, Iida H, et al. Endogenous dopamine release induced by repetitive transcranial magnetic stimulation over the primary motor cortex: an [¹¹C] raclopride positron emission tomography study in anesthetized macaque monkeys. *Biol Psychiatry*. 2004; 55 (5): 484–9.
 27. Kim CE, Kim YK, Chung G, Jeong JM, Lee DS, Kim J, et al. Large-scale plastic changes of the brain network in an animal model of neuropathic pain. *Neuroimage*. 2014; 98: 203–15.
 28. Cerminara NL, Koutsikou S, Lumb BM, Apps R. The periaqueductal grey modulates sensory input to the cerebellum: a role in coping behaviour? *Eur J Neurosci*. 2009; 29: 2197–206.
 29. Helmchen C, Mohr C, Erdmann C, Petersen D, Nitschke MF. Differential cerebellar activation related to perceived pain intensity during noxious thermal stimulation in humans: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett*. 2003; 335: 202–6.
 30. Moulton EA, Schmahmann JD, Becerra L, Borsook D. The cerebellum and pain: passive integrator or active participator? *Brain Res Rev*. 2010 Oct 5; 65 (1): 14–27.
 31. Yang S, Chang MC. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (13): 3130.
 32. Hamid P, Malik BH, Hussain ML. Noninvasive Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in Chronic Refractory Pain: A Systematic Review. *Cureus*. 2019; 11 (10): e6019.
 33. Fonseka TM, MacQueen GM, Kennedy SH. Neuroimaging biomarkers as predictors of treatment outcome in Major Depressive Disorder. *J Affect Disord*. 2018; 233: 21–35.

References

1. De Toledo IP, Conti Réus J, Fernandes M, Porporatti AL, Peres MA, Takaschima A, et al. Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2016; 147 (7): 570–6.e2.
2. Bendtsen L, Zakrzewska JM, Abbott J, Braschinsky M, Di Stefano G, Donnet A, et al. European Academy of Neurology guideline on trigeminal neuralgia. *Eur J Neurol*. 2019; 26 (6): 831–49.
3. Tomasello F, Esposito F, Abbritti RV, Angileri FF, Conti A, Cardali SM, et al. Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: Technical Refinement for Complication Avoidance. *World Neurosurg*. 2016; 94: 26–31.
4. Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020; 131 (2): 474–528.
5. Khokhlova TYu, Stepanchenko AV, Mamedov TR, Grigoreva SE, Zhikhoreva EA. ranskraniálnaya magnitnaya stimulyaciya — sovremennyy metod lecheniya obostreniya nevralgii trojnicnogo nerva. *Nejrodiagnostika i vy'sokie biomedicinskie tekhnologii*. 2007; (3): 32–38. Russian.
6. Terranova C, Rizzo V, Cacciola A, Chillemi G, Calamuneri A, Milardi D, et al. Is There a Future for Non-invasive Brain Stimulation as a Therapeutic Tool? *Front Neurol*. 2019; 9: 1146.
7. DosSantos MF, Oliveira AT, Ferreira NR, Carvalho ACP, Rosado de Castro PH. The Contribution of Endogenous Modulatory Systems to TMS- and tDCS-Induced Analgesia: Evidence from PET Studies. *Pain Res Manag*. 2018; 2018: 2368386.
8. Herrero Babiloni A, Guay S, Nixdorf DR, de Beaumont L, Lavigne G. Non-invasive brain stimulation in chronic orofacial pain: a systematic review. *J Pain Res*. 2018; 11: 1445–57.
9. Ayache SS, Ahdab R, Chalah MA, Farhat WH, Mylius V, Goujon C, et al. Analgesic effects of navigated motor cortex rTMS in patients with chronic neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2016; 20 (9): 1413–22.
10. Guerra A, López-Alonso V, Cheeran B, Suppa A. Variability in non-invasive brain stimulation studies: Reasons and results. *Neurosci Lett*. 2020; 719: 133330.
11. Kar SK. Predictors of Response to Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Depression: A Review of Recent Updates. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2019; 17 (1): 25–33.
12. Drysdale AT, Grosenick L, Downar J, Dunlop K, Mansouri F, Meng Y, et al. Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nat Med*. 2017; 23 (1): 28–38.
13. Ge R, Downar J, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Vila-Rodriguez F. Functional connectivity of the anterior cingulate cortex predicts treatment outcome for rTMS in treatment-resistant depression at 3-month follow-up. *Brain Stimul*. 2020; 13 (1): 206–14.
14. Furtado CP, Hoy KE, Maller JJ, Savage G, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. An investigation of medial temporal lobe changes and cognition following antidepressant response: a prospective rTMS study. *Brain Stimul*. 2013; 6 (3): 346–54.
15. Poepl TB, Langguth B, Lehner A, Frodl T, Rupprecht R, Kreuzer PM, et al. Brain stimulation-induced neuroplasticity underlying therapeutic response in phantom sounds. *Hum Brain Mapp*. 2018 Jan; 39 (1): 554–62.
16. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *NeuroImage*. 2007; 38(1): 95–113.
17. Henssen D, Dijk J, Kneplé R, Sieffers M, Winter A, Vissers K. Alterations in grey matter density and functional connectivity in trigeminal neuropathic pain and trigeminal neuralgia: A systematic review and meta-analysis. *Neuroimage Clin*. 2019; 24: 102039.
18. Ocklenburg S, Friedrich P, Güntürkün O, Genç E. Voxel-wise grey matter asymmetry analysis in left- and right-handers. *Neurosci Lett*. 2016; 633: 210–4.
19. Liang X, Zhao C, Jin X, Jiang Y, Yang L, Chen Y, et al. Sex-related human brain asymmetry in hemispheric functional gradients. *Neuroimage*. 2021; 229: 117761.
20. Obermann M, Rodriguez-Raecke R, Naegel S, Holle D, Mueller D, Yoon MS, et al. Gray matter volume reduction reflects chronic pain in trigeminal neuralgia. *Neuroimage*. 2013; 74: 352–8.
21. Lovo EE, Torres B, Campos F, Caceros V, Reyes WA, Barahona KC, et al. Stereotactic Gamma Ray Radiosurgery to the Centromedian and Parafascicular Complex of the Thalamus for Trigeminal Neuralgia and Other Complex Pain Syndromes. *Cureus*. 2019; 11 (12): e6421.
22. Henssen D, Giesen E, van der Heiden M, Kerperien M, Lange S, van Cappellen van Walsum AM, et al. A systematic review of the proposed mechanisms underpinning pain relief by primary motor cortex stimulation in animals. *Neurosci Lett*. 2020; 719: 134489.
23. Xiao X, Zhang YQ. A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018; 90: 200–11.
24. Moon HC, Heo WI, Kim YJ, Lee D, Won SY, Kim HR, et al. Optical inactivation of the anterior cingulate cortex modulate descending pain pathway in a rat model of trigeminal neuropathic pain created via chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *J Pain Res*. 2017; 10: 2355–64.
25. Kudo K, Takahashi T, Suzuki S. The changes of c-Fos expression by motor cortex stimulation in the deafferentation pain model. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014; 54 (7): 537–44.
26. Ohnishi T, Hayashi T, Okabe S, Nonaka I, Matsuda H, Iida H, et al. Endogenous dopamine release induced by repetitive transcranial magnetic stimulation over the primary motor cortex: an [¹¹C] raclopride positron emission tomography study in anesthetized macaque monkeys. *Biol Psychiatry*. 2004; 55 (5): 484–9.
27. Kim CE, Kim YK, Chung G, Jeong JM, Lee DS, Kim J, et al. Large-scale plastic changes of the brain network in an animal model of neuropathic pain. *Neuroimage*. 2014; 98: 203–15.

28. Cerminara NL, Koutsikou S, Lumb BM, Apps R. The periaqueductal grey modulates sensory input to the cerebellum: a role in coping behaviour? *Eur J Neurosci.* 2009; 29: 2197–206.
29. Helmchen C, Mohr C, Erdmann C, Petersen D, Nitschke MF. Differential cerebellar activation related to perceived pain intensity during noxious thermal stimulation in humans: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett.* 2003; 335: 202–6.
30. Moulton EA, Schmahmann JD, Becerra L, Borsook D. The cerebellum and pain: passive integrator or active participant? *Brain Res Rev.* 2010 Oct 5; 65 (1): 14–27.
31. Yang S, Chang MC. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (13): 3130.
32. Hamid P, Malik BH, Hussain ML. Noninvasive Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) in Chronic Refractory Pain: A Systematic Review. *Cureus.* 2019; 11 (10): e6019.
33. Fonseka TM, MacQueen GM, Kennedy SH. Neuroimaging biomarkers as predictors of treatment outcome in Major Depressive Disorder. *J Affect Disord.* 2018; 233: 21–35.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *CDKN2B-AS1* АССОЦИИРОВАН С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ У ЖЕНЩИН ЦЕНТРАЛЬНОГО ЧЕРНОЗЕМЬЯ РОССИИ

Н. В. Елисеева, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносков ✉

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) — это многофакторное заболевание, в развитии которого значимую роль играют наследственные факторы. Распространенность ПОУГ имеет гендерные особенности — заболевание чаще выявляют у женщин. Результаты полногеномных исследований (GWAS) свидетельствуют в пользу ассоциации полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ. Целью исследования было репликативное изучение ассоциаций полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин Центрального Черноземья России. У 290 пациенток с ПОУГ и 220 женщин контрольной группы было выполнено генотипирование пяти однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) гена *CDKN2B-AS1* — rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800 и rs4977756. При использовании алгоритма «Solid Spine» (заданный порог $D' > 0,8$) были выявлены различия в структуре блоков сцепления по исследуемым пяти SNP гена *CDKN2B-AS1* между больными ПОУГ (блоки сцепления отсутствовали) и контролем (установлен блок сцепления, состоящий из трех SNP — rs1063192, rs7865618 и rs2157719). У женщин гаплотип GGG rs1063192–rs7865618–rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* ассоциирован с ПОУГ — он является протективным фактором развития заболевания (OR = 0,66; $p = 0,006$, $p_{perm} = 0,037$).

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, *CDKN2B-AS1*, полиморфизм, ассоциации, женщины

Вклад авторов: Н. В. Елисеева — формирование выборки, молекулярно-генетические исследования, подготовка рукописи; И. В. Пономаренко — молекулярно-генетические исследования, статистическая обработка данных, подготовка рукописи; М. И. Чурносков — концепция исследования, редактирование рукописи; все авторы прочли и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 4 от 19 мая 2015 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Михаил Иванович Чурносков
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015; churnosov@bsu.edu.ru

Статья получена: 23.04.2021 Статья принята к печати: 24.05.2021 Опубликована онлайн: 28.05.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.023

CDKN2B-AS1 GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA IN WOMEN OF THE CENTRAL BLACK EARTH REGION, RUSSIA

Eliseeva NV, Ponomarenko IV, Churnosov MI ✉

Belgorod State University, Belgorod, Russia

Primary open-angle glaucoma (POAG) is a complex disorder. Genetic factors play a vital part in POAG. The prevalence of POAG is gender-specific: the disorder is more often diagnosed in women. Results of the genome-wide association studies (GWAS) strongly support the association of *CDKN2B-AS1* gene polymorphism with POAG. The aim was to perform the replicative study of *CDKN2B-AS1* gene polymorphic loci association with POAG in women of the Central Black Earth Region, Russia. Five *CDKN2B-AS1* gene single nucleotide polymorphisms (SNP), rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, and rs4977756, were genotyped in 290 female patients with POAG and 220 female controls. The differences in the haplotype block structure between the POAG patients (no haplotype blocks) and the controls (haplotype block consisting of three SNPs, rs1063192, rs7865618 and rs2157719, was detected) for the set of studied *CDKN2B-AS1* SNPs were revealed using the Solid Spine algorithm ($D' > 0,8$). *CDKN2B-AS1* gene haplotype GGG rs1063192–rs7865618–rs2157719 is associated with POAG in women. This haplotype is considered a protective factor of the disorder (OR = 0.66; $p = 0.006$, $p_{perm} = 0.037$).

Keywords: primary open-angle glaucoma, *CDKN2B-AS1*, polymorphism, associations, women

Author contribution: Eliseeva NV — sample design, molecular genetic testing, manuscript writing; Ponomarenko IV — molecular genetic testing, statistical analysis, manuscript writing; Churnosov MI — study concept, manuscript editing; the final version of the manuscript was read and approved by all authors.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Medicine of the Belgorod State University (protocol № 4 dated May 19, 2015); the informed consent to participation was submitted by all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Mikhail I. Churnosov
Pobedy St., 85, Belgorod, 308015; churnosov@bsu.edu.ru

Received: 23.04.2021 Accepted: 24.05.2021 Published online: 28.05.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.023

Глаукома — это заболевание, характеризующееся хронической прогрессирующей оптической нейропатией, при котором имеют место не связанные с другими глазными заболеваниями или врожденными аномалиями морфологические изменения в головке зрительного нерва, а также в нервных волокнах сетчатки [1]. Одной из самых распространенных форм глаукомы является первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) [2]. О медико-социальной значимости глаукомы свидетельствуют данные о неуклонном и стабильном росте заболеваемости, хроническом течении болезни с прогрессированием нарушений зрительных функций, в конечном итоге

приводящим к потере работоспособности и инвалидизации [1]. Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев ПОУГ диагностируют у пациентов в возрасте от 60 до 69 лет, нередко при наличии системных сопутствующих заболеваний. Заболевание почти в 1,5 раза чаще регистрируют у женщин [1–3].

В развитии ПОУГ значимую роль играют наследственные факторы [4]. Полученные к настоящему моменту молекулярно-генетические данные указывают на то, что в развитие ПОУГ вовлечены полиморфизмы ряда генов-кандидатов [4–6]. Несколько полногеномных исследований (GWAS) ПОУГ выявили ассоциации

полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с развитием заболевания [7–12].

Ген *CDKN2B-AS1* расположен в кластере генов *CDKN2B* и *CDKN2A* на хромосоме 9p21. Он относится к группе генов, контролирующих образование длинных некодирующих РНК (lncRNAs) [13]. Кодированная им lncRNA осуществляет взаимодействие с Polycomb-репрессивными комплексами 1 (PRC1) и 2 (PRC2), что обуславливает значительные эпигенетические изменения (процессы метилирования и моноубиквитинирования гистоновых белков хроматина и т. д.). Это, в свою очередь, приводит к существенным изменениям структуры хроматина и непосредственно влияет на экспрессию генов [13]. Следует отметить, что полученные для ПОУГ данные GWAS требуют проведения репликативных исследований в разных популяциях, для которых подобные исследования не были проведены к настоящему моменту — в том числе среди населения России.

Целью настоящей работы было исследовать ассоциации однонуклеотидного полиморфизма (SNP) гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин Центрального Черноземья России.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В выборку были включены 290 пациенток с ПОУГ и 220 женщин контрольной группы. Критерии включения: русская национальность, место рождения и проживания — Центрально-Черноземный регион России [14]. Критерии исключения: не русская национальность, место рождения и/или проживания — вне Центрально-Черноземного региона России.

В группу больных были включены индивидуумы с диагнозом ПОУГ, который был верифицирован в результате клинического и клинко-инструментального обследования пациентов. Диагностику ПОУГ осуществляли по следующим критериям [6]: высокое внутриглазное давление (ВГД выше 21 при пневмотонометрии и выше 25 при тонометрии по Маклакову), глаукоматозная экскавация диска зрительного нерва, характерные изменения периферического поля зрения. В контрольную группу включали индивидуумов, не имеющих ПОУГ (ВГД ниже 21 при пневмотонометрии и ниже 25 при тонометрии по Маклакову, отсутствие глаукоматозной экскавации диска зрительного нерва и характерных изменений периферического поля зрения), других заболеваний глаз и тяжелой сопутствующей соматической патологии, сопровождающейся поражением глаз.

Возраст и индекс массы тела (ИМТ) больных ПОУГ и контрольной группы, а также встречаемость сопутствующей соматической патологии в группах были сопоставимыми ($p > 0,05$) (табл. 1). Офтальмологическое обследование проводили в профильном отделении Белгородской областной клинической больницы святителя Иоасафа.

Объектом генетического исследования была геномная ДНК, полученная из периферической венозной крови фенол-хлороформным методом [15]. Однонуклеотидный полиморфизм гена *CDKN2B-AS1* был отобран для исследования на основании следующих критериев [16]: 1) ассоциации с ПОУГ по данным ранее проведенных полногеномных исследований; 2) значимый регуляторный потенциал; 3) распространенность минорного аллеля 5% и более.

Отбор SNP для исследования проводили с помощью каталога GWAS [17] и базы данных HaploReg [18]. В соответствии с обозначенными выше критериями в исследование были включены пять SNP гена *CDKN2B-AS1* — rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800 и rs4977756. Все пять SNP имели ассоциации с ПОУГ по данным ранее выполненных GWAS [7–12], характеризовались значимым регуляторным потенциалом (rs7865618, rs2157719, rs944800 находятся в регионе модифицированных гистоновых белков, маркирующих энхансеры; rs1063192, rs2157719, rs944800, rs4977756 расположены в участках повышенной чувствительности к ДНКазе 1; rs1063192, rs2157719, rs944800 локализованы в области регуляторных мотивов ДНК к различным факторам транскрипции), а частота их минорных аллелей превышала 5%.

Генотипирование образцов ДНК было выполнено на амплификаторе Real-Time CFX96 (Bio-Rad; США) методом TaqMan зондов с использованием специально разработанных коммерческих наборов («ТестГен»; Россия).

Изучение ассоциаций полиморфных локусов с ПОУГ проводили методом логистической регрессии в рамках аллельной (для полиморфизмов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs4977756 рассматривали аллели G vs. A при минорном аллеле G; для локуса rs944800 — A vs. G при минорном аллеле A), доминантной (для полиморфизмов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs4977756 — G/G + A/G vs. A/A; для rs944800 — A/A + G/A vs. G/G), аддитивной (G/G vs. A/G (G/A) vs. A/A) и рецессивной (для полиморфизмов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs4977756 — G/G vs. A/G + A/A; для rs944800 — A/A vs. G/A + G/G) генетических моделей в программе plink 1.06 [19] с коррекцией на ковариату — возраст. Оценку характера

Таблица 1. Медико-биологические и клинко-анамнестические характеристики изучаемых групп

Показатели	Больные	Контроль	p
	($n = 290$)	($n = 220$)	
Возраст, лет	62,24 ± 11,45	61,78 ± 11,06	0,45
ИМТ, кг/м ²	28,72 ± 5,19	28,57 ± 5,49	0,76
Сопутствующие соматические заболевания, % (n)			
Сердечно-сосудистой системы	80,69 (234)	74,55 (164)	0,12
Эндокринных органов	20,34 (59)	15,91 (35)	0,24
Пищеварительной системы	14,14 (41)	12,73 (28)	0,74
Мочевыделительной системы	7,58 (22)	7,27 (16)	0,99
Дыхательной системы	6,55 (19)	5,45 (12)	0,74
Нервной системы	18,28 (53)	17,27 (38)	0,86
Другие	3,45 (10)	3,18 (7)	1

ассоциации выполняли с использованием показателя отношения шансов (ОШ) и его 95%-го доверительного интервала (95% ДИ). Для коррекции на множественные сравнения использовали адаптивный пермутационный тест. Статистически значимым считали $p_{\text{perm}} < 0,05$.

Для оценки неравновесия по сцеплению и определения блоков сцепления пяти SNP гена *CDKN2B-AS1* использовали коэффициент D' Левонтина и коэффициент корреляции r^2 Пирсона. Анализ блоков сцепления проводили в программе Haploview v.4.2 [20] с помощью алгоритма «Solid Spine» при заданном пороге $D' > 0,8$. Визуализацию неравновесия по сцеплению между изучаемыми SNP гена *CDKN2B-AS1* выполняли в программном обеспечении Haploview v.4.2. Частоты гаплотипов определяли с помощью EM-алгоритма. Для оценки ассоциаций гаплотипов с ПОУГ использовали метод логистической регрессии (программа plink 1.06) с включением в анализ ковариаты (возраст) и коррекцией на множественные сравнения (выполняли пермутационный тест — проводили 1000 пермутаций). Оценку характера ассоциации гаплотипов с заболеванием осуществляли с использованием показателя отношения шансов (ОШ). Статистически значимым считали $p_{\text{perm}} < 0,05$ [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Популяционно-генетический анализ показал, что для распределения генотипов по всем пяти SNPs гена *CDKN2B-AS1* в группе больных ПОУГ и в контроле выполняется равновесие Харди–Вайнберга ($p_{\text{HWE}} > 0,05$) (табл. 2). Значимых ассоциаций рассматриваемых полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин выявлено не было (табл. 3).

Анализ неравновесия по сцеплению по исследуемым пяти полиморфизмам гена *CDKN2B-AS1* при использовании

алгоритма «Solid Spine» (заданный порог $D' > 0,8$) не выявил блоков сцепления у женщин, больных ПОУГ, при этом у женщин контрольной группы был выявлен блок сцепления, включающий три полиморфизма — rs1063192, rs7865618 и rs2157719 (см. рис.). Наряду с этим представленные на рисунке материалы указывают на наличие в контрольной группе «горячей точки» рекомбинации между локусами rs2157719 и rs944800 при очень низком уровне сцепления между rs944800 и rs4977756, а также выраженном сцеплении между локусом rs4977756 и тремя полиморфизмами (rs1063192, rs7865618 и rs2157719). При этом, если в группе контроля имеется зона с показателями D' около 0,4 (см. выше), то среди больных показатель D' для всех рассматриваемых полиморфизмов составляет около 0,6–0,7.

Установлена ассоциация гаплотипа GGG в рамках выявленного блока сцепления rs1063192–rs7865618–rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин. Рассчитанный для данного гаплотипа показатель ОШ составляет 0,66 (при $p = 0,006$ и $p_{\text{perm}} = 0,037$), что свидетельствует о протективном значении гаплотипа в отношении развития заболевания у женщин (табл. 4). Связь гаплотипа AGA с ПОУГ (ОШ = 5,12, $p = 0,009$) по результатам пермутационного теста не достигала статистически значимого уровня ($p_{\text{perm}} = 0,06$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнительном анализе пациенток с ПОУГ и женщин из контрольной группы по пяти SNP гена *CDKN2B-AS1* установлены различия в неравновесии по сцеплению между рассматриваемыми локусами (низкий уровень сцепления между отдельными локусами в контрольной группе при D' около 0,4 и практически «равномерном» сцеплении всех рассматриваемых локусов в группе больных при D'

Таблица 2. Характеристика распределения полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* среди пациенток с ПОУГ и женщин контрольной группы

Полиморфизм	Редкий аллель	Частый аллель	Частота редкого аллеля	Число изученных хромосом	Данные о распределении генотипов, количество (%) (гомозиготы по редкому аллелю/ гетерозиготы/ гомозиготы по частому аллелю)	Наблюдаемая гетерозиготность	Ожидаемая гетерозиготность	Уровень статистической значимости отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (P_{HWE})
Больные ПОУГ ($n = 290$)								
rs1063192	G	A	0,423	568	53/134/97 (18,66/47,18/34,16)	0,472	0,488	0,627
rs7865618	G	A	0,417	566	52/132/99 (18,38/46,64/34,98)	0,466	0,486	0,541
rs2157719	G	A	0,385	564	45/127/110 (15,96/45,03/39,01)	0,450	0,473	0,450
rs944800	A	G	0,338	574	32/130/125 (11,15/45,30/43,55)	0,453	0,448	0,896
rs4977756	G	A	0,476	572	61/150/75 (21,33/52,45/26,22)	0,525	0,499	0,409
Контрольная группа ($n = 220$)								
rs1063192	G	A	0,46	424	43/109/60 (20,28/51,42/28,30)	0,514	0,497	0,679
rs7865618	G	A	0,463	436	47/108/63 (21,56/49,54/28,90)	0,495	0,497	1,000
rs2157719	G	A	0,429	438	41/106/72 (18,72/48,40/32,88)	0,484	0,490	0,890
rs944800	A	G	0,368	440	28/106/86 (12,73/48,18/39,09)	0,482	0,465	0,665
rs4977756	G	A	0,459	438	46/109/64 (21,01/49,77/29,22)	0,498	0,497	1,000

около 0,6–0,7) и связанные с этим различия в структуре блоков сцепления (при использовании алгоритма «Solid Spine» и пороге $D' > 0,8$ у больных ПОУГ блоки сцепления отсутствовали, при этом у женщин из контрольной группы установлен блок сцепления, состоящий из трех SNP — rs1063192, rs7865618 и rs2157719). Показана ассоциация гаплотипа GGG rs1063192–rs7865618–rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин (ОШ = 0,66) и отсутствие значимых самостоятельных ассоциаций пяти анализируемых SNP гена *CDKN2B-AS1* с заболеванием.

Считается, что характер неравновесия по сцеплению в современных популяциях является результатом эволюционного процесса, отражающего как демографическую историю популяции (миграционные процессы, формирование определенной подразделенности и др.), так и ген-специфические факторы, связанные с частотой мутационного процесса и рекомбинаций, отбором и др. [22]. Несмотря на то что использование структуры LD при изучении многофакторных заболеваний человека ограничено популяционной специфичностью [22], считается, что использование в ассоциативных исследованиях гаплотипов, а не отдельных SNP позволяет существенно повысить статистическую мощность проводимого исследования, особенно в тех случаях, когда предрасполагающие к болезни локусы не

анализируют непосредственно, или при наличии высокой степени мультилокусного неравновесия по сцеплению [22, 23]. Непосредственное влияние на эффективность гаплотипических тестов оказывают генетическая дистанция между изучаемыми локусами и «причинной» мутацией, а также частоты аллелей и возраст «причинной» мутации [22].

Несмотря на то что в хромосомном регионе изученных в нашей работе SNP гена *CDKN2B-AS1* к настоящему моменту не было выявлено «очевидных» «причинных» в отношении ПОУГ мутаций (например, нонсенс-мутаций или мутаций, связанных с заменой аминокислот), в ряде работ показано важное функциональное значение полиморфных локусов этого региона (влияние на экспрессию генов *CDKN2A*, *CDKN2B* и др.) [8, 12].

Выявленные нами особенности неравновесия по сцеплению и связанные с этим особенности в выделении блока сцепления среди рассматриваемых пяти SNP гена *CDKN2B-AS1* в контрольной группе могут быть лишь «частной» картиной структуры гаплотипов в «локальном масштабе» этих пяти локусов. При увеличении количества анализируемых локусов «общая картина» неравновесия по сцеплению между множеством локусов данного региона хромосомы может значительно измениться (могут быть выявлены «горячие точки» рекомбинации между отдельными локусами и в группе больных, участки более

Таблица 3. Ассоциации полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин

Локусы	Аллели, генотипы	Больные, n (%)	Контроль, n (%)	ОШ (95% ДИ)	p
rs1063192	объем выборки	284	212		
	G vs. A (аллельная модель)	240/328 (42,25/57,75)	195/229 (45,99/54,01)	0,86 (0,67–1,11)	0,24
	G/G vs. A/G vs. A/A (аддитивная модель)	53/134/97 (18,66/47,18/34,16)	43/109/60 (20,28/51,42/28,30)	0,82 (0,61–1,10)	0,2
	G/G + A/G vs. A/A (доминантная модель)	187/97 (65,84/34,16)	152/60 (71,70/28,30)	0,69 (0,44–1,08)	0,1
	G/G vs. A/G + A/A (рецессивная модель)	53/231 (18,66/81,34)	43/169 (20,28/79,72)	0,90 (0,54–1,50)	0,68
rs7865618	объем выборки	283	218		
	G vs. A (аллельная модель)	236/330 (41,70/58,30)	202/234 (46,33/53,67)	0,83 (0,64–1,07)	0,14
	G/G vs. A/G vs. A/A (аддитивная модель)	52/132/99 (18,38/46,64/34,98)	47/108/63 (21,56/49,54/28,90)	0,89 (0,67–1,19)	0,43
	G/G + A/G vs. A/A (доминантная модель)	184/99 (65,02/34,98)	155/63 (71,10/28,90)	0,74 (0,47–1,15)	0,18
	G/G vs. A/G + A/A (рецессивная модель)	52/231 (18,38/81,62)	47/171 (21,56/78,44)	1,05 (0,63–1,75)	0,85
rs2157719	объем выборки	282	219		
	G vs. A (аллельная модель)	217/347 (38,48/61,52)	182/256 (42,92/57,08)	0,83 (0,64–1,07)	0,15
	G/G vs. A/G vs. A/A (аддитивная модель)	45/127/110 (15,96/45,03/39,01)	41/106/72 (18,72/48,40/32,88)	0,87 (0,65–1,16)	0,34
	G/G + A/G vs. A/A (доминантная модель)	172/110 (60,99/39,01)	147/72 (67,12/32,88)	0,74 (0,48–1,16)	0,19
	G/G vs. A/G + A/A (рецессивная модель)	45/237 (15,96/84,04)	41/178 (18,72/81,28)	0,97 (0,56–1,66)	0,91
rs944800	объем выборки	287	220		
	A vs. G (аллельная модель)	194/380 (33,80/66,20)	162/278 (36,82/63,18)	0,88 (0,67–1,14)	0,32
	A/A vs. G/A vs. G/G (аддитивная модель)	32/130/125 (11,15/45,30/43,55)	28/106/86 (12,73/48,18/39,09)	0,80 (0,59–1,08)	0,15
	A/A + G/A vs. G/G (доминантная модель)	162/125 (56,45/43,55)	134/86 (60,91/39,09)	0,75 (0,49–1,14)	0,18
	A/A vs. G/A + G/G (рецессивная модель)	32/255 (11,15/88,85)	28/192 (12,73/87,27)	0,74 (0,40–1,37)	0,34
rs4977756	объем выборки	286	219		
	G vs. A (аллельная модель)	272/300 (47,55/52,45)	201/237 (45,89/54,11)	1,07 (0,83–1,37)	0,6
	G/G vs. A/G vs. A/A (аддитивная модель)	61/150/75 (21,33/52,45/26,22)	46/109/64 (21,01/49,77/29,22)	1,11 (0,82–1,49)	0,5
	G/G + A/G vs. A/A (доминантная модель)	211/75 (73,78/26,22)	155/64 (70,78/29,22)	1,22 (0,76–1,93)	0,41
	G/G vs. A/G + A/A (рецессивная модель)	61/225 (21,33/78,67)	46/173 (21,01/78,99)	1,07 (0,64–1,76)	0,81

Примечание: результаты получены методом логистической регрессии; ОШ — отношение шансов, 95% ДИ — 95%-й доверительный интервал (нижняя–верхняя границы 95% ДИ); p — уровень статистической значимости.

выраженного сцепления в контрольной группе и др.), и в целом в «масштабе» значительно большего количества рассматриваемых локусов (нежели рассмотренные нами пять SNP) характер структуры LD в группе пациенток с ПОУГ и в контрольной группе будет иметь схожие черты. Так, например, в работе [24] при изучении неравновесия по сцеплению и блоков сцепления (авторы использовали алгоритм «Solid Spine» с заданным порогом $D' \geq 0,75$) между 12 SNP гена *MTNFR* у больных коронарным атеросклерозом, и в контрольной группе было выявлено три блока сцепления у больных и два блока сцепления в контроле. Кроме того, было показано более выраженное сцепление в 5'-области гена *MTNFR* у больных в сравнении с контролем. Несмотря на перечисленные выше отдельные отличающиеся «детали», анализируя «общую картину» неравновесия по сцеплению между 12 SNP гена *MTNFR*, авторы делают вывод о сходстве структуры LD в группе пациентов с коронарным атеросклерозом и в контрольной группе (есть схожие «горячие точки» рекомбинации, выявлен схожий блок сцепления 3'-области гена *MTNFR*).

Следует отметить, что полученные нами результаты по характеру ассоциаций (рисковое или протективное значение) отдельных аллелей в составе гаплотипа с глаукомой (гаплотип GGG rs1063192–rs7865618–rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* является протективным фактором развития ПОУГ у женщин, ОШ = 0,66) согласуются с имеющимися литературными данными по этой теме. Согласно данным полногеномного исследования [25], у европейского населения минорный аллель G rs1063192 ассоциирован с меньшим вертикальным размером диска зрительного нерва ($\beta = -0,014$ мм²; $p = 6 \times 10^{-11}$) (увеличение вертикального размера диска зрительного нерва является одним из признаков глаукоматозной нейропатии [26]), а, согласно данным GWAS [9] (получены в популяции Японии), минорный аллель G rs1063192 также имеет протективное значение в отношении развития ПОУГ (ОШ = 0,75, $p = 5 \times 10^{-11}$). Низкий риск развития открытоугольной глаукомы у индивидуумов (население Европы), имеющих в генотипе аллель G rs1063192 (как гомозиготы, ОШ = 0,76, так и гетерозиготы, ОШ = 0,85), обнаружен и в исследовании [27]. Ассоциации аллеля G rs1063192 с меньшим вертикальным размером диска зрительного нерва и его протективное значение в отношении развития ПОУГ в европейской популяции (ОШ = 0,73) показаны в работе [26]. Протективный характер ассоциации аллеля G rs1063192 как в отношении развития ПОУГ, так и в отношении формирования других разновидностей глаукомы в европейских и азиатских популяциях, также подтвержден результатами метаанализа [28]. Таким

образом, наши результаты, свидетельствующие в пользу протективной роли аллеля G rs1063192 гена *CDKN2B-AS1* (в составе гаплотипа GGG гапблока rs1063192–rs7865618–rs2157719) при формировании заболевания у женщин Центрального Черноземья России (ОШ = 0,66), согласуются с данными проведенных ранее исследований.

Для аллеля G rs7865618 гена *CDKN2B-AS1*, который, по данным настоящего исследования, в составе гаплотипа GGG гапблока rs1063192–rs7865618–rs2157719 является протективным фактором в отношении развития ПОУГ у женщин европейской части России (ОШ = 0,66), в более ранних исследованиях были получены следующие результаты. Согласно данным GWAS [8], аллель A rs7865618 повышает риск развития ПОУГ в японской популяции (ОШ = 1,56; $p = 2 \times 10^{-9}$); по данным полногеномных исследований [29, 30], аллель G rs7865618 гена *CDKN2B-AS1* ассоциирован с меньшим вертикальным размером диска зрительного нерва ($\beta = -0,013$; $p = 3 \times 10^{-20}$ для европейского населения) [29] и меньшей площадью экскавации ($\beta = -0,023$; $p = 1 \times 10^{-21}$ суммарно для европейской и азиатской популяции) [30]. Таким образом, следует отметить, что наши результаты и полученные ранее литературные данные о протективной роли аллеля G rs7865618 гена *CDKN2B-AS1* в отношении формирования ПОУГ и патогенетически значимых для ПОУГ признаков (вертикальный размер диска зрительного нерва, площадь экскавации) согласуются между собой.

Согласно литературным данным, аллель G rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* ассоциирован с низким риском развития ПОУГ в популяциях различного этнического состава (в азиатской популяции, у европейцев, афроамериканцев) [11, 12] и связан с меньшим вертикальным размером диска зрительного нерва ($\beta = -0,013$; $p = 4 \times 10^{-35}$ суммарно для европейской и азиатской популяции) [30]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами — аллель G rs2157719 в составе гаплотипа GGG гапблока rs1063192–rs7865618–rs2157719 является протективным фактором в отношении развития ПОУГ у женщин европейской части России (ОШ = 0,66).

Несмотря на то что в ряде GWAS были показаны значимые ассоциации SNP гена *CDKN2B* с глаукомой и связанными с глаукомой эндотипами (вертикальный размер диска зрительного нерва, площадь экскавации) [7–12, 25–30], результаты проведенных в различных популяциях репликативных исследований нередко неоднозначны и в ряде случаев, как указано в метаанализе [28] (в работе рассмотрен полиморфизм *CDKN2B-AS1* rs1063192), противоречивы. В ряде работ подтверждены ассоциации локусов гена *CDKN2B-AS1* с глаукомой/

Таблица 4. Ассоциации гаплотипов полиморфных локусов rs1063192–rs7865618–rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ у женщин

Гаплотип	Частота гаплотипа		ОШ	<i>p</i>
	Больные (<i>n</i> = 290)	Контроль (<i>n</i> = 220)		
GGG	0,287	0,377	0,66	0,006
AGG	0,03	0,021	2,22	0,075
GAG	0,026	0,008	2,87	0,127
AAG	0,039	0,023	1,92	0,145
GGA	0,066	0,049	1,43	0,321
AGA	0,031	0,014	5,12	0,009
GAA	0,045	0,033	1,67	0,215
AAA	0,475	0,475	0,9	0,483

Примечание: результаты получены методом логистической регрессии; ОШ — отношение шансов; *p* — уровень статистической значимости.

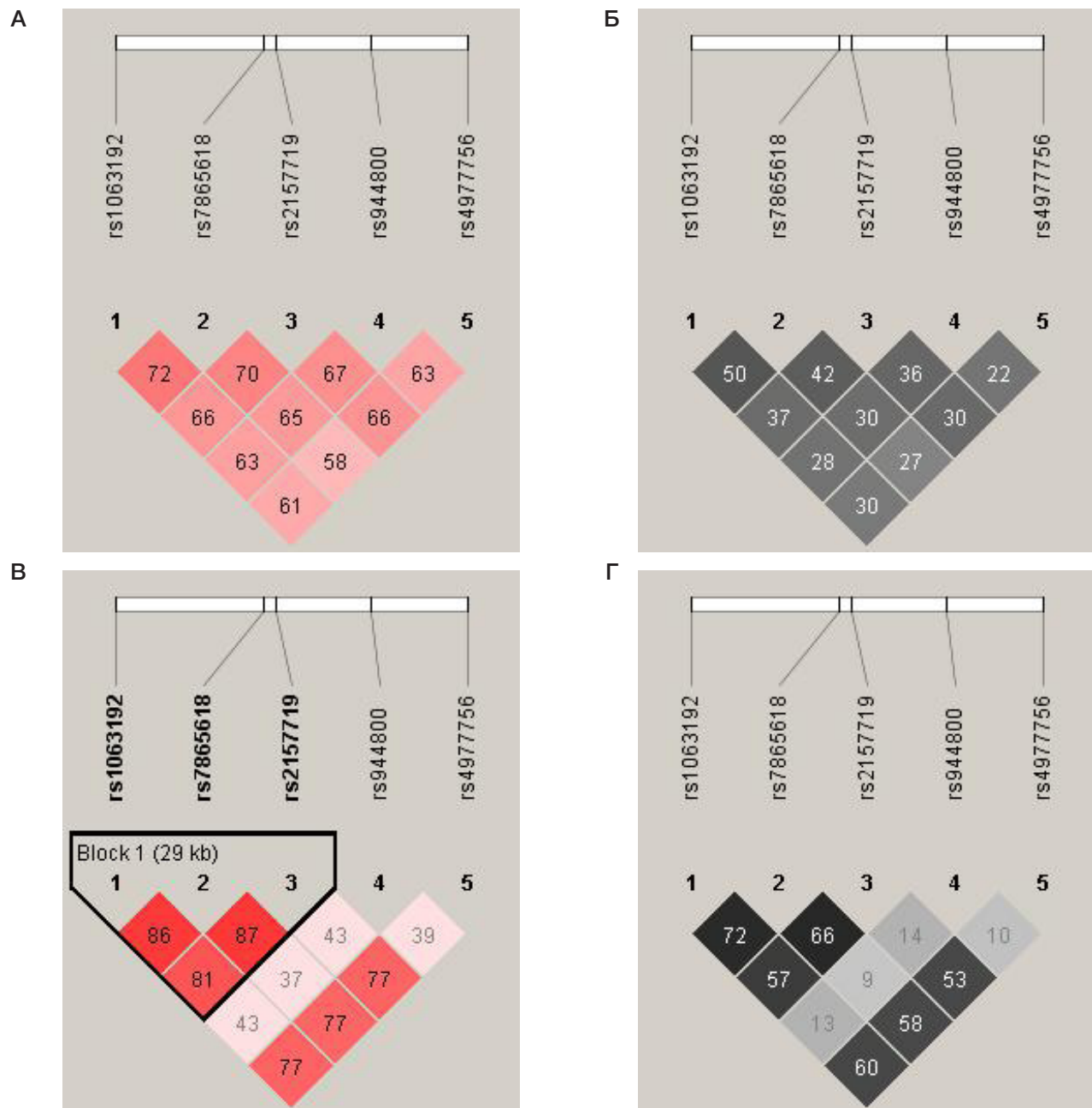


Рис. Характеристика структуры неравновесия по сцеплению между полиморфизмами гена *CDKN2B-AS1* (9p21.3) среди больных ПОУГ (А–Б) и в контроле (В–Г). На рисунках слева в ячейках указаны значения коэффициента сцепления D' по Левонтину (при $D' = 1$ ячейка пустая). Цвет ячейки отражает силу сцепления между полиморфизмами: красный — сильное сцепление ($D' = 1$; $LOD > 2$); розовый — значительное сцепление ($D' < 1$; $LOD > 2$); белый — слабое сцепление ($D' < 1$; $LOD < 2$). Черными линиями отмечены гаплотипические блоки. На рисунках справа в ячейках указаны значения коэффициента корреляции r^2 Пирсона

эндофенотипами, связанными с глаукомой (вертикальный размер диска зрительного нерва) [26, 28, 31, 32], в других работах связей отдельных SNP *CDKN2B-AS1* с заболеванием выявлено не было (например, rs1063192 и rs4977756 не ассоциированы с ПОУГ в популяции индийцев [33], афроамериканцев [34], а также у населения Пакистана [35]). О неоднозначности результатов ассоциативных исследований локусов *CDKN2B-AS1* с глаукомой наглядно свидетельствуют материалы, представленные в 2021 г. в работе [33], посвященной метаанализу нескольких SNP данного гена, в том числе рассматриваемых в нашей работе rs1063192, rs2157719 и rs4977756: так, для rs1063192 из рассмотренных в метаанализе материалов 18 ассоциативных исследований (в том числе шесть исследований ПОУГ у европеоидов)

на значимые связи с ПОУГ указывают лишь в 10 работах; для rs2157719 значимые ассоциации с ПОУГ показаны в трех из пяти рассмотренных работ; для rs4977756 лишь в четырех из 12 работ есть указания на значимые ассоциации с заболеванием. Еще одним наглядным примером неоднозначности данных о связи SNP гена *CDKN2B-AS1* с глаукомой являются результаты работы [34], в которой из 24 изученных локусов данного гена значимые ассоциации с ПОУГ показал только один локус у афроамериканцев (рассмотрена выборка из 1150 больных и 999 индивидуумов из контрольной группы), ассоциации какого-либо из этих 24-х SNP с заболеванием у населения западной Африки не выявлены (выборка представлена 483 больными и 593 индивидуумами из контрольной группы). Значимые самостоятельные ассоциации пяти SNP гена

CDKN2B-AS1 с ПОУГ у женщин европейской части России не выявлены и в нашей работе.

Причинами таких неоднозначных результатов могут быть клиническая гетерогенность исследуемых выборок больных и различия в этническом составе изучаемых популяций. Другие возможные причины неоднозначности результатов различных ассоциативных исследований — это «своеобразие» внешнесредовых факторов (экологических факторов, образа жизни и др.) в отдельных этнотерриториальных группах населения, особенности распространенности в них различных влияющих на развитие глаукомы мультифакторных заболеваний (атеросклероз, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца и др.) [1], а также связанный с указанными причинами «спектр» средовых факторов риска глаукомы, учитываемый или не учитываемый исследователями в их работах.

Несмотря на то что в настоящем исследовании не были установлены самостоятельные «главные» эффекты изучаемых локусов гена *CDKN2B-AS1* в отношении формирования ПОУГ у женщин, было показано, что сочетание в гаплотипе определенных аллелей трех рассмотренных SNP гена *CDKN2B-AS1* (GGG rs1063192–rs7865618–rs2157719) определяет подверженность ПОУГ у женщин Центрального Черноземья России. Значимая роль гаплотипов гена *CDKN2B-AS1* в формировании предрасположенности к ПОУГ показана и в популяции

индийцев [33]: CATA гаплотип rs3217992–rs1063192–rs2157719–rs4977756 в 1,61 раза повышает риск развития заболевания ($p \leq 0,0001$), при этом самостоятельные эффекты этих локусов с учетом поправки Бонферрони не были статистически значимыми. Можно предположить, что при одновременном присутствии в генотипе нескольких «рисковых» аллелей гена *CDKN2B-AS1* регуляторные эффекты, которыми они обладают [8, 12], суммируются и преодолевают некое «пороговое» значение, необходимое для формирования подверженности глаукоме в изученной нами популяции.

ВЫВОДЫ

Полученные данные указывают на различия в блоках сцепления по пяти исследуемым SNP гена *CDKN2B-AS1* между больными ПОУГ (блоки сцепления отсутствовали) и контролем (установлен блок сцепления, состоящий из трех SNP — rs1063192, rs7865618 и rs2157719) при использовании алгоритма «Solid Spine» (заданный порог $D' > 0,8$). Установлена связь гаплотипа GGG (rs1063192–rs7865618–rs2157719) гена *CDKN2B-AS1* с формированием ПОУГ у женщин Центрального Черноземья России. Данный гаплотип имеет протективное значение в отношении развития заболевания (OR = 0,66; $p = 0,006$, $p_{perm} = 0,037$).

Литература

- Grzybowski A, Och M, Kanclerz P, Leffler C, Moraes CG. Primary open angle glaucoma and vascular risk factors: a review of population based studies from 1990 to 2019. *J Clin Med*. 2020; 9 (3): 761.
- Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, Frech S. Prevalence, incidence and risk factors of primary open-angle glaucoma — a cohort study based on longitudinal data from a German public health in surname. *BMC Public Health*. 2019; 19: 851.
- Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014; 121: 2081–90.
- Liu Y, Allingham RR. Molecular genetics in glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011; 93: 331–9.
- Свинарева Д. И. Вклад ген-генных взаимодействий полиморфных локусов матриксных металлопротеиназ в подверженность к первичной открытоугольной глаукоме у мужчин. Научные результаты биомедицинских исследований. 2020; 6 (1): 63–77.
- Tikunova E, Otcharova V, Reshetnikov E, Dvornyk V, Polonikov A, Bushueva O, et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10: 1490–4.
- Gharahkhani P, Burdon KP, Fogarty R, Sharma S, Hewitt AW, Martin S, et al. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2014; (10): 1120–5.
- Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Ueno M, et al. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e33389.
- Osman W, Low SK, Takahashi A, Kubo M, Nakamura Y. A genome-wide association study in the Japanese population confirms 9p21 and 14q23 as susceptibility loci for primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(12): 2836–42.
- Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, Sato K, Shimozaawa N, Takahashi A, et al. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (8): 1486–96.
- Li Z, Allingham RR, Nakano M, Jia L, Chen Y, Ikeda Y, et al. A common variant near TGFB3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2015; 24 (13): 3880–92.
- Wiggs JL, Yaspan BL, Hauser MA, Kang JH, Allingham RR, Olson LM, et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet*. 2012; 8 (4): e1002654.
- GeneCards: The human gene database. Available from: <https://www.genecards.org/>.
- Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, Sorokina I, Yermachenko A, Dvornyk V, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia. *Gene*. 2020; 757: 144933.
- Litovkina O, Nekipelova E, Dvornyk V, Polonikov A, Efremova O, Zhernakova N, et al. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis. *Gene*. 2014; 546 (1): 112–6.
- Golovchenko O, Abramova M, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Aristova I, Polonikov A, et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020; 253: 52–7.
- GWAS Catalog. Available from: <http://www.genome.gov/gwastudies/>.
- HaploReg v4.1. Available from: <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>.
- PLINK. Available from: <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>.
- Haploview. Available from: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>.
- Moskalenko M, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Dvornyk V, Churnosov M. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 5224.
- Трифонов Е. А., Спиридонова М. Г., Степанов В. А. Генетическое разнообразие и неравновесие по сцеплению в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы. *Генетика*. 2008; 44 (10): 1410–19.
- Schaid DJ. Linkage disequilibrium testing when link age phase is unknown. *Genetics*. 2004; 166: 505–12.

24. Трифонова Е. А., Спиридонова М. Г., Габидулина Т. В., Урнов Ф. Д., Пузырев В. П., Степанов В. А. Анализ структуры неравномерности по сцеплению и ассоциации полиморфных вариантов гена MTHFR с коронарным атеросклерозом. *Генетика*. 2012; 48 (10):1207–20.
25. Ramdas WD, van Koolwijk LM, Ikram MK, Jansoni NM, de Jong PT, Bergen AA, et al. A genome-wide association study of optic disc parameters. *PLoS Genet*. 2010; 6 (6): e1000978.
26. Fan BJ, Wang DY, Pasquale LR, Haines JL, Wiggs JL. Genetic variants associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma in a US Caucasian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52 (3): 1788–92.
27. Ramdas WD, van Koolwijk LM, Lemij HG, Pasutto F, Cree AJ, Thorleifsson G, et al. Common genetic variants associated with open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 2464–71.
28. Hu Z, He C. CDKN2B gene rs1063192 polymorphism decreases the risk of glaucoma. *Oncotarget*. 2017; 8 (13): 21167–76.
29. Springelkamp H, Höhn R, Mishra A, Hysi PG, Khor CC, Loomis SJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci that influence cupping and the glaucomatous process. *Nat Commun*. 2014; 5: 4883.
30. Springelkamp H, Mishra A, Hysi PG, Gharahkhani P, Höhn R, Khor CC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci associated with optic disc morphology. *Genet Epidemiol*. 2015; 39 (3): 207–16.
31. Chen Y, Hughes G, Chen X, Qian S, Cao W, Wang L, et al. Genetic variants associated with different risks for high tension glaucoma and normal tension glaucoma in a Chinese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56 (4): 2595–600.
32. Nunes HF, Ananina G, Costa VP, Zanchin NIT, de Vasconcellos JPC, de Melo MB. Investigation of CAV1/CAV2 rs4236601 and CDKN2B-AS1 rs2157719 in primary open-angle glaucoma patients from Brazil. *Ophthalmic Genet*. 2018; 39: 194–9.
33. Thakur N, Kupani M, Mannan R, Pruthi A, Mehrotra S. Genetic association between CDKN2B/CDKN2B-AS1 gene polymorphisms with primary glaucoma in a North Indian cohort: an original study and an updated meta-analysis. *BMC Med Genomics*. 2021; 14 (1): 1.
34. Liu Y, Hauser MA, Akafo SK, Qin X, Miura S, Gibson JR, et al. Investigation of known genetic risk factors for primary open angle glaucoma in two populations of African ancestry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54 (9): 6248–54.
35. Micheal S, Ayub H, Khan MI, Bakker B, Schoenmaker-Koller FE, Ali M, et al. Association of known common genetic variants with primary open angle, primary angle closure, and pseudoexfoliation glaucoma in Pakistani cohorts. *Mol Vis*. 2014; 20: 1471–9.

References

1. Grzybowski A, Och M, Kanclerz P, Leffler C, Moraes CG. Primary open angle glaucoma and vascular risk factors: a review of population based studies from 1990 to 2019. *J Clin Med*. 2020; 9 (3): 761.
2. Kreft D, Doblhammer G, Guthoff RF, Frech S. Prevalence, incidence and risk factors of primary open-angle glaucoma — a cohort study based on longitudinal data from a German public health in surname. *BMC Public Health*. 2019; 19: 851.
3. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014; 121: 2081–90.
4. Liu Y, Allingham RR. Molecular genetics in glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011; 93: 331–9.
5. Svinareva DI. The contribution of gene-gene interactions of polymorphic loci of matrix metalloproteinases to susceptibility to primary open-angle glaucoma in men. *Research Results in Biomedicine*. 2020; 6 (1): 63–77. Russian.
6. Tikunova E, Ovtcharova V, Reshetnikov E, Dvornyk V, Polonikov A, Bushueva O, et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10: 1490–4.
7. Gharahkhani P, Burdon KP, Fogarty R, Sharma S, Hewitt AW, Martin S, et al. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2014; (10): 1120–5.
8. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Ueno M, et al. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e33389.
9. Osman W, Low SK, Takahashi A, Kubo M, Nakamura Y. A genome-wide association study in the Japanese population confirms 9p21 and 14q23 as susceptibility loci for primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(12): 2836–42.
10. Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, Sato K, Shimozawa N, Takahashi A, et al. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (8): 1486–96.
11. Li Z, Allingham RR, Nakano M, Jia L, Chen Y, Ikeda Y, et al. A common variant near TGFBR3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2015; 24 (13): 3880–92.
12. Wiggs JL, Yaspan BL, Hauser MA, Kang JH, Allingham RR, Olson LM, et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet*. 2012; 8 (4): e1002654.
13. GeneCards: The human gene database. Available from: <https://www.genecards.org/>.
14. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, Sorokina I, Yermachenko A, Dvornyk V, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia. *Gene*. 2020; 757: 144933.
15. Litovkina O, Nekipelova E, Dvornyk V, Polonikov A, Efremova O, Zhermakova N, et al. Genes involved in the regulation of vascular homeostasis determine renal survival rate in patients with chronic glomerulonephritis. *Gene*. 2014; 546 (1): 112–6.
16. Golovchenko O, Abramova M, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Aristova I, Polonikov A, et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020; 253: 52–7.
17. GWAS Catalog. Available from: <http://www.genome.gov/gwastudies/>.
18. HaploReg v4.1. Available from: <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>.
19. PLINK. Available from: <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>.
20. Haploview. Available from: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>.
21. Moskalenko M, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Dvornyk V, Churnosov M. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 5224.
22. Trifonova EA, Spiridonova MG, Stepanov VA. Genetic diversity and the structure of linkage disequilibrium in the methylenetetrahydrofolate reductase locus. *Genetika*. 2008; 44 (10): 1410–9. Russian.
23. Schaid DJ. Linkage disequilibrium testing when link age phase is unknown. *Genetics*. 2004; 166: 505–12.
24. Trifonova EA, Spiridonova MG, Gабидулина TV, Урнов FD, Пузырев VP, Stepanov VA. Analysis of the MTHFR gene linkage disequilibrium structure and association of polymorphic gene variants with coronary atherosclerosis. *Genetika*. 2012; 48 (10): 1207–20. Russian.
25. Ramdas WD, van Koolwijk LM, Ikram MK, Jansoni NM, de Jong PT, Bergen AA, et al. A genome-wide association study of optic disc parameters. *PLoS Genet*. 2010; 6 (6): e1000978.
26. Fan BJ, Wang DY, Pasquale LR, Haines JL, Wiggs JL. Genetic variants associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma in a US Caucasian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52 (3): 1788–92.
27. Ramdas WD, van Koolwijk LM, Lemij HG, Pasutto F, Cree AJ, Thorleifsson G, et al. Common genetic variants associated with open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 2464–71.
28. Hu Z, He C. CDKN2B gene rs1063192 polymorphism decreases the risk of glaucoma. *Oncotarget*. 2017; 8 (13): 21167–76.
29. Springelkamp H, Höhn R, Mishra A, Hysi PG, Khor CC, Loomis SJ,

- et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci that influence cupping and the glaucomatous process. *Nat Commun.* 2014; 5: 4883.
30. Springelkamp H, Mishra A, Hysi PG, Gharahkhani P, Höhn R, Khor CC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci associated with optic disc morphology. *Genet Epidemiol.* 2015; 39 (3): 207–16.
 31. Chen Y, Hughes G, Chen X, Qian S, Cao W, Wang L, et al. Genetic variants associated with different risks for high tension glaucoma and normal tension glaucoma in a Chinese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56 (4): 2595–600.
 32. Nunes HF, Ananina G, Costa VP, Zanchin NIT, de Vasconcellos JPC, de Melo MB. Investigation of CAV1/CAV2 rs4236601 and CDKN2B-AS1 rs2157719 in primary open-angle glaucoma patients from Brazil. *Ophthalmic Genet.* 2018; 39: 194–9.
 33. Thakur N, Kupani M, Mannan R, Pruthi A, Mehrotra S. Genetic association between CDKN2B/CDKN2B-AS1 gene polymorphisms with primary glaucoma in a North Indian cohort: an original study and an updated meta-analysis. *BMC Med Genomics.* 2021; 14 (1): 1.
 34. Liu Y, Hauser MA, Akafo SK, Qin X, Miura S, Gibson JR, et al. Investigation of known genetic risk factors for primary open angle glaucoma in two populations of African ancestry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54 (9): 6248–54.
 35. Micheal S, Ayub H, Khan MI, Bakker B, Schoenmaker-Koller FE, Ali M, et al. Association of known common genetic variants with primary open angle, primary angle closure, and pseudoexfoliation glaucoma in Pakistani cohorts. *Mol Vis.* 2014; 20: 1471–9.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК АУТОТРАНСПЛАНТАТОВ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Г. В. Максимов^{1,4}✉, Т. И. Сашкина², Д. К. Фасхутдинов³, О. В. Слатинская¹, И. В. Салдусова⁵, О. В. Зайченко⁵

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

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

³ Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

⁵ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

В настоящее время большой интерес представляют биофизические исследования, результаты которых важны для формирования методологии диагностики состояния ткани и клеток в клинической практике. Целью данной работы было продиагностировать изменения состава и конформации молекул клеток и ткани нижней челюсти пациента с помощью оптического неинвазивного метода (спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)). Данный методический подход предложен для повышения информативности и эффективности исследования состава аутоотрансплантатов, полученных для аугментации альвеолярных отростков при дефиците костной ткани (планируемая костная пластика). В исследовании использовали образцы костной ткани троих пациентов в возрасте 51–73 лет, двоих мужчин и одной женщины. В костной ткани обнаружены КР-сигналы, свидетельствующие о наличии фосфатных групп и карбонат-ионов (типа CO_3^{2-}) минеральных компонентов кости. Маркерами молекул околокостной ткани могут быть полосы, которые свидетельствуют о наличии коллагена, гемоглобина эритроцитов, белков (C–N-связи), липидов (C–H-групп жирных кислот и фосфатных групп фосфолипидов), а также их OH-групп. Показана принципиальная возможность исследования отдельных клеток аутоотрансплантатов с помощью маркеров, свидетельствующих о наличии коллагена, гемоглобина, белков и липидов (C–H-групп жирных кислот липидов; фосфатных групп фосфолипидов), и их OH-групп. По мнению авторов, результаты могут служить основой для формирования новой методологии диагностики костных аутоотрансплантатов с помощью совмещения КР-спектроскопии и световодов.

Ключевые слова: аутоотрансплантат, имплантат, костная ткань, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Вклад авторов: Г. В. Максимов — планирование работы, анализ результатов; Т. И. Сашкина — планирование работы, анализ научной литературы; Д. К. Фасхутдинов — сбор и анализ исследуемого материала, проведение операций аугментации костной ткани; О. В. Слатинская — обработка полученного материала; И. В. Салдусова — анализ полученных результатов; О. В. Зайченко — техническая поддержка.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Центральной государственной медицинской академии Управления делами Президента Российской Федерации (протокол № 3 от 23 сентября 2020 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании; работы с биоматериалами проведены с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Георгий Владимирович Максимов
Воробьевы горы, д. 1, корп. 24, г. Москва, 117042; gmaximov@mail.ru

Статья получена: 13.05.2021 **Статья принята к печати:** 31.05.2021 **Опубликована онлайн:** 17.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.028

MOLECULAR AND CELLULAR FEATURES OF MANDIBULAR AUTOGRAFTS STUDIED USING RAMAN SPECTROSCOPY

Maksimov GV^{1,4}✉, Sashkina TI², Fashutdinov DK³, Slatinskaya OV¹, Saldusova IV⁵, Zaychenko OV⁵

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

⁴ National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russia

⁵ Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russia

Currently, biophysical studies are of great interest, the results of which are important for development of a method for diagnosis of the cells and tissue condition to be used in clinical practice. The study was aimed to use a non-invasive optical method (Raman spectroscopy) for assessment of changes in the composition and conformation of the molecules of the patient's mandibular cells and tissues. This approach was proposed to increase the informativeness and effectiveness of studying the composition of autografts harvested for augmentation of alveolar processes with bone tissue deficiency (elective bone grafting). In the course of the study the bone tissue samples obtained from three patients aged 51–73 (two men and one woman) were assessed. Raman signals were detected, indicating the presence of phosphate groups and carbonate ions (such as CO_3^{2-}) of the inorganic bone components. Raman bands indicating the presence of collagen, red blood cell hemoglobin, proteins (C–N bonds), lipids (C–H groups of fatty acids and phosphate groups of phospholipids), as well as their OH groups may be considered the markers of periosteum tissue. The general possibility was suggested of studying single cells of autografts using the markers, indicating the presence of collagen, hemoglobin, proteins, lipids (C–H groups of fatty acids of lipids; phosphate groups of phospholipids), and their OH groups. According to the authors, the results obtained can provide a basis for development of the new method for diagnosis of autograft bone using the combination of Raman spectroscopy and light guides.

Keywords: autograft, implant, bone tissue, Raman spectroscopy

Author contribution: Maksimov GV — study planning, analysis of the results; Sashkina TI — study planning, literature analysis; Fashutdinov DK — data acquisition and analysis, performing bone grafting; Slatinskaya OV — data processing; Saldusova IV — data analysis; Zaychenko OV — technical support.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs of the Russian Federation (protocol № 3 dated September 23, 2021); the informed consent was submitted by all participants; biomaterials were treated in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Georgy V. Maksimov
Leninskie Gory, 1, str. 24, Moscow, 117042; gmaximov@mail.ru

Received: 13.05.2021 **Accepted:** 31.05.2021 **Published online:** 17.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.028

Известно, что дентальную имплантацию успешно используют для коррекции зубных рядов при частичной или полной адентии [1, 2]. Нередко к стоматологам обращаются пациенты со значительным дефицитом костной ткани в области альвеолярного отростка и части челюсти, что предполагает вмешательство по поводу увеличения объема костной ткани перед установкой имплантатов. При аугментации костной ткани используют алло- и аутоотрансплантаты, при этом аутоотрансплантаты предпочтительнее [3, 4]. Для этой процедуры подходит кортикальная аутокость из разных внеротовых областей организма: гребень подвздошной кости, свода черепа, участки большой берцовой кости, скуловой кости, а также внутриротовые (ветви нижней челюсти, участки ретромолярной области, подбородочная область). Внутриротовые аутоотрансплантаты используют чаще, поскольку их получение менее инвазивно, хирургический доступ более удобен, требуется меньше времени для установки. Важно также, что сокращается расстояние между донорской и реципиентской зоной [5, 6].

Процессы остеорегенерации зависят от ряда факторов: микроархитектоники, плотности кости, соотношения кортикальной и губчатой составляющих, уровня про- и противовоспалительных цитокинов, маркеров деструкции и восстановления костной ткани [7–10]. Известно, что челюсти — это плоские губчатые кости, состоящие из трабекул. Трабекулы формируют каркас для красного костного мозга, в котором происходит кроветворение и образуются клетки крови [11]. Пластинки трабекул на 95% образованы коллагеном 1-го типа, кроме того, в них присутствуют коллагены 3-, 4-, 5-, 11- и 12-го типов (оставшиеся 5%). В межклеточном пространстве имеются неколлагиновые белки остеокальцин, остеонектин, остеопонтин, костные сиалопротеины, фосфопротеины, морфогенетические белки и протеогликаны. Кроме того, оно включает гликопротеины: щелочную фосфатазу, остеонектин, тромбоспондин, фибронектин, витронектин, остеопонтин, сиалопротеин, Wht-гликопротеины. Минеральные компоненты занимают 30% состава костной ткани и представлены кристаллами гидроксиапатита. В состав кости входят также регуляторы стабильности гидроксиапатита — магний, стронций и марганец.

Клеточный состав костной ткани включает остеопрогениторные клетки (ранние предшественники остеобластов), остеобласты, остеоциты, выстилающие клетки и остеокласты. Зрелые остеобласты синтезируют коллаген 1-го типа, протеогликаны и остеокальцин. Незрелые прилегают непосредственно к надкостнице. В их цитоплазме в небольшом количестве имеются гранулы гликогена. Функция остеобластов — синтезировать органический матрикс кости, цитокины, факторы роста. Маркерами остеобластов служат щелочная фосфатаза и остеокальцин (основной маркер регенерации костной ткани). Окончательный этап дифференцировки остеобластов — образование остеоцитов. Они не синтезируют костный матрикс, участвуют в остеоллизе и обеспечивают транспортно-обменные процессы. Резорбцию костной ткани осуществляют крупные многоядерные клетки остеокласты. Они секретируют ионы водорода и ферменты катепсин и коллагеназу, лизирующие органический матрикс. Маркером остеокластов является кислая фосфатаза. Губчатая ткань снаружи покрыта кортикальной костью, а та в свою очередь надкостницей (периостом), в которой проходят питающие кость сосуды. Внутренний слой периоста содержит клетки-

предшественники остеобластов, обеспечивающие рост и обновление кости [11]. Изучение структуры костной ткани и ее составляющих имеет принципиальное значение для оценки и прогноза течения процессов регенерации, остеогенеза и остеоинтеграции при дентальной имплантации [12].

Очевидно, что в стоматологическую практику важно внедрять современные оптические методы, позволяющие эффективно, надежно и неинвазивно определять локализацию компонентов костной ткани, ротовой жидкости, а также продуктов периферической крови, для контроля структуры, резорбции и ремоделирования костной ткани. Оценка процессов интеграции при имплантации и аугментации в альвеолярных отростках актуальна для хирургической стоматологии и имеет принципиальное значение, поскольку определяет успех лечения.

Своевременная диагностика нарушений процессов остеоинтеграции и восстановления костной ткани крайне необходима. Известны маркеры резорбции, регенерации и протекторы костной ткани. Существует ряд методов, с помощью которых их можно определить. Биохимический анализ позволяет оценить результаты лечения и профилактики осложнений, но требует довольно большое количество анализируемого материала. Более точной является газовая хроматография, преимущество которой заключается в высокой достоверности результатов. Недостатком этого метода можно считать значительную сложность исследования, высокую стоимость, большие временные затраты на интерпретацию результатов и необходимость экспертной оценки.

В последние годы в биологии и медицине используют множество оптических методов. Одним из них является спектроскопия комбинационного рассеяния — оптический метод, обладающий высокой чувствительностью, позволяющей быстро и точно определять состав и конформацию молекул биологических объектов: клетки, их фрагменты, бактерии, вирусы, белки пептиды, липиды [13, 14]. Отметим, что в стоматологии появляются исследования с применением не только КР, но и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [15]. Этот подход обладает высокой чувствительностью и использовался для идентификации основных возбудителей гнойно-воспалительных процессов в челюстно-лицевой области [16]. Важно, что с помощью ГКР выявлены индивидуальные маркеры возбудителей: у бактерии *Bacillus subtilis* выявлены пики на 657, 726, 1248, 1377, 1466, 1617 см⁻¹; у *E. coli* — на 1140, 1551 см⁻¹; у *S. aureus* — на 959, 1006, 1160, 1284, 1530 см⁻¹; у *S. haemolyticus* — на 1327, 1369; для *Ps. aeruginosa* — на 675, 1353, 1404, 1605, 1630 см⁻¹. Таким образом, по спектрам ГКР в ходе лечения, можно выявить причину воспаления. Однако этот подход требует дальнейшего и детального апробирования на практике, так как для реализации ГКР необходимо использовать наночастицы (коллоиды серебра или золота), токсическое действие которых на состояние ткани и клеток ротовой полости пациента пока не известно.

Учитывая информативность и эффективность, отсутствие длительной пробоподготовки спектроскопии КР, важна разработка технологии оценки остеоинтеграции при дентальной имплантации с помощью метода КР для определения состояния костных аутоотрансплантатов и поиска маркеров остеогенеза, резорбции и остеоинтеграции в процессах репаративной регенерации.

Целью работы было исследовать молекулярно-клеточный состав аутоотрансплантатов с помощью спектроскопии КР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании проводили аугментацию костной ткани челюстей перед установкой имплантатов. Для этого пациентам проводили операцию по увеличению объема костной ткани с помощью аутоотрансплантата, состояние которого затем изучали. Объектом исследования были четыре образца кортикально-губчатой костной ткани, полученные в ходе хирургического вмешательства из ретромолярных областей нижней челюсти справа и слева (см. таблицу). Исследовали четыре аутоотрансплантата, взятых у троих пациентов в возрасте 51–73 лет, двоих мужчин и одной женщины. Критерии включения в исследование: отсутствие соматической патологии; костный дефект нижней челюсти средних размеров; отсутствие лекарственной непереносимости; возраст от 40 до 60 лет. Критерии исключения: наличие серьезной соматической патологии; лекарственная непереносимость; костный дефект нижней челюсти больших размеров; возраст моложе 40 лет и старше 60.

Ход операции по выделению костного блока из донорской области

Под проводниковой и инфильтрационной анестезией (sol. Articaini 3,4 мл) производили разрез по вершине альвеолярного отростка части нижней челюсти в области отсутствующих зубов, отслаивали слизисто-надкостничный лоскут, скелетировали альвеолярную часть нижней челюсти, определяли дефицит костной ткани по ширине или высоте. Под проводниковой и инфильтрационной анестезией (sol. Articaini 3,4 мл) проводили разрез в ретромолярной области слева и справа длиной 3 см, отслаивали слизисто-надкостничный лоскут. При помощи диска с защитным протектором и фиссурного бора производили забор аутоотрансплантата размером $2 \times 1 \times 0,3$ см или $1,5 \times 1 \times 0,3$ см. Костный аутоотрансплантат разделяли на две тонкие костные пластинки при помощи дисков. Рану ушивали, используя Викрил 4-0.

Образцы костных аутоотрансплантатов (размером около 0,1 мм) помещали в стеклянные капилляры диаметром поперечного сечения, равным 1 мм («Агат-Мед»; Россия) с буфером (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 5 mM глюкозы (Sigma; США), pH 7,4) и хранили при температуре 4 °C не более 3 ч.

Методом микроскопии КР исследовали морфологию объекта и молекулярный состав костной ткани, мягких тканей и клеток нижней челюсти. В работе использовали конфокальный микроскоп-спектрометр NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT; РФ) с регистрацией в диапазоне 1000–3000 см^{-1} , с шагом измерения 0,8 см^{-1} , регистратор — CCD детектор с Пельтье-охлаждением –50°C (объектив 20× с апертурой 0,15, решетка — 600 штр/мм); мощность лазера на образце составляла не более 3 мВт, длина волны возбуждения —

532 нм, время регистрации одного спектра — 10 с, число накоплений сигнала — 3. Число повторов для каждого эксперимента (образец) — 12. Обработка спектров включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров в программе Origin2017 (OriginLab Corporation; США).

Пилотное исследование выполняли с целью выяснения возможности использовать метод КР для оценки состояния тканей челюстно-лицевой области, статистическую обработку не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы были получены изображения материала и КР-спектры компонентов аутоотрансплантатов (костной ткани, мягких тканей и клетки) из ретромолярной области.

КР-спектры костной ткани аутоотрансплантатов, полученных из ретромолярной области

В результате анализа маркеров костной ткани аутоотрансплантатов в данной серии экспериментов было обнаружено, что КР-спектр образцов включает ряд характерных полос, которые соответствуют коллагену, фосфатным группам, PO_4^{3-} -апатиту, карбонат-иону В (типа CO_3^{2-}), а также адсорбированным на поверхности клеток молекулам белков (деформационное колебание N–H и валентное C–N белка), липидам (C–H-группы жирных кислот липидов) и их OH-группам.

Так, в КР-спектре пациента у объекта № 2 выявлен ряд полос, которые соответствуют фосфатным группам PO_4^{3-} (563, 943, 975 см^{-1}), коллагену (1270 см^{-1}), карбонат-иону В типа CO_3^{2-} (1025, 1051 см^{-1}), белкам и липидам (C–H-группам жирных кислот липидов — 2862, 2890, 2946 см^{-1} и их OH-группам (3192, 3420, 3559, 3635 см^{-1}) (рис. 1). Выявлен ряд полос, которые соответствуют фосфатным группам (426, 583, 938 см^{-1}), карбонат-иону В типа CO_3^{2-} (1009, 1023, 1056 см^{-1}), белкам (деформационное колебание N–H и валентное C–N белка — 1607 см^{-1}), липидам (C–H-группам жирных кислот липидов — 2857, 2889, 2948 см^{-1}) и их OH-группам (3204, 3408, 3621 см^{-1}), а также ряд полос, которые характеризуют минеральный состав костной ткани: фосфатные группы PO_4^{3-} (415, 457, 570, 580, 892, 936 см^{-1} (фосфатная группа апатита)), карбонат В типа CO_3^{2-} (1007, 1022, 1050 см^{-1}) и OH-группы липидов и белков — 3209, 3399, 3625 см^{-1}). Обнаружены полосы, которые характеризуют минеральный состав ткани: фосфатные группы PO_4^{3-} (567, 582, 941 см^{-1}), а также карбонат В типа CO_3^{2-} (1004, 1021, 1054 см^{-1}) и OH-группы адсорбированных белков и липидов (2952, 3214, 3620 см^{-1}) (см. рис. 1).

КР-спектры ткани аутоотрансплантатов, полученных из ретромолярной области

При разработке маркеров для выявления компонентов ткани аутоотрансплантатов в ходе операции установлено, что спектр КР характеризуют ряд полос, соответствующих

Таблица. Объекты исследования

1 Б-в Р.Е.	Ретромолярная область	1969	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова
2 А-а С.Г.	Ретромолярная область	1947	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова
3 П-а М.Л.	Ретромолярная область	1961	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова
4 П-а М.Л.	Область адентии 6 зуба на нижней челюсти	1961	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова	КЦС 2 МГМСУ им. Евдокимова

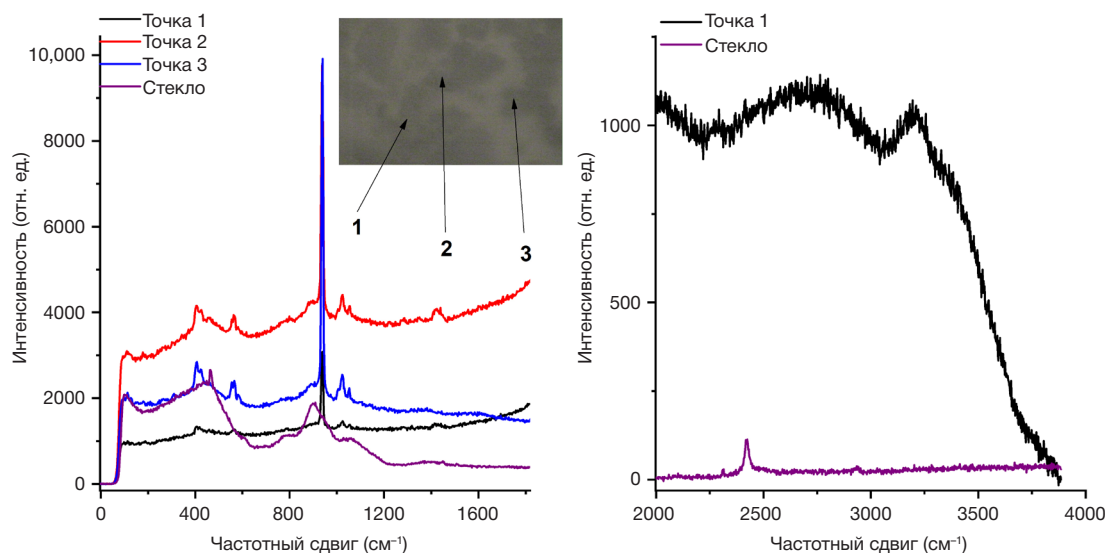


Рис. 1. Спектр КР аутоотрансплантата объект № 2 (костная ткань и компоненты ткани). На вставке — фото объекта. Контролем служит КР-спектр от стекла, на котором локализован объект. По оси абсцисс — частотный сдвиг (см^{-1}), по оси ординат — интенсивность рассеяния (относительные единицы)

коллагену, гемоглобину крови и белкам (группы амид II белков) и липидам (С–Н-групп жирных кислот липидов), а также их ОН-группам. В КР-спектре пациента у объекта № 2 выявлен ряд полос, которые свидетельствуют о наличии в пробе коллагена (1270 см^{-1}), гемоглобина ($1109, 1151, 1228, 1289, 1353, 1382, 1545, 1570, 1615 \text{ см}^{-1}$), белков (С–Н-связи — $3157, 3204 \text{ см}^{-1}$) и липидов (С–Н-групп жирных кислот — $2697, 2877, 2911, 2964 \text{ см}^{-1}$; фосфатных групп — $924, 961 \text{ см}^{-1}$ фосфолипидов), а также их ОН-групп ($3402, 3588 \text{ см}^{-1}$) (рис. 2).

В КР-спектре пациента у объекта № 1 выявлены характерные полосы, которые соответствуют колебаниям отдельных молекулярных связей в белках (например, 1632 см^{-1} — амид II белков; $2848, 2876, 2918, 2930 \text{ см}^{-1}$), липидах (С–Н-группы жирных кислот липидов), а также их ОН-группам.

КР-спектры клеток аутоотрансплантатов, полученных из ретромолярной области

Для маркеров отдельных клеток в составе аутоотрансплантатов выявлен ряд характерных полос

спектра, которые соответствуют коллагену, гемоглобину эритроцита, белкам (амид- и С–Н-связи) и липидам клетки (С–Н-групп жирных кислот и фосфатным группам липидов), а также их ОН-группам. В КР-спектре пациента у объекта № 1 выявлены ряд полос, которые соответствуют белкам и липидам (С–Н-групп жирных кислот липидов — $2848, 2876, 2930 \text{ см}^{-1}$) и их ОН-группам ($3230, 3420, 3612 \text{ см}^{-1}$) (рис. 3–5), коллагену (1274 см^{-1}), гемоглобину эритроцита ($1303, 1335, 1363, 1407, 1531, 1550, 1593 \text{ см}^{-1}$), белкам и липидам (фосфатным группам — $924, 961 \text{ см}^{-1}$), С–Н-группам жирных кислот липидов ($2848, 2876, 2930 \text{ см}^{-1}$) и их ОН-группам ($3230, 3420, 3612 \text{ см}^{-1}$) [18–20]. В КР-спектре пациента у объекта № 2 выявлены характерные полосы, которые соответствуют белкам (1621 — амид; $2841, 2887, 2950 \text{ см}^{-1}$) и липидам (фосфатным группам — $888, 1432 \text{ см}^{-1}$), а также их ОН-группам ($3212, 3402, 3626 \text{ см}^{-1}$). В КР-спектре пациента у объекта № 2 выявлены белки и липиды (С–Н-групп жирных кислот липидов — $2836, 2876, 2946 \text{ см}^{-1}$) и их ОН-группы ($3214, 3397, 3614 \text{ см}^{-1}$). В КР-спектре пациента у объекта № 3 выявлены характерные полосы, которые соответствуют коллагену (1314 см^{-1} и 1603 см^{-1}), а также белкам (С–Н-связям — $2974, 3002,$

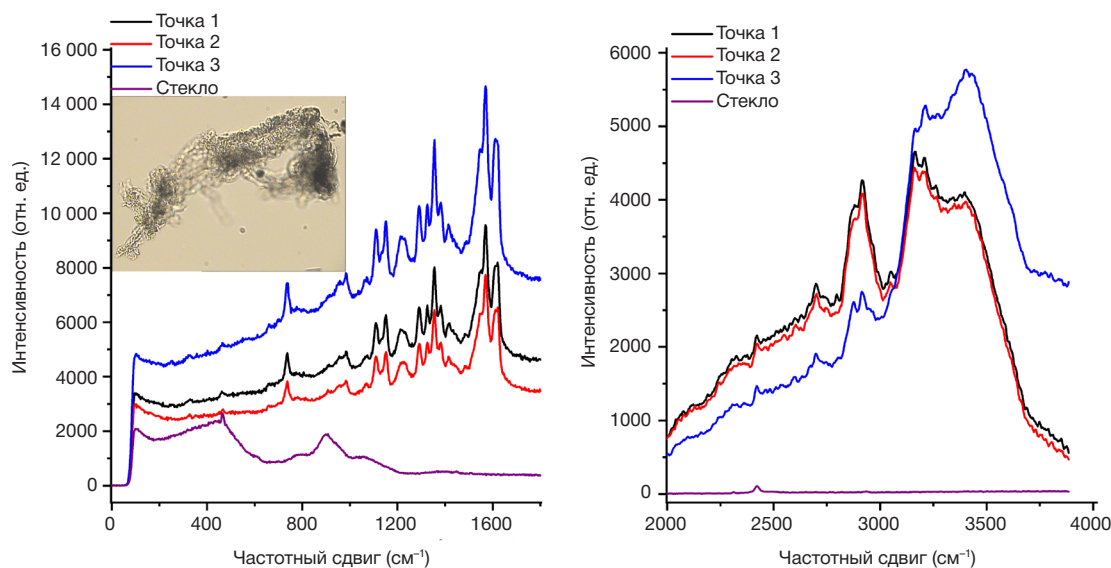


Рис. 2. КР-спектр аутоотрансплантата объект № 2 (ткани аутоотрансплантатов). На вставке — фото объекта. Контролем служит КР-спектр от стекла, на котором локализован объект. По оси абсцисс — частотный сдвиг (см^{-1}), по оси ординат — интенсивность рассеяния (относительные единицы)

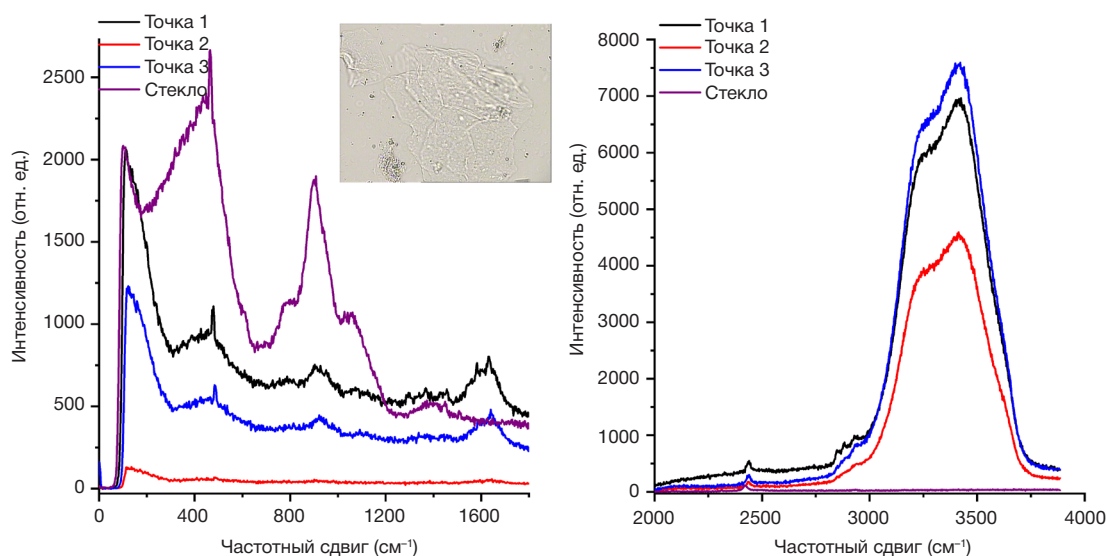


Рис. 3. КР-спектр аутотрансплантата объект № 1 (отдельная клетка). На вставке — фото объекта. Контролем служит КР-спектр от стекла, на котором локализован объект. По оси абсцисс — частотный сдвиг (см^{-1}), по оси ординат — интенсивность рассеяния (относительные единицы)

3932 см^{-1}) и липидам (С–Н-группам жирных кислот липидов — 2846, 2902, 2938 см^{-1}) и их ОН-группам (3238, 3406, 3607 см^{-1}) (см. рис. 3–5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенной работы мы исследовали возможность регистрации КР-сигналов от молекул тканей и клеток в процессе операции получения биологической ткани для аугментации альвеолярных отростков при дефиците костной ткани (планируемая костная пластика) [15–17]. Очевидно, что постоянный контроль за состоянием ткани при хирургическом вмешательстве позволяет врачу оперативно менять протокол операции и проводить дополнительную диагностику [18–20]. В данной работе использовали оптический неинвазивный метод для быстрой и эффективной диагностики изменений состава и конформации молекул клеток и ткани нижней челюсти пациента. Мы провели предварительные исследования и получили характерные сигналы от костной и околокостной ткани и предполагаем, что использование световодов и КР-спектроскопии позволит идентифицировать на молекулярном

уровне проблемы и дефекты в ходе операции. Нами было установлено, что характерным маркером для диагностики костной ткани являются полосы, свидетельствующие о наличии фосфатных групп (426, 583, 938 см^{-1}) и карбоната В типа CO_3^{2-} (1009, 1023, 1056 см^{-1}). Таким образом, при регистрации данных, маркеров можно оценить вклад данных компонентов или их изменения в ходе хирургического вмешательства. Очевидно, что при регистрации КР-сигнала от совокупности тканей и клеток может быть получен суммарный спектр. Для идентификации специфического сигнала от околокостной ткани (а не от костной ткани) были получены КР-сигналы, которые свидетельствуют о наличии коллагена, гемоглобина, различных белков (С–Н-связи) и липидов (С–Н-групп жирных кислот и фосфатных групп фосфолипидов), а также их ОН-групп. Таким образом, применение нашего подхода позволит выявить изменения как в костной, так и в околокостной ткани нижней челюсти пациента [21, 22].

Важным моментом данного исследования оказалось и то, что нам удалось зарегистрировать КР-сигнал отдельных клеток аутотрансплантатов, соответствующий отдельным молекулам коллагена, гемоглобина, белкам и липидам, а также их ОН-группам).

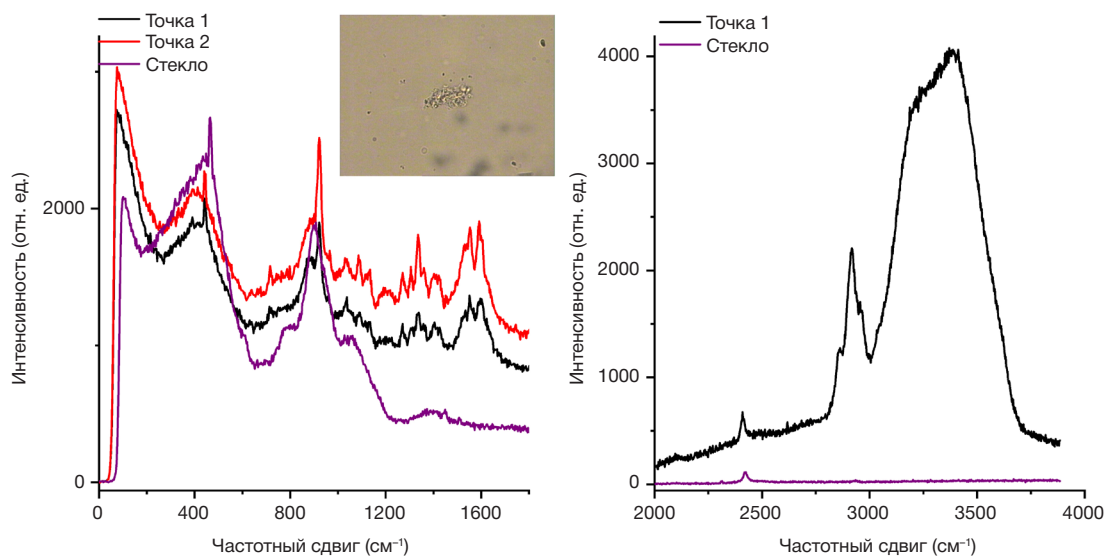


Рис. 4. КР-спектр аутотрансплантата объект № 1 (эритроцит). На вставке — фото объекта. Контролем служит КР-спектр от стекла, на котором локализован объект. По оси абсцисс — частотный сдвиг (см^{-1}), по оси ординат — интенсивность рассеяния (относительные единицы)

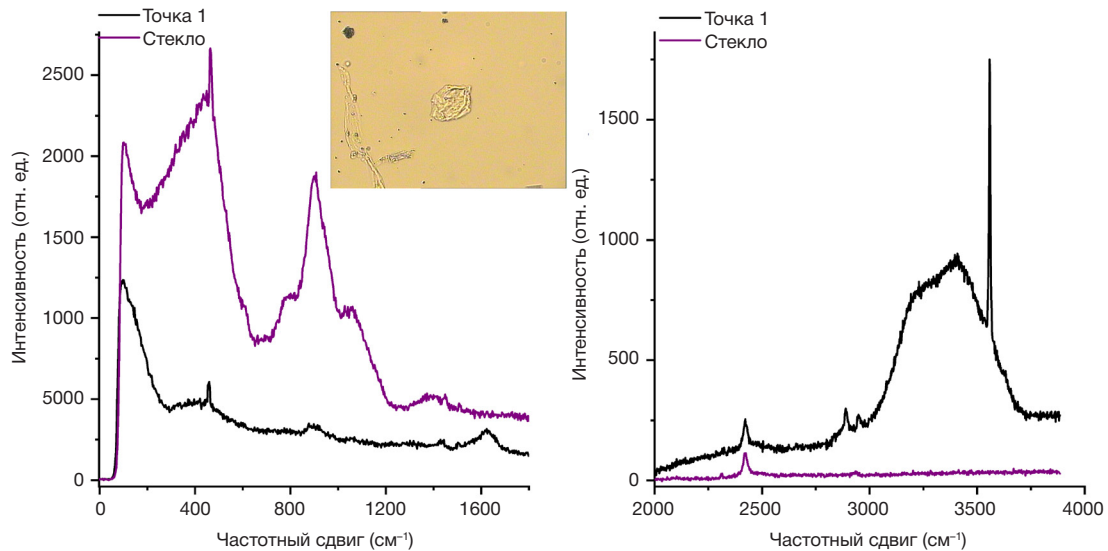


Рис. 5. КР-спектр аутоотрансплантата объект № 2 (клетка). На вставке — фото объекта. Контролем служит КР-спектр от стекла, на котором локализован объект. По оси абсцисс — частотный сдвиг (см^{-1}), по оси ординат — интенсивность рассеяния (относительные единицы)

Установлено, что КР можно использовать для оценки состояния аутоотрансплантатов костной ткани при трансплантации. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что спектры аутоотрансплантатов разных объектов отличаются друг от друга. Предложенный метод оценки состояния аутоотрансплантатов предполагается использовать в дальнейшем для идентификации конкретных белков, липидов, других молекул, входящих в структуру костных тканей, и проводить их количественную оценку. В ходе остеоинтеграции образуется большое количество биологически активных молекул, которые могут свидетельствовать об усилении или, наоборот, ослаблении интеграции [3, 6].

Итак, на различных клетках и тканях зафиксированы КР-сигналы от специфических веществ и, вероятно, используя современную технику и световоды для регистрации сигнала в области ротовой полости в ходе операции, можно локализовать воздействие именно на костную ткань и отдельные молекулы в клетках ткани аутоотрансплантата (например, гемоглобин, коллаген, белки или липиды) или стволовых клеток в трансплантате [23].

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что использование КР-спектроскопии позволяет эффективно и быстро оценить молекулярный состав, а также качественные и количественные изменения костных аутоотрансплантатов, используемых при аугментации тканей челюсти. Своевременное выявление факторов, нарушающих остеоинтеграцию, способствующих резорбции костной ткани вокруг имплантата, — одна из основных проблем современной стоматологии. Поэтому исследования, направленные на решение этой проблемы, необходимы и актуальны. Полученные результаты позволяют предположить возможность использования с этой целью метода КР-спектроскопии. Применение технологии совмещения регистрации КР и детекции полости рта с помощью световодов может позволить врачу контролировать процесс репаративной регенерации и остеоинтеграции при дентальной имплантации. Совмещение оптической диагностики и цифрового подхода для быстрого анализа состояния ткани способно существенно повысить эффективность операции и терапии.

Литература

1. Цициашвили А. М., Панин А. М. Установка дентальных имплантатов в дистальном отделе верхней челюсти после проведения костной пластики методикой ротации костного лоскута. Научно-практический журнал «Dental Forum». 2017; (2): 40–45.
2. Кулаков А. А., редактор. Дентальная имплантация. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018; 400 с. Доступно по ссылке: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970445419.html>.
3. Neugebauer J, Kistler F, Kistler S, Scheer M, Bayer G, Zoller JE. Autologous bone augmentation. Scientific and practical journal "New in Dentistry". 2019; (241): 6–26.
4. Панкратов А. С., Лекишвили М. В., Копецкий И. С. Костная пластика в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Остеопластические материалы. М.: Бином, 2011; 271 с.
5. Hernandez-Alfaro F, Sancho-Puchades M, Guijarro-Martínez R, Total Reconstruction of the Atrophic Maxilla with Intraoral Bone Grafts and Biomaterials: A Prospective Clinical Study with Cone Beam Computed Tomography Validation. Int J Maxillofac Implants 2013; 28 (1): 241–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.11607/jomi.2405>.
6. Khoury F, Hanser T. Mandibular bone block harvesting from the retromolar region: a 10-year prospective clinical study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2015; 30 (3): 688–97. DOI: 10.11607/jomi.4117.
7. Jureti AM, Cerovi AR, BeluAiA-Gobi AM, Brekalo PrAo I, Kqiku L, Špalj S, et al. Salivary levels of TNF-A and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. Folia Biol (Praha). 2013; 59: 99–102. Available from: <https://fb.cuni.cz/file/5685/fb2013a0012.pdf>.
8. Feng X, Shi Y, Xu L, Peng Q, Wang X, Sun W, et al. Modulation of IL-6 induced RANKL expression in arthritic synovium by a transcription factor SOX5. Sci Rep. 2016; 6: 32001. DOI: 10.1038/srep32001.
9. Tereshima A, Takayanagi H. Overview of Osteoimmunology. Calcif Tissue Int. 2018; 102 (5): 503–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0417-1>.
10. Зорика О. А., Абаев З. М., Маромедов Р. Н., Проходная В. А., Макслюкова Е. С. Диагностическая информативность

- определения остеомаркеров в сыворотке крови при хроническом парализованном пародонтите средней и тяжелой степени. *Стоматология*. 2019; 98 (1): 17–20.
11. Смирнов А. В., Румянцев А. Ш. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии. Сообщение I. *Нефрология*. 2014; 18 (6): 9–25.
 12. Белевич С. Б., Войнов В. А. Молекулярные механизмы в патологии человека. Руководство для врачей. 2012; 206 с.
 13. Vlasov AV, Malliar NL, Bazhenov SV, Nikelshparg EI, Brazhe NA, Maksimov GV, et al. Raman Scattering: From Structural Biology to Medical Applications. Crystals, MDPI publishing house (Basel, Switzerland). 2020; 10 (1): 38. Available from: <https://doi.org/10.3390/cryst10010038>.
 14. Рафальский В. В., Зюбин А. Ю., Моисеева Е. М., Самусев И. Г. Перспективы применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии) в кардиологии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020; 19 (1): 2394.
 15. Еремина О. Е., Семенова А. А., Сергеева Е. А., Браже Н. А., Максимов Г. В., Шеховцова Т. Н., и др. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния в современном химическом анализе: достижения и перспективы использования. *Успехи химии*. 2018; 87 (8): 741–70.
 16. Alexandrov M. T., Margaryan E. G. Rationale for the application of surface-enhanced Raman scattering for identification of main pathogens of purulent-inflammatory diseases in maxillofacial area. 2018; 97 (1); 27–32. DOI: 10.17116/stomat201897127-32.
 17. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions Connect. *Tissue Res*. 2017; 59: 99–107. Available from: <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>.
 18. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20 (5): 230–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep3200>.
 19. Kylmaoja E, Nakamura M, Tuukkanen J. Osteoclasts and remodeling based bone formation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016; 11: 626–33. Available from: <https://doi.org/10.2174/1574888X10666151019115724>.
 20. Sohrabi K, Mushantat A, Esfandiari S, Feine J. How successful are small — diamond implants? The literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23 (5): 515–25. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02410.x>.
 21. Yunus N, Masood M, Saub R, Al-Hashedi AA, Taiyeb Ali TB, Thomason JM. Impact of mandibular implant prostheses on the oral health-related quality of life in partially and completely edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2016; 27 (7): 904–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/clr.12657>.
 22. Wessel JJ. Surface-enhanced optical microscopy. *JOSA B*. 1985; 2 (9): 1538–41. Available from: <https://doi.org/10.1364/JOSAB.2.001538>.
 23. Zhang J, Chen J. Bone Tissue Regeneration — Application of Mesenchymal Stem Cells and Cellular and Molecular Mechanisms. 2017; 12 (5): 357–64. DOI: 10.2174/1574888x11666160921121555.

References

1. Tsitsiashvili AM, Panin AM. Ustanovka dental'nyh implantatov v distal'nom otdel'noy verhn'ey cheljusti posle provedeniya kostnoj plastiki metodiko rotatsii kostnogo loskuta. *Nauchno-prakticheskij zhurnal «Dental Forum»*. 2017; (2): 40–45.
2. Kulakov AA, redactor. Dental'naja implantacija. Nacional'noe rukovodstvo. M.: GJeOTAR-Media, 2018; 400 s. Available from: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970445419.html>.
3. Neugebauer J, Kistler F, Kistler S, Scheer M, Bayer G, Zoller JE. Autologous bone augmentation. Scientific and practical journal "New in Dentistry". 2019; (241): 6–26.
4. Pankratov AS, Lekishvili MV, Kopeckij IS. Kostnaja plastika v stomatologii i cheljustno-licevoj hirurgii. *Osteoplasticheskie materialy*. M.: Binom, 2011; 271 s.
5. Hernandez-Alfaro F, Sancho-Puchades M, Guijarro-Martínez R. Total Reconstruction of the Atrophic Maxilla with Intraoral Bone Grafts and Biomaterials: A Prospective Clinical Study with Cone Beam Computed Tomography Validation. *Int J Maxillofac Implants*. 2013; 28 (1): 241–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.11607/jomi.2405>.
6. Khoury F, Hanser T. Mandibular bone block harvesting from the retromolar region: a 10-year prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015; 30 (3): 688–97. DOI: 10.11607/jomi.4117.
7. Jureti AM, Cerovi AR, BeluAia-Gobi AM, Brekalo PrAo I, Kqiku L, Špalj S, et al. Salivary levels of TNF- α and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. *Folia Biol (Praha)*. 2013; 59: 99–102. Available from: <https://fb.cuni.cz/file/5685/fb2013a0012.pdf>.
8. Feng X, Shi Y, Xu L, Peng Q, Wang X, Sun W, et al. Modulation of IL-6 induced RANKL expression in arthritic synovium by a transcription factor SOX5. *Sci Rep*. 2016; 6: 32001. DOI: 10.1038/srep32001.
9. Tereshima A, Takayanagi H. Overview of Osteoimmunology. *Calcif Tissue Int*. 2018; 102 (5): 503–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-018-0417-1>.
10. Zorika OA, Abaev ZM, Magomedov RN, Prohodnaya VA, Maksukova ES. Diagnostic value of serum osteomarkers in moderate and severe periodontal disease. *Stomatologiya*. 2019; 98 (1): 17–20. Available from: <https://doi.org/10.17116/stomat2019980117>.
11. Smirnov AV, Rumyantsev AS. Stroenie i funkci kostnoj tkani v norme i pri patologii. Soobshhenie I. *Neftologiya*. 2014; 18 (6): 9–25.
12. Bolevich SB, Vojnov VA. Molekuljarnye mehanizmy v patologii cheloveka. *Rukovodstvo dlja vrachej*. 2012; 206 s.
13. Vlasov AV, Malliar NL, Bazhenov SV, Nikelshparg EI, Brazhe NA, Maksimov GV, et al. Raman Scattering: From Structural Biology to Medical Applications. Crystals, MDPI publishing house (Basel, Switzerland). 2020; 10 (1): 38. Available from: <https://doi.org/10.3390/cryst10010038>.
14. Rafalsky VV, Zyubin AYU, Moiseeva EM, Samusev IG. Perspektivy primeneniya metoda spektroskopii kombinacionnogo rassejaniya sveta (ramanovskoj spektroskopii) v kardiologii. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika*. 2020; 19 (1): 2394. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-1-2394.
15. Eremina OE, Semenova AA, Sergeeva EA, Brazhe NA, Maksimov GV, Shehovcova TN, i dr. Spektroskopija gigantskogo kombinacionnogo rassejaniya v sovremennom himicheskom analize: dostizhenija i perspektivy ispol'zovanija. *Usp'ehi himii*. 2018; 87 (8): 741–70.
16. Alexandrov MT, Margaryan EG. Rationale for the application of surface-enhanced Raman scattering for identification of main pathogens of purulent-inflammatory diseases in maxillofacial area. 2018; 97 (1); 27–32. DOI: 10.17116/stomat201897127-32.
17. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions Connect. *Tissue Res*. 2017; 59: 99–107. Available from: <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>.
18. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20 (5): 230–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep3200>.
19. Kylmaoja E, Nakamura M, Tuukkanen J. Osteoclasts and remodeling based bone formation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016; 11: 626–33. Available from: <https://doi.org/10.2174/1574888X10666151019115724>.
20. Sohrabi K, Mushantat A, Esfandiari S, Feine J. How successful are small — diamond implants? The literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23 (5): 515–25. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02410.x>.
21. Yunus N, Masood M, Saub R, Al-Hashedi AA, Taiyeb Ali TB, Thomason JM. Impact of mandibular implant prostheses on the oral health-related quality of life in partially and completely edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2016; 27 (7): 904–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/clr.12657>.
22. Wessel JJ. Surface-enhanced optical microscopy. *JOSA B*. 1985; 2 (9): 1538–41. Available from: <https://doi.org/10.1364/JOSAB.2.001538>.
23. Zhang J, Chen J. Bone Tissue Regeneration — Application of Mesenchymal Stem Cells and Cellular and Molecular Mechanisms. 2017; 12 (5): 357–64. DOI: 10.2174/1574888x11666160921121555.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* ДЛЯ МОНИТОРИНГА ФЕРРОПТОЗА В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

А. С. Щеглов , А. С. Царькова

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

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

Ферроптоз — особый тип программируемой гибели клеток, связанный с интенсивным окислением липидов под действием свободных ионов двухвалентного железа. Новые индукторы и супрессоры ферроптоза могут стать основой для создания препаратов для лечения нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Для поиска таких индукторов (супрессоров) ферроптоза необходимо детектировать этот процесс в живых клетках или у лабораторных животных. Люцифераза (фотопротеин) морского дракона *Chaetopterus variopedatus* для своей активности требует помимо двух кофакторов наличия ионов железа и пероксида водорода (либо органических гидропероксидов). Соответственно биолюминесцентная система морского дракона может быть использована для мониторинга ферроптоза в живых организмах.

Ключевые слова: ферроптоз, окисление липидов, биолюминесценция, люцифераза, люциферин, биоимиджинг, биомедицина, морской дракон, *Chaetopterus*

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10102).

Благодарности: авторы признательны Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Москва) за помощь в проведении исследования.

Вклад авторов: А. С. Щеглов — идея публикации, анализ литературы, написание статьи; А. С. Царькова — анализ литературы, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Сергеевич Щеглов
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; jukart@mail.ru

Статья получена: 05.05.2021 **Статья принята к печати:** 12.05.2021 **Опубликована онлайн:** 30.05.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024

THE POTENTIAL OF USING THE BIOLUMINESCENT SYSTEM OF *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* TO STUDY FERROPTOSIS IN LIVING ORGANISMS

Shcheglov AS , Tsarkova AS

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Ferroptosis is a form of programmed cell death associated with iron-dependent lipid peroxidation. Novel ferroptosis inducers and suppressors could be instrumental in developing drugs against neurodegenerative disorders and cancer. Prior to embarking on a search for ferroptosis inducers/suppressors, this form of cell death must be studied in living cells and laboratory animals. In addition to two cofactors, luciferase (or photoprotein) of the parchment tubeworm *Chaetopterus variopedatus* requires the presence of iron ions and hydrogen peroxide or organic hydroperoxides to exert its activity. Therefore, the bioluminescence system of the parchment tubeworm can be used to study ferroptosis in living organisms.

Keywords: ferroptosis, lipid peroxidation, bioluminescence, luciferase, luciferin, bioimaging, biomedical research, parchment worm, *Chaetopterus*

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (Project 18-74-10102).

Acknowledgements: the authors thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for their help.

Author contribution: Shcheglov AS — study conception, literature analysis, manuscript preparation; Tsarkova AS — literature analysis, manuscript preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander S. Shcheglov
Miklouho-Maclay, 16/10, Moscow, 117997; jukart@mail.ru

Received: 05.05.2021 **Accepted:** 12.05.2021 **Published online:** 30.05.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.024

Ферроптоз — новый вид программируемой клеточной гибели

Программируемая клеточная смерть — это процесс гибели клеток вследствие действия специальных внутриклеточных механизмов. Она встречается не только у высших животных, но и у беспозвоночных, растений, бактерий и грибов. Значение программируемой клеточной гибели для нормального развития и жизнедеятельности организма сложно переоценить [1]. Эмбриональное развитие и морфогенез, обновление тканей, иммунный ответ, воспаление, элиминация злокачественных и зараженных вирусами клеток — во всех этих процессах важную роль играет программируемая клеточная гибель. Избыточная или недостаточная программируемая клеточная гибель приводит к различным нарушениям, таким как нейродегенеративные, аутоиммунные, онкологические и

другие заболевания. Важность изучения программируемой клеточной гибели была подчеркнута присуждением двух Нобелевских премий по физиологии и медицине за работы по этой тематике — в 2002 и 2016 г. Первым описанным механизмом программируемой клеточной гибели был апоптоз [2]. В настоящее время известно не менее десятка различных неапоптотических механизмов программируемой клеточной гибели, таких как аутофагия, некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, энтоз, нетоз и др. [1]. Несмотря на интенсивные исследования, наши знания об этих процессах остаются неполными.

Интересным и перспективным с точки зрения практического использования вариантом программируемой клеточной гибели является ферроптоз. В 2004 г. было обнаружено, что новое гетероциклическое соединение эрастин вызывает ранее неизвестный неапоптотический вид клеточной гибели [3]. Эрастин

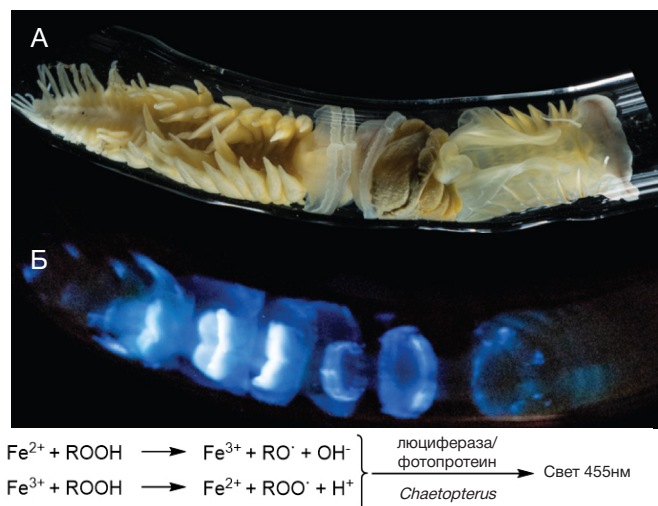


Рис. Биолуминесценция *Chaetopterus variopedatus*: сверху — особь, извлеченная из трубки, на свету (А) и в темноте (Б); снизу — возможный механизм биолуминесценции. (По данным: Mirza JD et al., 2020; фотографии предоставлены Альваро Миготто и Андерсоном Оливейра.)

напрямую взаимодействует с митохондриальными потенциалзависимыми анионными каналами (VDAC), и его действие ингибируют антиоксиданты, такие как альфа-токоферол, бутилированный гидрокситолуол и бета-каротин [4]. При обработке клеток эрастином клеточную гибель ингибируют хелатирующие агенты, связывающие двухвалентное железо [5]. В 2012 г. Диксон с соавторами предложили термин ферроптоз — особый тип программируемой клеточной гибели, связанный с интенсивным окислением липидов, вызванным наличием свободных ионов двухвалентного железа. Ферроптоз генетически, биохимически и морфологически отличается от апоптоза, некроза и аутофагии [1, 6]. В отличие от апоптоза, при ферроптозе не происходит изменений клеточного ядра и конденсации хроматина, но уменьшается объем митохондрий, возрастает плотность их мембран, уменьшаются или исчезают митохондриальные кристы [5, 6]. В процессе ферроптоза падает активность глутатион-пероксидазы 4 (GPX4), происходит зависимое от ионов двухвалентного железа окисление липидов и накопление гидропероксидов липидов, которое приводит к гибели клеток [5, 7]. Накопление двухвалентного железа и образование гидропероксидов липидов, приводящие к повреждению клеток, можно наблюдать при ряде нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, атасия Фридрейха и других патологических процессах, включающих боковой амиотрофический склероз, перивентрикулярную лейкомаляцию, ишемический инсульт, травматические повреждения мозга и острую травму почек. Протекание вышеперечисленных заболеваний предположительно связано с запуском ферроптозного каскада [8]. В то же время, поскольку раковые клетки содержат повышенное количество ионов двухвалентного железа, индукция ферроптоза является перспективной стратегией терапии устойчивых к апоптозу опухолей. Показано, что противоопухолевый препарат сорафениб, эффективный для лечения рака почки, индуцирует ферроптоз [9]. Таким образом, изучение механизмов ферроптоза, поиск новых индукторов и супрессоров ферроптоза актуальны для создания новых препаратов для лечения нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Однако для масштабных скринингов новых индукторов (супрессоров) ферроптоза необходимо в первую очередь разработать эффективную систему

для мониторинга этого процесса в живых клетках или у лабораторных животных.

Биолуминесцентная система *Chaetopterus variopedatus* и перспективы ее использования

В современной биотехнологии и диагностике широко используют методы, основанные на биолуминесценции, так как они обладают высокой чувствительностью и низким фоновым сигналом. Биолуминесцентные системы применяют для тестов на различные аналиты, иммунологических анализов, анализов экспрессии генов, скринингов потенциальных лекарственных препаратов, биоимиджинга живых организмов, визуализации внутриклеточных структур и процессов, исследований онкологических и инфекционных заболеваний, мониторинга окружающей среды [10]. Такие системы широко распространены в природе, однако хорошо изучено и адаптировано для применения всего несколько. Расшифровка новых биолуминесцентных систем позволит создать на их основе новые методы для практического использования [11]. Одной из малоизученных и необычных систем является биолуминесцентная система морского дракона — многощетинкового червя *Chaetopterus variopedatus* (см. рис.). Этот организм-фильтратор обитает на морском дне в трубках-домиках. При извлечении из домика тело морского дракона светится, кроме того, он может выделять светящуюся слизь. Биологическая роль, как и молекулярные основы этого механизма, пока не совсем понятны [12]. Согласно полученным ранее данным, фотопротеин морского дракона *Chaetopterus variopedatus* для своей активности требует, помимо двух кофакторов, наличия ионов железа и пероксида водорода (либо органических гидропероксидов) [13]. Позднее было показано, что биолуминесцентная система *Chaetopterus variopedatus* функционирует скорее по классическому механизму «люциферин–люцифераза» и зависит от присутствия ионов двухвалентного железа [14].

Поскольку в процессе ферроптоза происходит как накопление свободных ионов двухвалентного железа, так и образование большого количества различных активных форм кислорода, при развитии ферроптоза в клетках, экспрессирующих люциферазу морского дракона и содержащих необходимые кофакторы, будет возникать люминесцентный сигнал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значение программируемой клеточной гибели для нормального развития и жизнедеятельности организма сложно переоценить, ее нарушения приводят к различным патологиям, таким как нейродегенеративные, аутоиммунные, онкологические и другие заболевания. Ферроптоз — особый неапоптотический тип программируемой клеточной гибели,

связанный с интенсивным окислением липидов, вызванным наличием свободных ионов двухвалентного железа. Изучение механизмов ферроптоза, поиск новых индукторов и супрессоров ферроптоза — актуальная научная и практически значимая задача. Биолуминесцентная система морского дракона является перспективным инструментом для мониторинга ферроптоза в живых лабораторных организмах.

Литература

1. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death *Cell Research* 2019; 29: 347–64. DOI: 10.1038/s41422-019-0164-5.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239–57. DOI: 10.1038/bjc.1972.33.
3. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. 2003; 3: 285–96. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00050-3.
4. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ., Yang WS, Fridman DJ, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*. 2007; 447: 864–8. DOI: 10.1038/nature05859.
5. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*. 2008; 15: 234–45. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.
6. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
7. Angeli JPF, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*. 2014; 16: 1180–91. DOI: 10.1038/ncb3064.
8. Li J, Cao F, Yin H-I, Huang Z-j, Lin Z-t, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
9. Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6 (1): 49. DOI:10.1038/s41392-020-00428-9.
10. Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev*. 2021 Mar 18. DOI: 10.1039/d0cs01492c.
11. Oba Y, Stevani CV, Oliveira AG, Tsarkova AS, Chepurnykh TV, Yampolsky IV. Selected least studied but not forgotten bioluminescent systems. *Photochem Photobiol*. 2017; 93 (2): 405–15. DOI: 10.1111/php.12704.
12. Mirza JD, Migotto ÁE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. Chaetopterus variopedatus bioluminescence: A review of light emission within a species complex. *Photochem Photobiol*. 2020; 96 (4): 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
13. Shimomura O, Johnson FH. Chaetopterus photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. *Science*. 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
14. Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, Pakhomova VG, Myasnyanko IN, Myshkina NM, et al. Luciferin-Luciferase system of marine polychaete Chaetopterus variopedatus. *Dokl Biochem Biophys*. 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.

References

1. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death *Cell Research* 2019; 29: 347–64. DOI: 10.1038/s41422-019-0164-5.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239–57. DOI: 10.1038/bjc.1972.33.
3. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. 2003; 3: 285–96. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00050-3.
4. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ., Yang WS, Fridman DJ, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*. 2007; 447: 864–8. DOI: 10.1038/nature05859.
5. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*. 2008; 15: 234–45. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.
6. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
7. Angeli JPF, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*. 2014; 16: 1180–91. DOI: 10.1038/ncb3064.
8. Li J, Cao F, Yin H-I, Huang Z-j, Lin Z-t, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
9. Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6 (1): 49. DOI:10.1038/s41392-020-00428-9.
10. Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev*. 2021 Mar 18. DOI: 10.1039/d0cs01492c.
11. Oba Y, Stevani CV, Oliveira AG, Tsarkova AS, Chepurnykh TV, Yampolsky IV. Selected least studied but not forgotten bioluminescent systems. *Photochem Photobiol*. 2017; 93 (2): 405–15. DOI: 10.1111/php.12704.
12. Mirza JD, Migotto ÁE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. Chaetopterus variopedatus bioluminescence: A review of light emission within a species complex. *Photochem Photobiol*. 2020; 96 (4): 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
13. Shimomura O, Johnson FH. Chaetopterus photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. *Science*. 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
14. Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, Pakhomova VG, Myasnyanko IN, Myshkina NM, et al. Luciferin-Luciferase system of marine polychaete Chaetopterus variopedatus. *Dokl Biochem Biophys*. 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ В ИЗУЧЕНИИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ДИАГНОСТИКЕ РАССТРОЙСТВ ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

О. Ф. Панкова, Н. М. Казин, С. М. Иванова ✉

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

Актуальность изучения показателей распространенности, половозрастных особенностей и диагностики расстройств шизофренического спектра (раздел F2 Шизофрения, шизотипические и бредовые расстройства) у детей и подростков — пациентов детских психиатрических клиник объясняется предстоящим вступлением в действие Международной классификации болезней (МКБ-11), в которой существенные изменения внесены в целый ряд разделов, включая расстройства из группы шизофрении. Трудности диагностики данной группы инвалидирующих расстройств связаны с полиморфизмом клинической картины, синдромальной незавершенностью психопатологических феноменов, наличием «стертых» атипичных форм. Выявленные при анализе стационарных карт пациентов одной из детских психиатрических больниц изменения в структуре заболеваемости (уменьшение числа пациентов с диагнозом шизофрении (F20) и значительное увеличение числа пациентов с диагнозом шизотипического расстройства (F21)), а также серьезные противоречия в вопросах диагностики, оценке динамики расстройств, исходов, уровня социального функционирования больных позволяют подчеркнуть необходимость дальнейшего изучения с использованием клиничко-катамнестических методов для преодоления выявленных трудностей и противоречий в диагностике, лечении и реабилитации данных пациентов.

Ключевые слова: МКБ-10, дети и подростки, расстройства шизофренического спектра, распространенность, клинические формы, диагностика, прогноз

Вклад авторов: О. Ф. Панкова — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование; Н. М. Казин — набор и обработка данных, написание статьи; С. М. Иванова — обработка данных, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Михайловна Иванова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; lana.polanski@yandex.ru

Статья получена: 31.03.2021 **Статья принята к печати:** 05.05.2021 **Опубликована онлайн:** 20.05.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.022

SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS: PREVALENCE AND DIAGNOSTICS

Pankova OF, Kazin NM, Ivanova SM ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The significance of studying the prevalence, age- and sex-related differences and diagnostic aspects of schizophrenia spectrum disorders (F2 Schizophrenia, schizotypal and delusional disorders) in pediatric and adolescent patients of mental health facilities is linked to the upcoming release of the International Classification of Diseases, Revision 11 (ICD-11). Its whole chapters have been updated, including disorders in the schizophrenia group. Diagnostic challenges posed by this debilitating group of mental disorders are associated with the diversity of clinical presentations, the incompleteness of psychopathological phenomena syndromes, and vague atypical symptoms. Changes in the prevalence of these disorders identified by the analysis of medical records at a mental health facility for children (a decline in the number of patients with F20, schizophrenia, and a surge in the number of patients with F21, schizotypal disorder) and significant disagreement about and disagreement about the diagnostic criteria for schizophrenia spectrum disorders in children and adolescents, evaluation of their dynamics, outcomes, and the social functioning of the patient necessitate further prospective follow-up studies aimed at overcoming the identified difficulties in the diagnosis, treatment and rehabilitation of such patients.

Keywords: ICD-10, children and adolescents, schizophrenia spectrum disorders, clinical forms, diagnosis, prognosis

Author contribution: Pankova OF conceived and designed the study, analyzed the obtained data, wrote and edited the manuscript; Kazin NM collected and analyzed the obtained data, wrote the manuscript; Ivanova SM analyzed the obtained data and wrote the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana M. Ivanova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; lana.polanski@yandex.ru

Received: 31.03.2021 **Accepted:** 05.05.2021 **Published online:** 20.05.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.022

Согласно статистическим данным, в Российской Федерации (РФ) снижается выявляемость психических заболеваний, в том числе расстройств психотического спектра [1]. В то же время в ходе проведенного в РФ в 2000–2018 гг. исследования динамики показателей детской и подростковой заболеваемости в сравнительном аспекте было установлено, что на фоне снижения численности детского и подросткового населения показатели заболеваемости психическими расстройствами превышают заболеваемость взрослого населения, включая рост психотических расстройств у детей [2].

Расстройства шизофренического спектра в детско-подростковом возрасте

Актуальность изучения таких расстройств, представляющих собой одну из инвалидирующих групп, объясняется также высокой частотой их манифестации, полиморфизмом клинической картины, синдромальной незавершенностью психопатологических феноменов и наличием «стертых» атипичных форм [3–5]. Подобное многообразие приводит к недостаточному пониманию клинической сущности и прогностической роли этих состояний, что затрудняет

разграничение клинических форм. Известно, что подходы к диагностике имеют значительные различия в отдельных странах, а постановка диагноза шизофрении и проводимая терапия уже в этом возрасте могут оказать серьезное влияние на дальнейшее психическое здоровье и судьбу человека. В современной европейской и американской детской психиатрии не рекомендуется ставить диагноз шизофрении ранее 8–14 лет. В отечественной психиатрии диагноз шизофрении и расстройств шизофренического спектра в детском возрасте считают правомерным (в российской версии МКБ-10 в рубрике F20.8 Другой тип шизофрении выделен Детский тип шизофрении). Особую актуальность вопросы диагностики расстройств шизофренического спектра приобретают в свете предстоящего вступления в действие 11-го пересмотра МКБ (ICD-11) и соответственно смены клинко-диагностической парадигмы — перехода с категориального на дименсиональный принцип диагностики [6, 7]. Наряду с вопросами дефиниции не меньшее значение имеет своевременность диагностики. В многочисленных зарубежных и отдельных отечественных публикациях представлены данные о том, что раннее начало терапии на доманифестных этапах способно значительно снизить риск развития первого психотического эпизода, а также существенно улучшить отдаленные исходы заболевания с сохранением социально-трудовой адаптации и высокого функционирования [8–10]. Все это является основанием для дальнейшего изучения вопросов распространенности, диагностики и оказания помощи больным с расстройствами шизофренического спектра.

Эпидемиологические данные последних лет, касающиеся всех расстройств шизофренического спектра в детско-подростковом возрасте, отличаются крайней скудностью. В ряде работ представлены результаты мониторинга распространенности основных форм психической патологии в детском и подростковом возрасте, в том числе спектра шизофрении, проведенного на протяжении последних пятнадцати лет [11, 12].

В ходе клинко-статистического анализа стационарных карт пациентов, проходивших обследование и лечение в Научно-практическом центре психического здоровья детей и подростков имени Г. Е. Сухаревой на протяжении 1999–2019 гг., нами были выявлены основные проблемы в изучении распространенности и диагностики шизофрении и расстройств шизофренического спектра (раздел F2) у детей и подростков за весь период использования в РФ МКБ-10. Показатели распространенности расстройств шизофренического спектра (F2) оставались относительно

стабильными (\pm стандартное отклонение, или СО), находясь в границах $10,12 \pm 1,61$. Незначительный рост как в процентном отношении, так и в абсолютных показателях, был отмечен в последние два года, что совпало с ростом общего числа госпитализированных пациентов и, вероятно, отражает тенденции к росту психической патологии у детей и подростков.

Структура расстройств шизофренического спектра

На рис. 1 представлены совокупные показатели за весь изученный период и данные за первый и последний годы. Среди расстройств шизофренического спектра в детском и подростковом возрасте преобладали следующие: F20 Шизофрения, F21 Шизотипическое расстройство, F23 Острые и преходящие психотические расстройства, F25 Шизоаффективное расстройство. В совокупности они составили 99,6% и представляли собой основу расстройств шизофренического спектра.

За все изученные годы около половины (48,8%) всех пациентов F2 составили больные с диагнозом шизофрении, около трети (32,3%) — больные шизотипическим расстройством, 11,7% — больные шизоаффективным расстройством и 6,8% — больные с транзиторными психотическими расстройствами. При этом важно отметить, что если с начала использования МКБ-10 в 1999 г. шизофрения в группе F2 составляла 75,3%, то в 2019 г. больные шизофренией составили лишь 25,8%, т. е. в три раза меньше. Число пациентов с диагнозом шизотипического расстройства, напротив, резко увеличилось: в шесть раз в процентном соотношении и в 19 раз в абсолютных показателях. Почти в два с половиной раза в процентах увеличилось число пациентов с шизоаффективным расстройством (в абсолютных показателях в 7,8 раза). Наиболее стабильными были показатели распространенности транзиторных психотических расстройств.

По возрасту максимальное число пациентов относилось к возрастному интервалу 11–14 лет, за исключением группы пациентов с шизоаффективным расстройством, возраст которых соответствовал диапазону 15–17 лет. Пациенты мужского пола преобладали в группах больных с диагнозами шизофрении, шизотипического расстройства и шизоаффективного расстройства. И лишь среди пациентов с транзиторными психозами половые различия были минимальными: 53,1% составили мужчины и 46,9% — женщины.

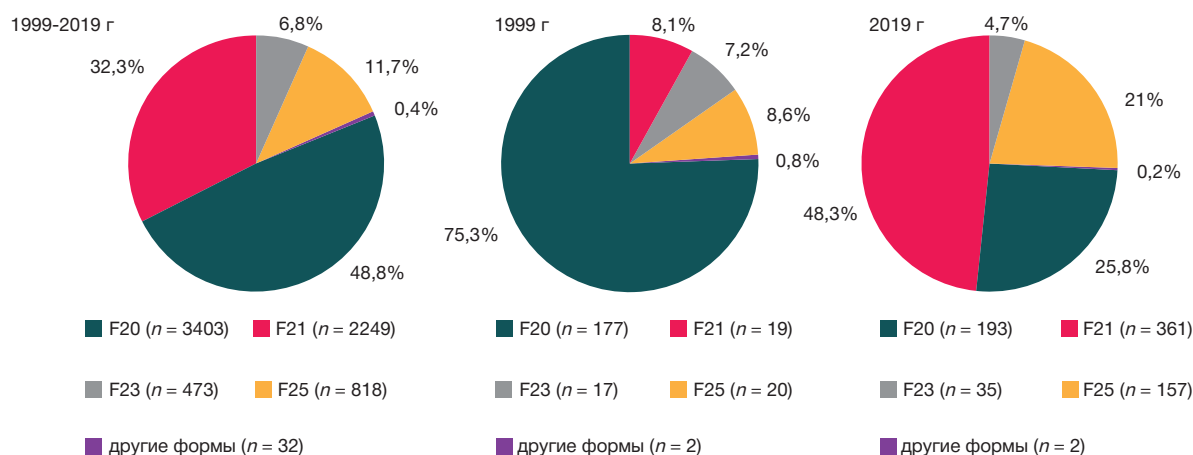


Рис. 1. Структура расстройств шизофренического спектра

Показатели динамики распространенности шизофрении и основных форм расстройств шизофренического спектра по годам

На рис. 2 кривые, относящиеся к F20 и F21, имеют различную направленность: поступательное снижение показателей распространенности шизофрении, несколько замедлившееся с 2013 г., и рост числа пациентов с шизотипическим расстройством в 2007 г., с последующей его стабилизацией до 2016 г. и резким ростом в 2017–2019 гг. Достоверность частоты выставленных диагнозов в данном исследовании принимали равным 0,95.

Тенденции в распространенности и проблемы в диагностике расстройств шизофренического спектра у пациентов детско-подросткового возраста

Проведенное исследование выявило ряд тенденций в распространенности и проблемы в диагностике расстройств шизофренического спектра (рубрика F2 в соответствии с МКБ-10) у пациентов детско-подросткового возраста. Наиболее заметным, особенно в последние три года, является диагностический перекося — уменьшение числа пациентов с диагнозом шизофрении (F20) и значительное увеличение числа пациентов с диагнозом шизотипического расстройства (F21). В детско-подростковом возрасте диагноз F21 имел место у 32,2% пациентов стационара. Из них в 71,2% наблюдений был выставлен диагноз F21.8 Шизотипическое личностное расстройство, в 6,3% — F21.3 Псевдоневротической (неврозоподобной) шизофрении и в 15,2% — F21.4 Псевдопсихопатической (психопатоподобной) шизофрении.

У больных зрелого возраста [13] диагнозы из рубрики F21 выставлялись в 11,6% случаев, диагноз F21.3 Псевдоневротическая (неврозоподобная) шизофрения — у 47,7% пациентов и F21.4 Псевдопсихопатическая (психопатоподобная) шизофрения — у 35,8%. При этом было выявлено, что в 49,6% наблюдений диагнозы

рубрик F21–F29 предшествовали верификации диагноза шизофрении.

Используемое обозначение диагноза F21.8 Шизотипическое личностное расстройство представляется не совсем корректным, так как у детей и подростков нельзя еще говорить о личностном расстройстве, за исключением нарастания шизоидизации. Критериями постановки диагноза шизотипического личностного расстройства в детском и подростковом возрасте являются не черты характера, а симптомы (критерии), которые указаны в преамбуле отечественного психиатрического тезауруса, используемого для квалификации расстройств. Однако предварительное изучение медицинской документации показало, что в значительном проценте случаев описываемые клинические проявления не соответствовали критериям шизотипического расстройства, но при выписке пациентов из стационара во всех возрастных группах увеличивалось число пациентов с диагнозом F21.8 Шизотипическое личностное расстройство.

По нашему мнению, одним из наиболее вероятных объяснений данной трансформации диагнозов являются социальные факторы и стигма, оказывающие существенное влияние на диагностику тяжелых психических расстройств с попыткой выставить «реабилитационный диагноз» этой категории больных. Проблемам стигматизации больных шизофренией в последние годы посвящено большое число исследований как в зарубежной, так и отечественной психиатрии [14, 15]. Страх родителей и самих больных (аутостигматизация) перед стигматизацией имеет определенные основания, так как «тяжелый» психиатрический диагноз может создавать трудности и ограничения при выборе профессии, поступлении в учебные заведения, заключении брака. Факторы стигматизации обуславливают позднее обращение к психиатрам государственных психиатрических учреждений, наблюдение больных у психиатров частных клиник или специалистов других профилей (психологов, неврологов и др.), что затрудняет получение своевременной

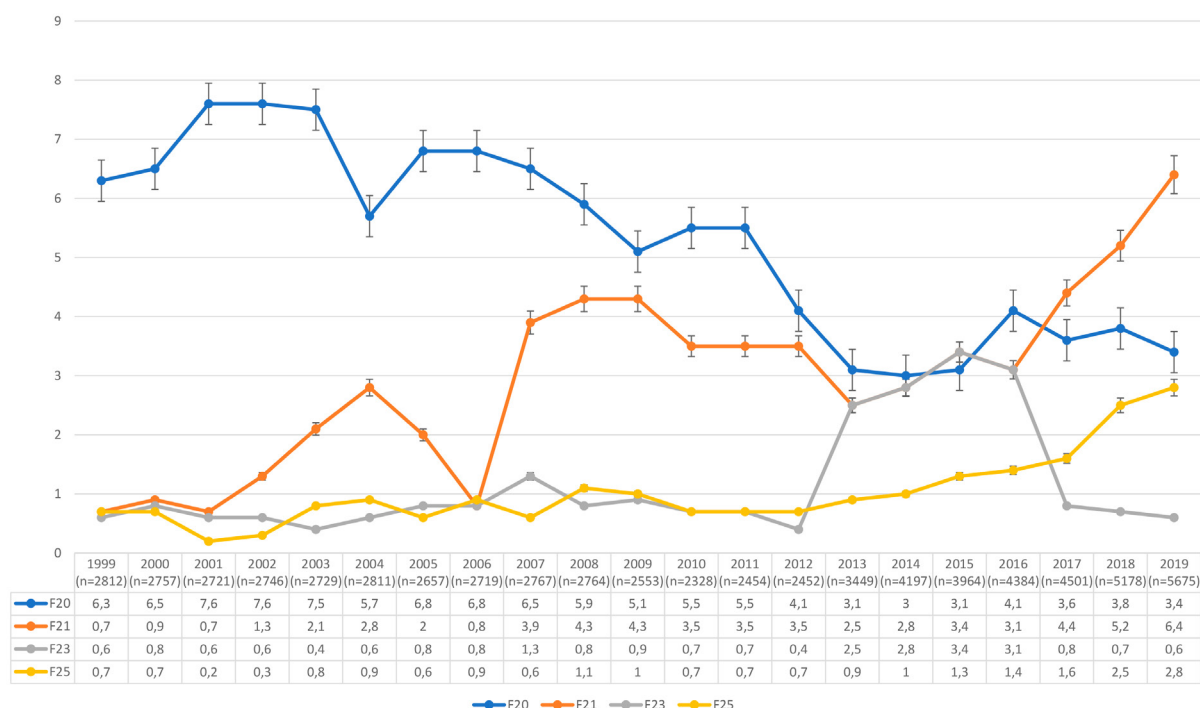


Рис. 2. Динамика распространенности шизофрении и основных форм расстройств шизофренического спектра (по отношению к общему числу госпитализированных пациентов)

помощи, включая проведение социально-педагогических, психотерапевтических и других реабилитационных мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве основных гипотез, позволяющих объяснить выявленные проблемы в диагностике, могут быть рассмотрены: а) явления клинического патоморфоза с нарастанием непсихотических форм расстройств шизофренического спектра, включающих аттенуированные формы и квази-психозы (частично это подтверждают относительно стабильные показатели числа больных транзиторными психозами (F23) и шизоаффективным расстройством (F25)); б) стертость и аморфность

психопатологической симптоматики в сочетании с полиморфностью на продромальном этапе до появления психотических симптомов в детском и подростковом возрасте, определенная диссоциация между тяжестью нарушений и социальным функционированием, недостаточная четкость критериев диагностики; в) стигматизация больных с диагнозом шизофрении и желание использовать для ее смягчения «реабилитационные диагнозы».

Выявленные серьезные трудности и противоречия в вопросах диагностики расстройств шизофренического спектра в детско-подростковом возрасте, оценке динамики расстройств, исходов, уровня социального функционирования больных требуют дальнейшего проспективного изучения с использованием клинито-катамнестических методов исследования.

Литература

1. Кекелидзе З. И., Казаковцев Б. А., редакторы. Эпидемиологические показатели и показатели деятельности психиатрических служб в Российской Федерации (2005–2013 гг.). М., 2015; 572 с.
2. Макушкин Е. В., Демчева Н. К. Динамика и сравнительный анализ детской и подростковой заболеваемости психическими расстройствами в Российской Федерации в 2000–2018 годах. Российский психиатрический журнал. 2019; 4: 4–15.
3. Мазаева Н. А. Подростковый возраст и шизофрения. Психиатрия. 2008; 2: 16–28.
4. Макаров И. В. Психиатрия детского возраста. Руководство для врачей. Санкт-Петербург: Наука и техника, 2019; 992 с.
5. Parnas J. The core Gestalt of schizophrenia. World Psychiatry. 2012; 11 (2): 67.
6. Gaebel W, Jessen F, Kanba S. Neurocognitive disorders in ICD-11: the debate and its outcome. World Psychiatry. 2018; 17 (2): 229–30.
7. Kotov R, Krueger RF, Watson D. A paradigm shift in psychiatric classification: the Hierarchical Taxonomy Of Psychopathology (HiTOP). World Psychiatry. 2018; 17 (1): 24–25.
8. Омельченко М. А., Голубев С. А., Никифорова И. Ю., Каледа В. Г. Риск манифестации эндогенных психозов у больных с непсихотическими психическими расстройствами юношеского возраста. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014; 114 (6): 14–20.
9. Fusar-Poli P, Salazar de Pablo G, Correll CU, Meyer-Lindenberg A, et al. Prevention of Psychosis: Advances in Detection, Prognosis, and Intervention. JAMA Psychiatry. 2020; 77 (7): 755–65.
10. Stafford MR, Jackson H, Mayo-Wilson E, et al. Early interventions to prevent psychosis: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2013; 346: f762. DOI: 10.1136/bmj.f762.
11. Pankova OF, Usacheva EL, Abramov AV, Danilova MY, Dorina IV, Smirnov II, Svintsova AV. Organizational issues relating to the inpatient psychiatric care of children and adolescents in the context of current trends. International Journal of Culture and Mental Health. 2018; 11 (1): 75–86.
12. Панкова О. Ф., Радионов Д. С., Иванова С. М., Дорина И. В. Шизофрения и расстройства шизофренического спектра в клинике современной детской психиатрии (анализ госпитализаций в крупнейшую психиатрическую клинику Москвы). Вопросы психического здоровья детей и подростков. 2019; 19 (4): 47–56.
13. Костюк Г. П., Шмуклер А. Б., Голубев С. А. Эпидемиологические аспекты диагностики шизофрении в Москве. Социальная и клиническая психиатрия. 2017; 27 (3): 5–9.
14. Ястребов В. С., Михайлова И. И., Гонжал О. А., Трущелёв С. А. Факторы стигматизации лиц с психическими расстройствами: методические рекомендации. М.: Изд-во ЗАО Юстицинформ, 200; 22 с.
15. Sibitz I, Amering M, Unger A, Seyringer ME, Bachmann A, Schrank B, et al. The impact of the social network, stigma and empowerment on the quality of life in patients with schizophrenia. Eur Psychiatry. 2011; 26: 28–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2010.08.010>.

References

1. Kekelidze ZI, Kazakovcev BA, redaktory. Jepidemiologicheskie pokazateli i pokazateli dejatel'nosti psihiatricheskikh sluzhb v Rossijskoj Federacii (2005–2013 gg.). M., 2015; 572 s. Russian.
2. Makushkin EV, Demcheva NK. Dinamika i sravnitel'nyj analiz detskoj i podrostkovoj zaboлеваemosti psihicheskimi rasstrojstvami v Rossijskoj Federacii v 2000–2018 godah. Rossijskij psihiatricheskij zhurnal. 2019; 4: 4–15. Russian.
3. Mazaeva NA. Podrostkovyj vozrast i shizofrenija. Psihiatrija. 2008; 2: 16–28. Russian.
4. Makarov IV. Psihiatrija detskogo vozrasta. Rukovodstvo dlja vrachej. Sankt-Peterburg: Nauka i tehnika, 2019; 992 s. Russian.
5. Parnas J. The core Gestalt of schizophrenia. World Psychiatry. 2012; 11 (2): 67.
6. Gaebel W, Jessen F, Kanba S. Neurocognitive disorders in ICD-11: the debate and its outcome. World Psychiatry. 2018; 17 (2): 229–30.
7. Kotov R, Krueger RF, Watson D. A paradigm shift in psychiatric classification: the Hierarchical Taxonomy Of Psychopathology (HiTOP). World Psychiatry. 2018; 17 (1): 24–25.
8. Omelchenko MA, Golubev SA, Nikiforova IYu, Kaleda VG. Risk manifestacii jendogennyh psihozov u bol'nyh s nepsihoticheskimi psihicheskimi rasstrojstvami junosheskogo vozrasta. Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova. 2014; 114 (6): 14–20. Russian.
9. Fusar-Poli P, Salazar de Pablo G, Correll CU, Meyer-Lindenberg A, et al. Prevention of Psychosis: Advances in Detection, Prognosis, and Intervention. JAMA Psychiatry. 2020; 77 (7): 755–65.
10. Stafford MR, Jackson H, Mayo-Wilson E, et al. Early interventions to prevent psychosis: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2013; 346: f762. DOI: 10.1136/bmj.f762.
11. Pankova OF, Usacheva EL, Abramov AV, Danilova MY, Dorina IV, Smirnov II, Svintsova AV. Organizational issues relating to the inpatient psychiatric care of children and adolescents in the context of current trends. International Journal of Culture and Mental Health. 2018; 11 (1): 75–86.
12. Pankova OF, Radionov DS, Ivanova SM, Dorina IV. Shizofrenija i rasstrojstva shizofrenicheskogo spektra v klinike sovremennoj

- detskoj psihiatrii (analiz gosospitalizacij v krupnejshuju psihiatricheskuju kliniku Moskvy). Voprosy psihicheskogo zdorov'ja detej i podrostkov. 2019; 19 (4): 47–56. Russian.
13. Kostyuk GP, Shmukler AB, Golubev SA. Jepidemiologicheskie aspekty diagnostiki shizofrenii v Moskve. Social'naja i klinicheskaja psihiatrija. 2017; 27 (3): 5–9. Russian.
14. Yastrebov VS, Mihaylova II, Gonzhal OA, Trushhelev SA. Faktory stigmatizacii lic s psihicheskimi rasstrojstvami: metodicheskie rekomendacii. M.: Izd-vo ZAO Justicinform, 200; 22 s. Russian.
15. Sibitz I, Amering M, Unger A, Seyringer ME, Bachmann A, Schrank B, et al. The impact of the social network, stigma and empowerment on the quality of life in patients with schizophrenia. Eur Psychiatry. 2011; 26: 28–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2010.08.010>.