

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.2021-04

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

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

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



Подписано в печать 31.08.2021
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.2021-04

The mass media registration certificate № 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 31.08.2021
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
Дерматология и телемедицина: цели, преимущества и недостатки А. С. Дворников, О. В. Минкина, Е. Г. Гребенщикова, Е. В. Введенская, И. С. Мыльникова Dermatology and telemedicine: goals, advantages and disadvantages Dvornikov AS, Minkina OV, Grebenshchikova EG, Vvedenskaya EV, Mylnikova IS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	11
<hr/>	
Ретинальные аномалии у трансгенных мышей, суперэкспрессирующих аберрантный человеческий ген FUS[1-359] В. О. Солдатов, М. С. Кухарский, М. О. Солдатова, О. А. Пученкова, Ю. А. Никитина, Е. А. Лысикова, Н. Л. Карташкина, А. В. Дейкин, М. В. Покровский Retinal abnormalities in transgenic mice overexpressing aberrant human FUS[1-359] gene Soldatov VO, Kukharsky MS, Soldatova MO, Puchenkova OA, Nikitina YuA, Lysikova EA, Kartashkina NL, Deykin AV, Pokrovskiy MV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	17
<hr/>	
Оценка жизнеспособности SARS-CoV-2 на экспериментальных поверхностях во времени М. А. Никифорова А. Э. Синявин, Е. В. Шидловская, Н. А. Кузнецова, В. А. Гущин Evaluation of SARS-CoV-2 viability on experimental surfaces over time Nikiforova MA, Siniavin AE, Shidlovskaya EV, Kuznetsova NA, Gushchin VA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	21
<hr/>	
Особенности патогенетических механизмов туберкулезного перитонита в эксперименте Д. В. Плоткин, Т. И. Виноградова, М. Н. Решетников, Б. М. Ариэль, Ю. Р. Эюзя, В. Ю. Журавлев, М. В. Синицын, Е. М. Богородская, П. К. Яблонский Features of the pathogenetic mechanisms of tuberculous peritonitis in an experiment Plotkin DV, Vinogradova TI, Reshetnikov MN, Ariel BM, Zyuzya YuR, Zhuravlev VYu, Sinitsyn MV, Bogorodskaya EM, Yablonsky PK	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	29
<hr/>	
Разметка цветных фотографий глазного дна улучшает распознавание макулярной патологии с помощью глубокого обучения Х. П. Такхиди, П. В. Глизница, С. Н. Светозарский, А. И. Бурсов, К. А. Шустерзон Labelling of data on fundus color pictures used to train a deep learning model enhances its macular pathology recognition capabilities Takhchidi HP, Gliznitsa PV, Svetozarskiy SN, Bursov AI, Shusterzon KA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
<hr/>	
Роль тучных клеток в репарации кожи после термической травмы при применении дермальной пленки с мелатонином М. В. Осиков, А. А. Агеева, А. А. Федосов, В. А. Ушакова Role of mast cells in skin regeneration after thermal burn treated with melatonin-enriched dermal film Osikov MV, Ageeva AA, Fedosov AA, Ushakova VA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	45
<hr/>	
Оценка эффективности применения гибридной интраперитонеальной аллопластики при параколомических грыжах Н. В. Мальгина, Т. Ю. Долгина, А. Д. Епифанова, Г. В. Родоман Effectiveness of hybrid intraperitoneal mesh repair for paracolostomy hernia Malgina NV, Dolgina TYu, Epifanova AD, Rodoman GV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	53
<hr/>	
Экспериментальная оценка биологического потенциала коллагеновых мембран при реконструкции полнослойных дефектов гиалинового хряща Г. Д. Лазышвили, К. А. Егiazарян, Д. В. Никишин, А. А. Воронцов, Д. В. Клинов Experimental assessment of biological potential of collagen membranes in reconstruction of full-thickness hyaline cartilage defects Lazishvili GD, Egiazarян KA, Nikishin DV, Voroncov AA, Klinov DV	

Применение гистохимических красителей для флуоресцентного выявления амилоидных скоплений в тканях человека

В. В. Гусельникова, Д. А. Суфиева, Д. Л. Цыба, Д. Э. Коржевский

Fluorescence detection of amyloid deposits in human tissues using histochemical dyes

Guselnikova VV, Sufieva DA, Tsyba DL, Korzhevskii DE

Жизнестойкость и персональные ресурсы врачей «красных зон» ковид-госпиталей: психологический анализ

Б. А. Ясько, Б. В. Казарин, В. Н. Городин, Н. А. Чугунова, Л. В. Покуль, Л. С. Скрипниченко, В. В. Скоробогатов

Hardiness and personal resources of red zone staff: psychological analysis

Yasko BA, Kazarin BV, Gorodin VN, Chugunova NA, Pokul LV, Skripnichenko LS, Skorobogatov VV

ДЕРМАТОЛОГИЯ И ТЕЛЕМЕДИЦИНА: ЦЕЛИ, ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ

А. С. Дворников, О. В. Минкина, Е. Г. Гребенщикова ✉, Е. В. Введенская, И. С. Мыльникова

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

Пандемия COVID-19 внесла изменения в традиционное медицинское обслуживание. В связи с необходимостью «социального дистанцирования» особенно востребованными стали услуги телемедицинской помощи, что изменило прежний формат взаимоотношений врача и пациента; дерматология не стала исключением. Активное использование теледерматологии (ТД) во всем мире актуализировало комплекс проблем, связанных с ее возможностями и недостатками, особенно в свете ожиданий более широкого применения этой технологии в постпандемический период. В обзоре освещены вопросы качества оказания медицинской помощи, понимания социогуманитарных контекстов развития ТД и последствий для сферы профессионального образования.

Ключевые слова: COVID-19, дерматология, телемедицина, теледерматология, биоэтика

Вклад авторов: А. С. Дворников — концепция и дизайн исследования, редактирование статьи; О. В. Минкина — концепция и дизайн исследования, написание статьи; Е. Г. Гребенщикова — концепция и дизайн исследования, написание статьи; Е. В. Введенская — анализ источников, написание текста; И. С. Мыльникова — анализ источников, написание текста.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Георгиевна Гребенщикова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; aika45@ya.ru

Статья получена: 17.08.2021 **Статья принята к печати:** 27.08.2021 **Опубликована онлайн:** 31.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.041

DERMATOLOGY AND TELEMEDICINE: GOALS, ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

Dvornikov AS, Minkina OV, Grebenshchikova EG ✉, Vvedenskaya EV, Mylnikova IS

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

COVID-19 pandemic has made changes to conventional health care. In view of the need for "social distancing", telemedicine services became most in demand, which constituted a reform of the previous doctor-patient relationship format; dermatology was no exception. Increased use of teledermatology (TD) all over the world elevated the relevance of the set of challenges related to teledermatology potential and limits, particularly in the light of the expectations of the technology broader application during the post-pandemic period. The review addresses the issues related to accounting for quality of health care, understanding the social and humanitarian context of TD, as well as the impact on professional education.

Keywords: COVID-19, telemedicine, dermatology, teledermatology, bioethics

Author contribution: Dvornikov AS — study concept and design, manuscript editing; Minkina OV — study concept and design, manuscript writing; Grebenshchikova EG — study concept and design, manuscript writing; Vvedenskaya EV — literature analysis, text writing; Mylnikova IS — literature analysis, text writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena G. Grebenshchikova
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997; aika45@ya.ru

Received: 17.08.2021 **Accepted:** 27.08.2021 **Published online:** 31.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.041

Теледерматология как часть телемедицины

Телемедицина (ТМ) — информационно-коммуникационный формат предоставления медицинских продуктов и услуг, основанный на дистанционной передаче и получении необходимой информации с целью диагностики и лечения заболеваний, анализа лабораторно-инструментальных исследований, удаленного мониторинга пациентов, в качестве профессионального образовательного ресурса, «врачевание и специализированное обучение на расстоянии». В Российской Федерации термин ТМ закреплен в 2001 г. в проекте Координационного совета по ТМ Минздрава России — Концепции развития ТМ-технологий в РФ. В 2017 г. на федеральном законодательном уровне введено понятие «телемедицинские технологии», включающее две сферы использования: дистанционное оказание медицинской помощи и электронный медицинский документооборот [1]. Под теледерматологией (ТД) подразумевается применение цифровых технологий, позволяющих свободно консультировать пациентов с заболеваниями кожи или ее придатков вне зависимости от расстояния и часового пояса; анализировать результаты различных видов исследований, в том числе и дерматоскопических изображений путем передачи их в удобное для пациента и врача время; проводить

дистанционные коллегиальные конференции в ситуациях, требующих экспертного мнения.

Традиционно в ТД используют следующие технологии: асинхронную ТД, или SAF (Store-and-Forward, хранение и пересылка), при которой изображения и другую дополнительную информацию оценивают пространственно-рассредоточено с временной задержкой; синхронную ТД, или RT-TD (real-time teledermatology), когда видеоконсультации проводят в реальном режиме времени; гибридное консультирование (SAF + RT-TD) и мобильную ТД [2]. Ранее ТД-исследования преимущественно использовали модели с промежуточным хранением, во время пандемии COVID-19 увеличилось количество сеансов интерактивной RT-TD коммуникации. При опросе в мае и июне 2020 г. 591 практикующего дерматолога — члена AAD (American Academy of Dermatology) относительно влияния пандемии на ТД было выявлено, что ТД до пандемии использовали только 14,1% респондентов, а с началом COVID-19 — 96,9%; 58,0% дерматологов предположили, что ТД будут использовать в дальнейшем вне зависимости от эпидемиологической ситуации; 72,0% врачей оценили гибридное консультирование как наиболее точное [3].

По мнению ряда исследователей, диагностическая точность при сравнении ТД и очной консультации дерматолога является сопоставимой [4; 5]. Работа

в реальном режиме времени имеет безусловные преимущества в виде непосредственной возможности задавать уточняющие вопросы, своевременно разрешать спорные и неясные моменты, контролировать понимание пациентом выданных рекомендаций, однако качество видеоизображений при RT-TD, как правило, уступает качеству статических изображений, используемых в SAF, особенно если речь идет о теледерматоскопии и ультраструктурной детализации паттернов меланоцитарного, сосудистого или кератинизированного новообразования кожного покрова.

В 2021 г. опубликованы результаты анализа 2632 ТД-консультаций, проведенных с 16.03.2020 по 01.05.2020: из них SAF составили 36,2%, RT-TD — 63,8%. Синхронный тип консультирования предпочли 54,2% провайдеров медицинской услуги, мотивируя свой выбор преимуществами непосредственного взаимодействия врача и пациента. При этом не было предпочтений в выборе модификации ТД-приема для первичных пациентов, однако уже 66,7% представителей медицинского сервиса выбрали RT-TD для проведения повторного приема; 87,5% предпочли синхронное консультирование для пациентов с заболеваниями соединительной ткани, иммунобуллезными нозологиями и для пациентов, получающих биологическую терапию [6]. Определена ТД модификация с большей дифференциально-диагностической вариативностью в отношении конкретного пациента: при RT-TD консультировании количество диагнозов варьировало от 1-го до 5-ти; при SAF от 1-го до 3-х. При RT-TD создаются условия максимально приближенного копирования очного визита, а следовательно, интеракция врач-пациент может отклоняться от простого анализа фактических данных, что расширяет дифференциально-диагностическое пространство и в свою очередь влияет на точность диагноза.

ТД может оказаться незаменимой для дистанционной оценки госпитализированных больных с учетом недостаточной укомплектованности дерматологами стационаров во всем мире. В ходе изучения диагностико-терапевтического соответствия между врачом стационара, приглашенным дерматологом (ПД) и SAF-теледерматологом (SAF-ТД) на примере 100 пациентов получены данные о несущественной разнице в точности установления диагноза и последующем назначении терапии между дерматологом в стационаре и SAF-ТД: консультация ПД привела к изменению диагноза в 50,9% случаев, SAF-ТД — в 54,7% соответственно; ПД изменили системную терапию в 41,5% случаев, при SAF консультировании коррективка лечения произведена в 47,2% случаев. При сравнении ПД и SAF-ТД полное и частичное совпадение диагнозов составило 52,8% и 84,9% соответственно; согласие в изменениях системной терапии было достигнуто в 77,4% случаев [7].

Мобильная ТД и теледерматоскопия (ТДС) включают в себя расширение услуги специализированной ТМ, позволяющие отправлять и принимать данные посредством смартфонов соответствующих приложений. Опрос практикующих дерматологов Австралии показал, что более 50% респондентов отправляли или получали клинические изображения с помощью смартфона не реже чем раз в неделю; для молодых специалистов и врачей-стажеров этот показатель составил 89% [8].

Основным достоинством ТД исследователи считают возможность значительно улучшить и ускорить доступ к специализированной помощи в недостаточно укомплектованных узкими специалистами отдаленных

районах, что устраняет неравенство граждан в доступности медицинских услуг. Кроме того, ТД может расширить доступ к лечению пациентов, которые сталкиваются с определенными социально-экономическими барьерами: необходимостью ухода за детьми; ограничением подвижности; повышенной социальной тревожностью; сложным рабочим графиком [9]. В этих случаях интерес представляет использование асинхронной ТД-коммуникации: врач оценивает фото, видеоматериалы, результаты обследования вне очного приема, зачастую использует меньше времени на каждый конкретный случай, что можно рассматривать как преимущество в условиях нехватки специалистов. При этом предполагается, что на заочной консультации пациент не будет испытывать недостаток внимания со стороны врача. По результатам опроса 52-х пациентов с акне, обращавшихся к ТМ-услугам во время пандемии, 92,3% были удовлетворены вниманием, оказанным им дерматологом; 86,5% пациентов были довольны продолжительностью визита [10].

Более того, с помощью ТД на уровне врача общей практики можно осуществлять скрининг различных дерматологических заболеваний, распределяя пациентов по неотложности ситуации на «немедленные» и «отсроченные» группы для последующей специализированной помощи. Предложены простые техники улучшения качества изображений новообразований и повреждений кожи, выполняемых пациентами самостоятельно для последующего общетерапевтического SAF-консультирования: техника «ленточной ТД» (нанесение иммерсионной жидкости на изображение, последующее покрытие исследуемой области прозрачной липкой лентой, получение изображения с помощью смартфона) [11]; техника «капельной ТД» (использование прозрачных спиртовых антисептических растворов и последующая фотофиксация без использования липкой ленты) [12].

Ограничения теледерматологии

Несмотря на то что потенциальные преимущества ТМ очевидны и дерматология как дисциплина, во многом ориентированная на изображения, представляется наиболее подходящей областью медицины для использования ТМ, ее широкое внедрение в этой сфере встречает серьезное профессиональное сопротивление. Например, неудовлетворительное качество видеотрансляции или обмен неудачными имиджевыми файлами могут усложнять взаимодействие между врачом и пациентом, приводить к разным ошибкам. Изображения пораженных частей тела с недостаточным разрешением, а также ограниченное фотографирование интимных частей тела с высыпаниями, могут стать серьезным препятствием для оценки морфологических элементов, для анализа развития заболевания, для диагностического поиска и определения необходимого объема обследования.

При работе в формате ТД могут возникнуть не только технические сложности, включающие интеграцию сетей передачи данных, вопросы лицензирования ТМ-систем, объединения данных ТД с электронными картами пациентов, вопросы финансовой отчетности, но и этические дилеммы, связанные с конфиденциальностью предоставляемой информации, контролем качества медицинской помощи и регулирования последующей ответственности врача как следствие «заочного осмотра» специалистом, особенно если врач и консультируемый находятся в разных юрисдикциях [13].

Одна из главных этических проблем ТД — утрата «живого» контакта между врачом и пациентом. На очной консультации дерматолог проводит общий и специализированный инструментальный осмотр пациента, например люминисцентное обследование, диаскопию и т. д., позволяющие различить десятки заболеваний и поставить предположительный диагноз, в том числе по запаху человека или характеру шелушения, по тактильным ощущениям при пальпации, по изменению цвета кожи при окрашивании специальными красителями. ТД консультация лишает врача такой возможности. В исследовании, посвященном оценке отношения пациентов к техническому опыту использования синхронной ТМ во время COVID-19, подавляющее большинство пациентов сообщили об удовлетворенности качеством медицинских услуг, но при этом 68,7% пациентов указали, что в следующий раз предпочтут личную консультацию, а не виртуальную [14].

Несмотря на многолетние усилия имплементировать ТД и ТДС для скрининга злокачественных кожных новообразований [15], по мере продолжения пандемии стало очевидно, что дистанционное пролонгирование динамического наблюдения, отсрочка очного осмотра и хирургического вмешательства могут привести к обострению хронической патологии, задержке выявления и лечения онкологических нозологий. Заметным ограничением ТДС является невозможность полноценного и регулярного осмотра кожного покрова. В связи с тем, что заболеваемость меланомой в пре-пандемический период увеличивалась быстрее, чем любого другого предотвратимого рака [16], ТДС-нововведения могут усилить эту опасную тенденцию [17] и привести к снижению своевременной диагностики и увеличению смертности. На основании данных National Cancer Database (153 218 пациентов) изучено влияние и величина временного интервала до окончательного хирургического вмешательства по поводу меланомы кожи I–III стадии на общую выживаемость [18]. При многофакторном анализе клинических случаев на всех стадиях заболевания, пациенты, хирургическое лечение которым было проведено в сроки от 90 до 119 и от 119 дней и более, имели в равной степени более высокий риск смерти по сравнению с теми, кому лечение было проведено в течение 30 дней после биопсии. Напомним, что при раннем выявлении меланомы, выживаемость достигает 99% [19]. При внутригрупповом стадийном анализе в данном исследовании более высокий риск смертности был обнаружен у пациентов в стадии I, получавших лечение после 30 дней; время операции не повлияло на выживаемость при II и III стадиях.

Еще одно существенное ограничение ТД — невозможность обеспечить процедурный уход [20]. Его отметили на ранней стадии пандемии [21], что коррелировало с ситуацией в других областях медицины, где необходимы различные манипуляции, которые сложно или даже невозможно выполнить неспециалисту в домашних условиях, стала проблемой.

Таким образом, несмотря на понятный в пандемию энтузиазм, связанный с обеспечением доступа к дерматологической помощи, ТД всё еще не может конкурировать с очной медицинской консультацией и должна применяться только в безальтернативных ситуациях и при достаточной квалификации дерматолога. При этом проблемой оказывается и подтверждение компетентности и профессионализма врача, к которому пациент может обратиться нередко из любой точки мира.

Важно также отметить, что ТД не может полностью решить проблему доступности медицинской помощи, поскольку не все пациенты обладают необходимым уровнем грамотности, имеют доступ к широкополосному интернету и техническим устройствам для фотографирования и видеосвязи. Эта проблема актуальна для многих стран и регионов мира. Так, в Индии, где очень остро ощущается дефицит дерматологов, ТД рассматривали как многообещающую возможность революционизировать дерматологическую помощь в период кризиса COVID-19. Однако доступ к стабильному интернет-соединению и технологическая неграмотность стали серьезными препятствиями для ее широкого внедрения в этой стране [22].

Теледерматология и образование специалистов

ТМ в формате «врач-врач» оценивают также как важный образовательный инструмент для студентов медицинских вузов, дерматологов-ординаторов, специалистов с небольшим опытом практической деятельности для совершенствования профессиональной компетенции [23]. Некоторые специалисты считают, что включение ТД в учебные программы ординатуры может оказать значительное влияние на формирование профессиональной компетенции дерматологов.

Кроме того, такие технологии онлайн-образования, как видеолекции, интерактивные телеконференции, виртуальная микроскопия, моделирование клинических ситуаций, стали очень популярными в среде студентов медицинских вузов, врачей-ординаторов и показали свою эффективность; они могут составить значительную часть самостоятельного клинического обучения и позволят объективизировать последующую оценку знаний. Согласно опросу кураторов программ ординатуры по дерматологии в 2016 г., 69% респондентов проявили заинтересованность в потенциальном включении ТМ в свои образовательные активы [24].

Однако, для того чтобы практиковать в полном объеме, врач-дерматолог должен обладать не только широкими теоретическими познаниями, большим объемом имиджевой памяти, но и умело владеть различными процедурными и хирургическими навыками. Сегодня трансляция хирургических операций, проводимых высококвалифицированными специалистами в онлайн-режиме, не редкость. Но несмотря на всю привлекательность ТМ, ее реальная применимость для студентов, врачей-ординаторов и врачей со стажем работы не одинакова [25]. Опыт Нидерландов и Австралии, где ТД интегрирована в систему здравоохранения как важное дополнение традиционной дерматологической помощи, а электронные записи доступны для всех пользователей системы, представляет собой успешную модель использования новой технологии [26].

Теледерматология в контексте «цифровизации» медицины

Использование ТМ в дерматологии — часть более широкой тенденции цифровизации медицины, расширения ее возможностей благодаря активному внедрению информационно-коммуникативных технологий на разных уровнях организации системы здравоохранения, а также во внеклинической сфере в результате быстрого развития рынка мобильного здравоохранения (mHealth).

Активно развиваются программы поддержки врачебных решений, основанные на технологиях глубокого обучения

и искусственного интеллекта (ИИ). В 2020 г. опубликованы результаты сравнительного анализа диагностической производительности человека и системы ResNet34, представляющей собой сверточную нейронную сеть (convolutional neural network, CNN), участвующую в построении современных моделей для компьютерного зрения в разных условиях. В попытке определить оптимальные условия для последующего выгодного взаимодействия между «машиной» и человеком в исследовании участвовало 302 врача из 41 страны, среди которых сертифицированные дерматологи составляли 56,0%, дерматологи-резиденты — 25,5% и врачи общей практики — 12,6%. При тестировании на обучающем наборе (1412 дерматоскопических изображений) из различных новообразований кожи (меланомы, базальноклеточная карцинома, актинический кератоз, интраэпителиальная карцинома, меланоцитарные невусы, доброкачественные кератинизированные новообразования, дерматофибромы, сосудистые новообразования) чувствительность ResNet34 по всем категориям новообразований составила 77,7%, точность — 80,3%. При этом максимальную пользу ResNet34 продемонстрировала для группы пигментных образований актинического кератоза и интраэпителиальной карциномы, нежели для других категорий образований. Цифровая поддержка принятия врачом решения в рамках мультиклассовой сортировки изображений улучшила точность работы участников с 63,6 до 77,0%, но в то же время не оказала значимого влияния при прогнозировании злокачественности новообразований в лабораторных условиях. По мнению авторов исследования, производительность компьютерных систем на основе искусственного интеллекта должна проходить тестирование не только в реальных условиях,

но и предполагаемым пользователем, их не следует предлагать для широкого использования в качестве автономного устройства [27].

Однозначно, что в ближайшее время диагностические системы на основе ИИ не заменят дерматологов, но уже сегодня нельзя отрицать их значение при постановке диагноза и для увеличения объемов оказания помощи. К применению ИИ-технологий должны быть готовы и врачи, и пациенты, понимающие преимущества и ограничения технологических инноваций в здравоохранении с учетом специфики дерматологии как области медицины.

Заключение

Опыт активного использования ТД в период пандемии показал как ее потенциал, так и ограничения, многие из которых специалисты обсуждали ранее. Очевидно, что часть проблем будет постепенно разрешена в результате развития новых технологий (например, улучшение качества изображений), разработки этико-правовых норм (проблема защиты конфиденциальности), преодоления «цифрового разрыва» между поколениями, активного внедрения программ по ТД в медицинское образование и будет стимулировать дальнейшее развитие этой сферы здравоохранения. Однако для развития ТД в социально ответственном и пациентоориентированном направлении важно понимание как специфики оказания помощи в дерматологии (необходимость зрительного и инструментального осмотра, личного контакта), так и особенностей взаимодействия врача и пациента, во многом определяющих успех лечебно-диагностических процедур и мероприятий.

Литература

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30.11.2017 № 965н «Об утверждении порядка организации и оказания медицинской помощи с применением телемедицинских технологий». Доступно по ссылке: <http://www.pravo.gov.ru>.
2. Kanthraj GR. Teledermatology: Its role in dermatosurgery. *J Cutan Aesthet Surg*. 2008; 1 (2): 68–74. PubMed PMID: 20300347.
3. Kennedy J, Arey S, Hopkins Z, Tejasvi T, Farah R, Secrest AM, et al. Dermatologist perceptions of teledermatology implementation and future use after COVID-19 demographics, barriers, and insights. *JAMA Dermatol*. 2021; 157 (5): 595–7. PubMed PMID: 33787839. DOI: 10.1001/jamadermatol.2021.0195.
4. Moreno-Ramirez D, Argenziano G. Teledermatology and mobile applications in the management of patients with skin lesions. *Acta Derm Venereol*. 2017; Suppl 218: 31–35. PubMed PMID: 28676881.
5. Lee JJ, English JC III. Teledermatology: A review and update. *Am J Clin Dermatol*. 2018; 19 (2): 253–60. PubMed PMID: 28871562.
6. Kazi R, Evankovich MR, Liu R, Liu A, Moorhead A, Ferris L K, et al. Utilization of asynchronous and synchronous teledermatology in a large health care system during the COVID-19 pandemic. *Telemedicine and e-Health*. 2021; 27 (7): 771–7. PubMed PMID: 33074786.
7. Keller JJ, Johnson JP, Latour E. Inpatient teledermatology: diagnostic and therapeutic concordance among a hospitalist, dermatologist, and teledermatologist using store-and-forward teledermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 82 (5): 1262–7. PubMed PMID: 31972258.
8. Abbott LM, Magnusson RS, Gibbs E, Smith SD. Smartphone use in dermatology for clinical photography and consultation: Current practice and law. *Australas J Dermatol*. 2018 May; 59 (2): 101–7. PubMed PMID: 28247404.
9. Pulsipher KJ, Presley CL, Rundle CW, Rietcheck HR, Millitelo M, Dellavalle RP. Teledermatology application use in the COVID-19 era. *Dermatology Online Journal*. 2020; 26 (12). PubMed PMID: 33423415.
10. Ruggiero A, Megna M, Annunziata MC, Abategiovanni L, Scalvenzi M, Tajani A, et al. Teledermatology for acne during COVID-19: high patients' satisfaction in spite of the emergency. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (11): e662–e663. PubMed PMID: 32534472.
11. Blum A, Giacomel J. «Tape dermatoscopy»: constructing a low-cost dermatoscope using a mobile phone, immersion fluid and transparent adhesive tape. *Dermatol Pract Concept*. 2015; 5 (2): 87–93. PubMed PMID: 26114061.
12. Kaliyadan F, Jayasree P, Ashique KT. Drop dermoscopy for teledermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2021. 84 (1): e25–e26. PubMed PMID: 32771542.
13. Adekun A, Sager MA, Lipoff JB. Bridging the divide, virtually: ethics of teledermatology. *Dermatoethics. Contemporary ethics and professionalism in dermatology*. Springer Nature Switzerland AG. 2021: 59–58.
14. Pearlman RL, Le PB, Brodell RT, Nahar VK. Evaluation of patient attitudes towards the technical experience of synchronous teledermatology in the era of COVID-19. *Arch Dermatol Res*. 2021. 5:1–4. PubMed PMID: 33403572.
15. Kroemer S, Fröhlich J, Campbell TM, Massone C, Schwantzer G, Soyer HP, et al. Mobile teledermatology for skin tumour screening: diagnostic accuracy of clinical and dermoscopic image tele-evaluation using cellular phones. *Br J Dermatol*. 2011; 164: 973–9. PubMed PMID: 21219286.
16. Okhovat JP, Beaulieu D, Tsao H, Halpern AC, Michaud DS,

- Shaykevich S, et al. The first 30 years of the American academy of dermatology skin cancer screening program: 1985-2014. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 79: 884-91. PubMed PMID: 30057360.
17. Rustad AM, Lio PA. Pandemic pressure: teledermatology and health care disparities. *J Patient Exp*. 2021; 8: 2374373521996982. PubMed PMID: 34179385.
 18. Conic RZ, Cabrera CI, Khorana AA, Gastman BR. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 78 (1): 40-46.e7. PMID: 29054718.
 19. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. January 8, 2021. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancerorg/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>.
 20. Farr MA, Duvic M, Joshi TP. Teledermatology during COVID-19: an updated review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2021; Apr 9: 1-9. PubMed PMID: 33835345.
 21. Perkins S, Cohen JM, Nelson CA, Bunick CG. Teledermatology in the era of COVID-19: experience of an academic department of dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2020; 83 (1): e43-e44. PubMed PMID: 32305442.
 22. Ashique KT, Kaliyadan F. Teledermatology in the wake of COVID-19 scenario: An Indian perspective. *Indian Dermatology Online Journal*. 2020; 11 (3): 301. PubMed PMID: 32695684.
 23. Boyers LN, Schultz A, Baceviciene R, Blaney S, Marvi N, Dellavalle RP, et al. Teledermatology as an educational tool for teaching dermatology to residents and medical students. *Telemedicine and e-Health*. 2015; 21 (4): 312-4. PubMed PMID: 25635528.
 24. Wanat KA, Newman S, Finney KM, Kovarik CL, Lee I. Teledermatology education: current use of teledermatology in US residency programs. *J Grad Med Educ*. 2016; 8 (2): 286-7. PubMed PMID: 27168912.
 25. Jones VA, Clark KA, Puyana C, Tsoukas MM. Rescuing medical education in times of COVID-19. *Clin Dermatol*. 2021; 39(1): 33-4.
 26. Tensen E, Van Der Heijden JP, Jaspers MWM, Witkamp L. Two decades of teledermatology: current status and integration in national healthcare systems. *Curr Dermatol Rep*. 2016; 5 (2): 96-104. PubMed PMID: 27182461.
 27. Tschandl P, Rinner C, Apalla Z, Argenziano G, Codella N, Halpern A, et al. Human-computer collaboration for skin cancer recognition. *Nature Medicine*. 2020; 26 (8): 1229-34. PubMed PMID: 32572267.
- ### References
1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 30.11.2017 # 965н «Об утверждении порядка организации и оказания медицинской помощи с применением телемедицинских технологий». Доступно по ссылке: <http://www.pravo.gov.ru>. Russian.
 2. Kanthraj GR. Teledermatology: Its role in dermatosurgery. *J Cutan Aesthet Surg*. 2008; 1 (2): 68-74. PubMed PMID: 20300347.
 3. Kennedy J, Arey S, Hopkins Z, Tejasvi T, Farah R, Secrest AM, et al. Dermatologist perceptions of teledermatology implementation and future use after COVID-19 demographics, barriers, and insights. *JAMA Dermatol*. 2021; 157 (5): 595-7. PubMed PMID: 33787839. DOI: 10.1001/jamadermatol.2021.0195.
 4. Moreno-Ramirez D, Argenziano G. Teledermatology and mobile applications in the management of patients with skin lesions. *Acta Derm Venereol*. 2017; Suppl 218: 31-35. PubMed PMID: 28676881.
 5. Lee JJ, English JC III. Teledermatology: A review and update. *Am J Clin Dermatol*. 2018; 19 (2): 253-60. PubMed PMID: 28871562.
 6. Kazi R, Evankovich MR, Liu R, Liu A, Moorhead A, Ferris L K, et al. Utilization of asynchronous and synchronous teledermatology in a large health care system during the COVID-19 pandemic. *Telemedicine and e-Health*. 2021; 27 (7): 771-7. PubMed PMID: 33074786.
 7. Keller JJ, Johnson JP, Latour E. Inpatient teledermatology: diagnostic and therapeutic concordance among a hospitalist, dermatologist, and teledermatologist using store-and-forward teledermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 82 (5): 1262-7. PubMed PMID: 31972258.
 8. Abbott LM, Magnusson RS, Gibbs E, Smith SD. Smartphone use in dermatology for clinical photography and consultation: Current practice and law. *Australas J Dermatol*. 2018 May; 59 (2): 101-7. PubMed PMID: 28247404.
 9. Pulsipher KJ, Presley CL, Rundle CW, Rietcheck HR, Millitelo M, Dellavalle RP. Teledermatology application use in the COVID-19 era. *Dermatology Online Journal*. 2020; 26 (12). PubMed PMID: 33423415.
 10. Ruggiero A, Megna M, Annunziata MC, Abategiovanni L, Scalvenzi M, Tajani A, et al. Teledermatology for acne during COVID-19: high patients' satisfaction in spite of the emergency. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (11): e662-e663. PubMed PMID: 32534472.
 11. Blum A, Giacomel J. «Tape dermatoscopy»: constructing a low-cost dermatoscope using a mobile phone, immersion fluid and transparent adhesive tape. *Dermatol Pract Concept*. 2015; 5 (2): 87-93. PubMed PMID: 26114061.
 12. Kaliyadan F, Jayasree P, Ashique KT. Drop dermoscopy for teledermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2021. 84 (1): e25-e26. PubMed PMID: 32771542.
 13. Adekun A, Sager MA, Lipoff JB. Bridging the divide, virtually: ethics of teledermatology. *Dermatoethics*. Contemporary ethics and professionalism in dermatology. Springer Nature Switzerland AG. 2021: 59-58
 14. Pearlman RL, Le PB, Brodell RT, Nahar VK. Evaluation of patient attitudes towards the technical experience of synchronous teledermatology in the era of COVID-19. *Arch Dermatol Res*. 2021. 5:1-4. PubMed PMID: 33403572.
 15. Kroemer S, Frühauf J, Campbell TM, Massone C, Schwantzer G, Soyer HP, et al. Mobile teledermatology for skin tumour screening: diagnostic accuracy of clinical and dermoscopic image tele-evaluation using cellular phones. *Br J Dermatol*. 2011; 164: 973-9. PubMed PMID: 21219286.
 16. Okhovat JP, Beaulieu D, Tsao H, Halpern AC, Michaud DS, Shaykevich S, et al. The first 30 years of the American academy of dermatology skin cancer screening program: 1985-2014. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 79: 884-91. PubMed PMID: 30057360.
 17. Rustad AM, Lio PA. Pandemic pressure: teledermatology and health care disparities. *J Patient Exp*. 2021; 8: 2374373521996982. PubMed PMID: 34179385.
 18. Conic RZ, Cabrera CI, Khorana AA, Gastman BR. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 78 (1): 40-46.e7. PMID: 29054718.
 19. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. January 8, 2021. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancerorg/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>.
 20. Farr MA, Duvic M, Joshi TP. Teledermatology during COVID-19: an updated review. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2021; Apr 9: 1-9. PubMed PMID: 33835345.
 21. Perkins S, Cohen JM, Nelson CA, Bunick CG. Teledermatology in the era of COVID-19: experience of an academic department of dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2020; 83 (1): e43-e44. PubMed PMID: 32305442.
 22. Ashique KT, Kaliyadan F. Teledermatology in the wake of COVID-19 scenario: An Indian perspective. *Indian Dermatology Online Journal*. 2020; 11 (3): 301. PubMed PMID: 32695684.
 23. Boyers LN, Schultz A, Baceviciene R, Blaney S, Marvi N, Dellavalle RP, et al. Teledermatology as an educational tool for teaching dermatology to residents and medical students. *Telemedicine and e-Health*. 2015; 21 (4): 312-4. PubMed PMID: 25635528.
 24. Wanat KA, Newman S, Finney KM, Kovarik CL, Lee I. Teledermatology education: current use of teledermatology in US residency programs. *J Grad Med Educ*. 2016; 8 (2): 286-7. PubMed PMID: 27168912.
 25. Jones VA, Clark KA, Puyana C, Tsoukas MM. Rescuing medical education in times of COVID-19. *Clin Dermatol*. 2021; 39(1): 33-4.

26. Tensen E, Van Der Heijden JP, Jaspers MWM, Witkamp L. Two decades of teledermatology: current status and integration in national healthcare systems. *Curr Dermatol Rep.* 2016; 5 (2): 96–104. PubMed PMID: 27182461.
27. Tschandl P, Rinner C, Apalla Z, Argenziano G, Codella N, Halpern A, et al. Human-computer collaboration for skin cancer recognition. *Nature Medicine.* 2020; 26 (8): 1229–34. PubMed PMID: 32572267.

РЕТИНАЛЬНЫЕ АНОМАЛИИ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ, СУПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АБЕРРАНТНЫЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ ГЕН FUS[1-359]

В. О. Солдатов¹ ✉, М. С. Кухарский², М. О. Солдатова³, О. А. Пученкова¹, Ю. А. Никитина², Е. А. Лысикова², Н. Л. Карташкина⁴, А. В. Дейкин¹, М. В. Покровский¹

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

² Институт физиологически активных веществ, Москва, Россия

³ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

Повреждение сетчатки является неклассическим симптомом ряда нейродегенеративных заболеваний, включая боковой амиотрофический склероз (БАС). Целью работы было оценить морфофункциональное состояние сетчатки в мышинной модели БАС, связанной с суперэкспрессией аберрантного белка FUS[1-359]. Исследование проводили на 12 трансгенных и 13 диких мышах 2,5–3-месячного возраста. Выявлено, что трансгенные мыши демонстрируют выраженную, но не достигающую статистической значимости тенденцию к развитию офтальмологических аномалий сетчатки. Кроме того, молекулярно-биологический анализ подтвердил увеличение экспрессии провоспалительных генов *Vegfa*, *Il1b*, *Il6*, *Icam1*, *Tnfa*. При этом, несмотря на обнаруженные структурные и функциональные аномалии, вестерн-блот анализ и количественная ПЦР не выявили экспрессию белкового и мРНК продукта трансгена FUS в сетчатке мутантных мышей.

Ключевые слова: белок FUS, трансгенные мыши, БАС, ретинопатия, воспаление

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-90114.

Вклад авторов: В. О. Солдатов — разработка идеи и дизайна эксперимента, проведение офтальмоскопии, написание статьи, подбор праймеров для оценки экспрессии генов; М. С. Кухарский — разработка идеи и дизайна эксперимента, написание статьи, проведение иммуноблоттинга; М. О. Солдатова — выделение РНК, проведение ПЦР в реальном времени; О. А. Пученкова — забор материала для молекулярно-биологических исследований, выделение РНК, проведение ПЦР в реальном времени; Ю. А. Никитина — подготовка популяции животных, генотипирование, проведение иммуноблоттинга; Е. А. Лысикова — подготовка популяции животных, генотипирование, написание статьи; Карташкина Н. Л. — описание офтальмоскопической картины, написание статьи; А. В. Дейкин — консультация по основной идее и дизайну исследования; М. В. Покровский — консультация по основной идее и дизайну исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 5/19–25 от 25 сентября 2019 г.), проведено с соблюдением требований Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

✉ Для корреспонденции: Владислав Олегович Солдатов
ул. Победы, д. 85, 308015, г. Белгород; zinkfingers@gmail.com

Статья получена: 19.08.2021 Статья принята к печати: 28.08.2021 Опубликована онлайн: 31.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.043

RETINAL ABNORMALITIES IN TRANSGENIC MICE OVEREXPRESSING ABERRANT HUMAN FUS[1-359] GENE

Soldatov VO¹ ✉, Kukharsky MS², Soldatova MO³, Puchenkova OA¹, Nikitina YuA², Lysikova EA², Kartashkina NL⁴, Deykin AV¹, Pokrovskiy MV¹

¹ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

² Institute of Physiologically Active Substances, Moscow, Russia

³ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Retinal damage is an optional sign in a number of neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The aim of this work was to assess the structural and functional state of the retina in a murine model of ALS caused by overexpression of the aberrant FUS protein [1-359]. The retinal examination was carried out on 12 transgenic and 13 wild-type mice of 2.5–3 months of age. The study revealed not statistically significant higher level of ophthalmoscopic violations in FUS[1-359] mice. Moreover, gene expression assay confirmed an increased expression of the inflammatory genes *Vegfa*, *Il1b*, *Il6*, *Icam1*, *Tnfa*. However, despite the detected structural and functional abnormalities, western blot analysis and quantitative PCR did not detect the expression of the protein and mRNA products of the FUS transgene in the retina of FUS[1-359] mice.

Keywords: FUS protein, transgenic mice, ALS, retinopathy, inflammation

Funding: the study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the scientific project № 19-315-90114.

Author contribution: Soldatov VO — the main idea, design of the experiment, ophthalmoscopy, writing an article, design of primers for gene expression assay; Kukharsky MS — the main idea, design of the experiment, writing an article, western blot analysis; Soldatova MO — RNA isolation, qPCR; Puchenkova OA — retina and spinal cord collection, RNA extraction, qPCR; Nikitina YuA — preparation of animal populations, genotyping, western blot analysis; Lysikova EA — preparation of animal populations, genotyping, western blot analysis, writing an article; Kartashkina NL — interpretation and scoring of ophthalmoscopic picture; Deykin AV — consultation on the main idea and design of the study; Pokrovskiy MV — consultation on the main idea and design of the study.

Compliance with ethical standards: animal procedures were approved by the local ethics committee of the Belgorod State National Research University (protocol № 5 / 19–25 dated september 25. 2019). All manipulations were carried out in compliance with the requirements of the International Recommendations of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (1997).

✉ Correspondence should be addressed: Vladislav O. Soldatov
Pobedy, 85, 308015, Belgorod; pharmsoldatov@gmail.com

Received: 19.08.2021 Accepted: 28.08.2021 Published online: 31.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.043

Сетчатка является наиболее доступным для изучения отделом нервной системы и одной из самых уязвимых сенсорных тканей. Подобные свойства актуализировали изучение офтальмологических коррелятов неврологических заболеваний, открывая возможности для улучшения диагностики и изучения нейродегенеративных процессов. За счет эмбриональной общности и схожести протеомного состава сетчатка может выступать платформой для развития тех же патологических каскадов, что и центральная нервная система [1]. В частности, повреждение сетчатки было обнаружено при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) [2, 3], заболевании, для которого характерна прогрессирующая гибель мотонейронов вследствие накопления нерастворимых белковых агрегатов [4].

Белковые включения при БАС имеют сложный состав и могут состоять из различных белков, среди которых чаще всего обнаруживают РНК-связывающие белки или антиоксидантный фермент супероксиддисмутазу 1, а также другие компоненты: нейрофиламенты, убиквитин [5]. В 5% семейных случаев БАС ассоциирован с накоплением агрегатов, основным компонентом которых является белок FUS. Одна из причин развития FUS-протеинопатии — мутации в домене сигнала ядерной локализации (NLS) и выход белка из ядра в цитоплазму, где он приобретает способность к формированию нерастворимых агрегатов [6].

Цель данного исследования — оценить взаимосвязь между нейрональной экспрессией патологической формы белка FUS и активацией некоторых патологических путей в сетчатке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В качестве модельного объекта FUS-протеинопатии были использованы мыши, несущие трансген аберрантного человеческого гена FUS с искусственно укороченным NLS (кодирует укороченный FUS[1-359]) [7]. Данная модель характеризуется манифестирующей в возрасте 3–4 месяцев клинической картиной БАС, которая сопровождается развитием морфологических и молекулярных признаков нейродегенерации, включая гибель нейронов и нейровоспаление [8].

Исследование проводили на 25 мышях (обоих полов) линии CD-1, 12 из которых были гемизиготами FUS, а 13 служили контролем дикого типа. Мышей содержали в условиях постоянного доступа к воде и корму. Световой цикл — 12 ч/12 ч, интенсивность освещения — 40–50 лк, температура воздуха — 23 ± 1 °C, влажность — $42 \pm 5\%$. В возрасте 80–90 дней мышей седатировали (золазепам + тилетамин + ксилазин) для проведения офтальмоскопии. Перед седацией проводили клинический осмотр для исключения животных с признаками воспалительных изменений наружной камеры глаза.

Офтальмоскопическое исследование проводили после аппликации 1%-го атропина сульфата. Для объективизации анализа офтальмолог оценивал картину глазного дна по балльной шкале от 0 до 5, где 0 баллов — отсутствие нарушений, а 5 баллов — грубые аномалии. Данные офтальмоскопического анализа представлены в виде $M \pm SD$, проверку статистической значимости межгрупповых различий проводили по критерию Краскелла–Уоллиса. После офтальмоскопического исследования животных эвтаназировали передозировкой

наркоза и отбирали биоматериал для молекулярного анализа: у 6 животных из каждой группы извлекали образцы сетчатки для изучения генной экспрессии, а у 4 собирали образцы сетчаток и люмбального отдела спинного мозга для проведения вестерн-блоттинга.

Количественная ПЦР

Ткани контрлатеральных сетчаток от каждого животного пуллировали и инкубировали 15 мин в растворе ExtractRNA («Евроген»; Россия). После лизирования образца в реагенте его подвергали хлороформной экстракции, а образовавшийся осадок РНК промывали последовательно изопропиловым спиртом и 70%-ным этиловым спиртом. Полученный осадок разбавляли в 20 мкл воды и с использованием спектрофотометра IMPLENNanoPhotometer® (Implen; Германия) измеряли концентрацию полученной РНК (~200 нг/мкл). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Евроген; Россия).

Праймеры для количественной ПЦР подбирали с использованием ресурса Primer-BLAST (NCBI) с соблюдением ряда условий: 1) температура плавления 59–61 °C; 2) один из праймеров в паре должен отжигаться на область межэкзонного соединения; 3) прямой и обратный праймеры не должны образовывать ауто- и кроссдимеров в одной смеси; 4) размер ПЦР-продукта должен быть от 95 до 200 п.н.; праймеры должны быть специфичны к максимальному количеству транскриптов гена.

Затем в амплификаторе BioRad CFX96 проводили ПЦР образцов с использованием интеркалирующего красителя SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories, Inc.; США) и олигонуклеотидных праймеров («Евроген»; Россия) (табл.). Уровень экспрессии генов интереса (GOI) оценивали относительно генов домашнего хозяйства (HKG) *Gapdh* и *Actb*. Расчет экспрессии в конкретной точке производился по формуле: Экспрессия гена = $2^{-\Delta[Ct(HKG)-Ct(GOI)]}$.

Иммуноблоттинг

Образцы сетчатки пуллировали от двух животных, принадлежащих к одной группе.

После разделения в геле белки переносили методом полусухого электроблоттинга на поливинилденфторидную мембрану Hybond-P (Cytiva; Великобритания), предварительно обработанную 100%-м метанолом, промытую водой MilliQ и замоченную в буфере для переноса, содержащем 25 мМ Трис, 0,15 мМ глицина, 20% метанола. Помещали гель с плотно прижатой мембраной между двумя листами бумаги Whatman 3 MM, смоченной в буфере для переноса, в аппарат для полусухого блоттинга (GE Healthcare Amersham; США) и переносили белки на мембрану в течение 30 мин при токе 50 мА (1,2 мА на 1 см²). После электроблоттинга промывали мембрану в Трис-Твин-буфере (ТТБ; 50 мМ Трис-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20) 3 раза по 5 мин. Блокировали мембрану в 4%-м растворе обезжиренного сухого молока в ТТБ 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали с первичными антителами в том же растворе при 4 °C в течение ночи. После инкубации с первичными антителами промывали мембрану в ТТБ 3 раза по 5 мин и инкубировали с вторичными антителами 1,5 ч при комнатной температуре. После инкубации мембрану отмывали в ТТБ 3 раза по 5 мин.

Таблица. Праймеры, использованные в данной работе

Мишень	Последовательность праймера 1 (Forward)	Последовательность праймера 2 (Reverse)	Длина продукта, п.н.
<i>Actb</i>	5'-CGC AGC CAC TGT CGA GTC-3'	5'-GCC CAC GAT GGA GGG GAA TA-3'	195
<i>Gapdh</i>	5'-AGG AGA GTG TTT CCT CGT CC-3'	5'-TGA GGT CAA TGA AGG GGT CG-3'	145
<i>Icam1</i>	5'-CAT GCC GCA CAG AAC TGG AT-3'	5'-GGT GTC GAG CTT TGG GAT GG-3'	116
<i>Il6</i>	5'-AAA GCC AGA GTC CTT CAG AGA GA-3'	5'-TGG AAA TTG GGG TAG GAA GGA CT-3'	100
<i>Il1b</i>	5'-GCC ACC TTT TGA CAG TGA TGAG-3'	5'-GAC AGC CCA GGT CAA AGG TT-3'	95
<i>Tnfa</i>	5'-ACT GAA CTT CGG GGT GAT CG-3'	5'-ACT TGG TGG TTT GTG AGT GTG-3'	105
<i>Vegfa</i>	5'-GCA CTG GAC CCT GGC TTT AC-3'	5'-CCA CCA GGG TCT CAA TCG GA-3'	152
<i>Bdnf</i>	5'-CCT GCA TCT GTT GGG GAG AC-3'	5'-GCC TTG TCC GTG GAC GTT T-3'	175
<i>Atg7</i>	5'-GCG GCG ACA GCA TTA GGA TT-3'	5'-ATG GCA GGA AAG CAG TGT GG-3'	118
<i>Atg5</i>	5'-TCA GCT CTT CCT TGG AAC ATC AC-3'	5'-AAG TGA GCC TCA ACC GCA TC-3'	95
<i>Bax</i>	5'-CGA GAG GTC TTC TTC CGG GT-3'	5'-TCT TGG ATC CAG ACA AGC AGC-3'	197
<i>Bcl2</i>	5'-CTG GGA TGC CTT TGT GGA ACT-3'	5'-GGC AGG TTT GTC GAC CTC A-3'	155

Детекцию специфического связывания антител проводили с помощью реагентов ECL Plus (Cytiva; Великобритания) согласно инструкции производителя. Для детекции хемилюминесценции использовали рентгеновскую пленку. Количественный анализ результатов иммуноблотинга проводили с помощью денситометрического анализа, с использованием прибора BioSpectrum AC Chemi HR410 и программного обеспечения Vision Works LS (UVP; Великобритания). При проведении денситометрического анализа специфический сигнал от анализируемого белка нормализовали по отношению к сигналу от β -актина (после реинкубации мембраны с соответствующими антителами) для каждой дорожки отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансгенные мыши FUS[1-359] демонстрируют умеренные офтальмоскопические аномалии

В обеих группах у части животных были обнаружены сосудистые аномалии и отечность диска зрительного нерва, что в целом характерно для мышей линии CD-1 [9, 10]. При статистическом анализе не выявлено достоверных различий между мутантными и дикотипными животными, однако у мышей FUS[1-359] отмечена тенденция к

более выраженным нарушениям по всем исследуемым параметрам (рис. 1).

Аберрантный FUS не экспрессируется в сетчатке

Вестерн-блот-анализ не выявил наличие FUS-иммунопозитивного сигнала в тканях сетчатки трансгенных мышей (рис. 2). Кроме того, при количественной ПЦР также не обнаружена экспрессия FUS на уровне мРНК. Таким образом, анализ экспрессии не подтвердил ретиальную экспрессию трансгена ни на транскриптомном, ни на белковом уровнях.

Трансгенные мыши FUS[1-359] характеризуются увеличенной экспрессией провоспалительных генов в сетчатке

При анализе ретиальной экспрессии целевых генов было обнаружено, что в сетчатке трансгенных мышей FUS[1-359] происходит активация провоспалительных факторов *Vegfa*, *Icam1*, *Il6*, *Il1b* и *Tnfa*. Выраженных изменений экспрессии генов нейрорегенерации (*Bdnf*), аутофагии (*Atg7*, *Atg5*) и регуляции апоптоза (*Bax*, *Bcl2*) обнаружено не было (рис. 3).

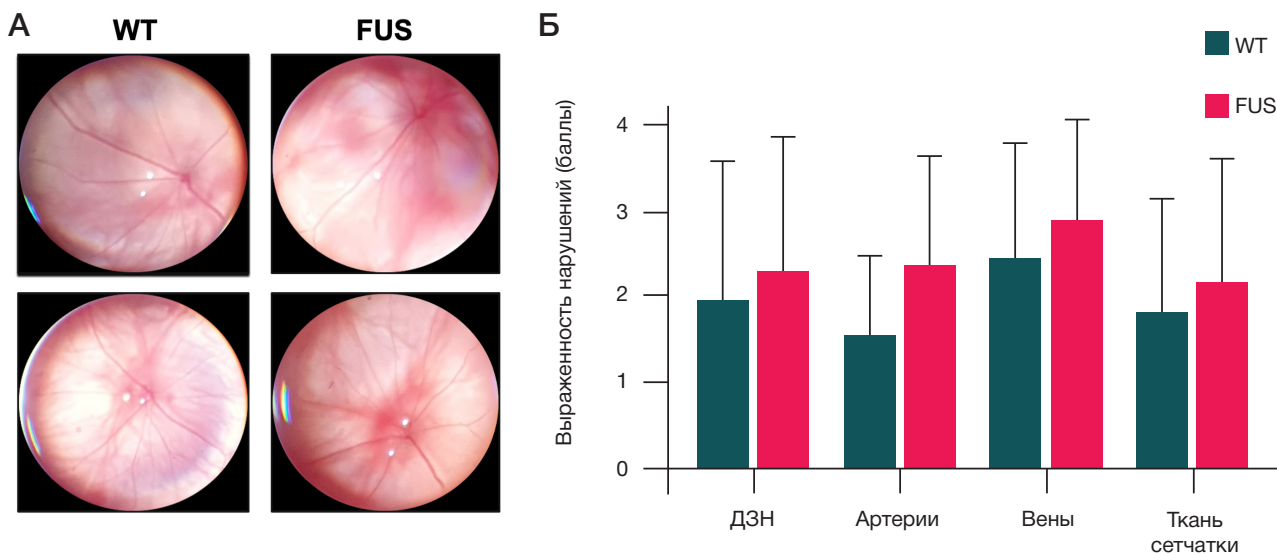


Рис. 1. Результаты офтальмоскопического исследования. А. Снимки офтальмоскопической картины глазного дна экспериментальных животных. Б. Результаты офтальмоскопической балльной оценки глазного дна экспериментальных животных. ДЗН — диск зрительного нерва

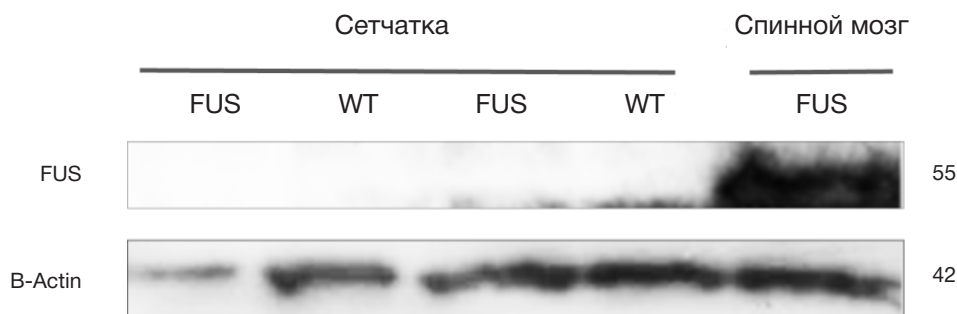


Рис. 2. Отсутствие aberrантного белка FUS в тканях сетчатки трансгенных мышей

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вовлечение сетчатки в патологический процесс было обнаружено при большинстве дегенеративных заболеваний центральной нервной системы, включая болезнь Альцгеймера [11], болезнь Паркинсона [12, 13] и лобно-височную деменцию [14]. Закономерно, что офтальмологические аномалии слабой степени выраженности также являются частым немоторным симптомом БАС [15]. Среди типичных клинических находок описаны нарушение цветового зрения [16], а также истончение сетчатки [17] и желтого пятна [18–20].

В нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимых различий в выраженности патологических изменений сетчатки у исследуемых животных. Тем не менее по всем исследуемым параметрам была выявлена однозначная тенденция к более выраженным нарушениям у трансгенных мышей FUS[1-359]. Особенно яркие различия были обнаружены в отношении артериальной сети, что согласуется с результатами других исследователей [21].

Поскольку иммуноблоттинг и количественная ПЦР показали, что трансген не экспрессируется в сетчатке, мы решили выяснить механизмы дегенерации сетчатки с помощью изучения активности наиболее общих молекулярных путей нейродегенеративного повреждения мотонейронов. В связи с этим в качестве основных целевых мишеней мы выбрали гены, регулирующие воспаление, апоптоз и аутофагию. Несмотря на то что

вовлеченность путей аутофагии [22–24] и апоптоза [25] при БАС была подтверждена в исследованиях *in vivo* и *in vitro*, мы не нашли значимого отклонения в экспрессии генов *Atg7*, *Atg5*, *Bax*, *Bcl2*. Однако среди выбранных мишеней, была выражено изменена экспрессия генов *Vegfa*, *Icam1*, *Il6*, *Il1b* и *Tnfa*, что указывает на роль воспаления в механизмах ретиальной дегенерации у мышей FUS[1-359]. Эти данные согласуются с предыдущими результатами, касающимися драматической роли воспалительной активации (и ее фармакологического подавления) в мышинной модели FUS[1-359] [26, 27].

Таким образом, несмотря на отсутствие ретиальной экспрессии aberrантной формы белка FUS, трансгенные животные имеют признаки дегенеративных изменений сетчатки. Среди потенциальных механизмов повреждения заднего отрезка глаза можно выделить активацию микроглии [28], сосудистую регрессию [20], нейроофтальмологические взаимодействия через лимфатическую систему [29].

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование продемонстрировало, что трансгенные мыши FUS[1-359] склонны к развитию структурных и функциональных аномалий глазного дна, несмотря на отсутствие экспрессии трансгена в сетчатке. Дальнейшие исследования природы выявленных нарушений могут актуализировать наиболее значимые механизмы FUS-ассоциированной ретинопатии.

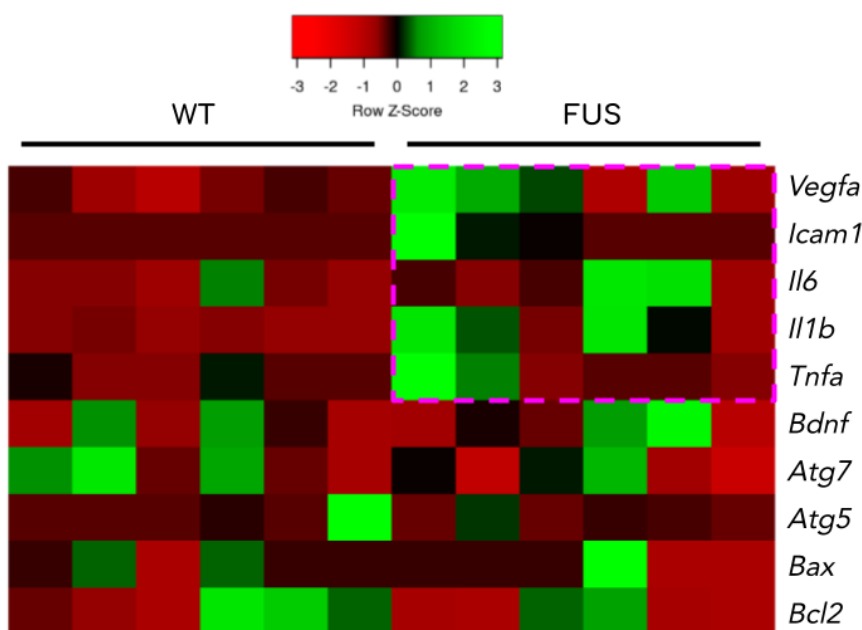


Рис. 3. Нормализованная тепловая карта отражает относительную экспрессию генов воспаления (*Vegfa*, *Icam1*, *Il6*, *Il1b* и *Tnfa*), нейропластичности (*Bdnf*), аутофагии (*Atg7*, *Atg5*) и регуляции апоптоза (*Bax*, *Bcl2*)

Литература

1. Yap TE, Balendra SI, Almonte MT, Cordeiro MF. Retinal correlates of neurological disorders. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019; 10: 2040622319882205. doi:10.1177/2040622319882205
2. Cerveró A, Casado A, Riancho J. Retinal changes in amyotrophic lateral sclerosis: looking at the disease through a new window. *J Neurol*. 2021; 268 (6): 2083–9. DOI: 10.1007/s00415-019-09654-w.
3. Rojas P, de Hoz R, Ramírez AI, et al. Changes in Retinal OCT and their correlations with neurological disability in early ALS Patients, a Follow-Up Study. *Brain Sci*. 2019; 9 (12): 337. DOI: 10.3390/brainsci9120337.
4. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015; 16 (6): 171. DOI: 10.4103/2152-7806.169561.
5. Batra G, Jain M, Singh RS, Sharma AR, Singh A, Prakash A, et al. Novel therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Indian J Pharmacol*. 2019; 51 (6): 418–25. DOI: 10.4103/ijp.IJP_823_19.
6. Zou ZY, Che CH, Feng SY, Fang XY, Huang HP, Liu CY. Novel FUS mutation Y526F causing rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2021; 22 (1–2): 73–79. DOI: 10.1080/21678421.2020.1797815.
7. Shelkovich TA, Peters OM, Deykin AV, et al. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2013; 288 (35): 25266–274. DOI: 10.1074/jbc.M113.492017.
8. Funikov SY, Rezvykh AP, Mazin PV, Morozov AV, Maltsev AV, Chicheva MM, et al. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics*. 2018; 19 (3): 189–204. DOI: 10.1007/s10048-018-0553-9.
9. Mukaratirwa S, Patterino C, Naylor SW, Bradley A. Incidences and Range of Spontaneous Lesions in the Eye of Crl:CD-1(ICR) BR Mice Used in Toxicity Studies. *Toxicol Pathol*. 2015; 43 (4): 530–5. DOI: 10.1177/0192623314548767.
10. De Groef L, Dekeyser E, Geeraerts E, Lefevre E, Stalmans I, Salinas-Navarro M, et al. Differential visual system organization and susceptibility to experimental models of optic neuropathies in three commonly used mouse strains. *Exp Eye Res*. 2016; 145: 235–47. DOI: 10.1016/j.exer.2016.01.006.
11. Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina. *Acta Neuropathol*. 2016; 132 (6): 767–87. DOI: 10.1007/s00401-016-1613-6.
12. Mohana Devi S, Mahalaxmi I, Aswathy NP, Dhivya V, Balachandrar V. Does retina play a role in Parkinson's Disease? *Acta Neurol Belg*. 2020; 120 (2): 257–65. DOI: 10.1007/s13760-020-01274-w.
13. Huang L, Zhang D, Ji J, Wang Y, Zhang R. Central retina changes in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2020; 10. DOI: 10.1007/s00415-020-10304-9.
14. Harrison IF, Whitaker R, Bertelli PM, O'Callaghan JM, Csincsik L, Bocchetta M, et al. Optic nerve thinning and neurosensory retinal degeneration in the rTg4510 mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol Commun*. 2019; 7 (1): 4. DOI: 10.1186/s40478-018-0654-6.
15. Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain*. 2021; 13: 131–46. DOI: 10.2147/EB.S299423.
16. Boven L, Jiang QL, Moss HE. Diffuse colour discrimination as marker of afferent visual system dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroophthalmology*. 2017; 41 (6): 310–4. DOI: 10.1080/01658107.2017.1326153.
17. Rohani M, Meysamie A, Zamani B, Sowlat MM, Akhoundi FH. Reduced retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness in ALS patients: a window to disease progression. *J Neurol*. 2018; 265 (7): 1557–62. DOI: 10.1007/s00415-018-8863-2.
18. Fawzi AA, Simonett JM, Purta P, et al. Clinicopathologic report of ocular involvement in ALS patients with C9orf72 mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2014; 15 (7–8): 569–80. DOI: 10.3109/21678421.2014.951941.
19. Ringelstein M, Albrecht P, Sudmeyer M, et al. Subtle retinal pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014; 1 (4): 290–7. DOI: 10.1002/acn3.46.
20. Rojas P, Ramírez AI, Fernández-Albarral JA, López-Cuenca I, Salobrar-García E, Cadena M, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurodegenerative Motor Neuron Disease With Ocular Involvement. *Front Neurosci*. 2020; 14: 566858. DOI: 10.3389/fnins.2020.566858.
21. Crivello M, Hogg MC, Jirstrom E, Halang L, Woods I, Rayner M, et al. Vascular regression precedes motor neuron loss in the FUS (1-359) ALS mouse model. *Dis Model Mech*. 2019; 12 (8): dmm040238. DOI: 10.1242/dmm.040238.
22. Rudnick ND, Griffey CJ, Guarnieri P, Gerbino V, Wang X, Piersaint JA, et al. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017; 114: E8294–E8303.
23. Evans CS, Holzbaur ELF. Autophagy and mitophagy in ALS. *Neurobiol Dis*. 2019; 122: 35–40. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.07.005.
24. Strohm L, Behrends C. Glia-specific autophagy dysfunction in ALS. *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 99: 172–82. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.05.024.
25. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2014; 112: 24–49. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
26. de Munter JPJM, Shafarevich I, Liundup A, Pavlov D, Wolters EC, Gorlova A, et al. Neuro-Cells therapy improves motor outcomes and suppresses inflammation during experimental syndrome of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *CNS Neurosci Ther*. 2020; 26 (5): 504–17. DOI: 10.1111/cns.13280.
27. Ninkina N. Stem cell therapy and FUS[1-359]-transgenic mice: A recent study highlighting a promising ALS model and a promising therapy. *CNS Neurosci Ther*. 2020; 26 (5): 502–3. DOI: 10.1111/cns.13302.
28. Ramirez AI, de Hoz R, Salobrar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, et al. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci*. 2017; 9: 214. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00214.
29. Dolzhikov AA, Bobytsev II, Belykh AE, Shevchenko OA, Pobeda AS, Dolzhikova IN, et al. Pathogenesis of neurodegenerative pathology and new concepts of transport and metabolic systems of the brain and eye. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2020; (1): 43–57. DOI: 10.21626/vestnik/2020-1/06.

References

1. Yap TE, Balendra SI, Almonte MT, Cordeiro MF. Retinal correlates of neurological disorders. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019; 10: 2040622319882205. doi:10.1177/2040622319882205
2. Cerveró A, Casado A, Riancho J. Retinal changes in amyotrophic lateral sclerosis: looking at the disease through a new window. *J Neurol*. 2021; 268 (6): 2083–9. DOI: 10.1007/s00415-019-09654-w.
3. Rojas P, de Hoz R, Ramírez AI, et al. Changes in Retinal OCT and their correlations with neurological disability in early ALS Patients, a Follow-Up Study. *Brain Sci*. 2019; 9 (12): 337. DOI: 10.3390/brainsci9120337.
4. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015; 16 (6): 171. DOI: 10.4103/2152-7806.169561.
5. Batra G, Jain M, Singh RS, Sharma AR, Singh A, Prakash A, et al. Novel therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Indian*

- J Pharmacol. 2019; 51 (6): 418–25. DOI: 10.4103/ijp.IJP_823_19.
6. Zou ZY, Che CH, Feng SY, Fang XY, Huang HP, Liu CY. Novel FUS mutation Y526F causing rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2021; 22 (1–2): 73–79. DOI: 10.1080/21678421.2020.1797815.
7. Shelkovernikova TA, Peters OM, Deykin AV, et al. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2013; 288 (35): 25266–274. DOI: 10.1074/jbc.M113.492017.
8. Funikov SY, Rezvykh AP, Mazin PV, Morozov AV, Maltsev AV, Chicheva MM, et al. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics.* 2018; 19 (3): 189–204. DOI: 10.1007/s10048-018-0553-9.
9. Mukaratirwa S, Petterino C, Naylor SW, Bradley A. Incidences and Range of Spontaneous Lesions in the Eye of Crl:CD-1(ICR) BR Mice Used in Toxicity Studies. *Toxicol Pathol.* 2015; 43 (4): 530–5. DOI: 10.1177/0192623314548767.
10. De Groef L, Dekeyser E, Geeraerts E, Lefevère E, Stalmans I, Salinas-Navarro M, et al. Differential visual system organization and susceptibility to experimental models of optic neuropathies in three commonly used mouse strains. *Exp Eye Res.* 2016; 145: 235–47. DOI: 10.1016/j.exer.2016.01.006.
11. Hart NJ, Koronyo Y, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Ocular indicators of Alzheimer's: exploring disease in the retina. *Acta Neuropathol.* 2016; 132 (6): 767–87. DOI: 10.1007/s00401-016-1613-6.
12. Mohana Devi S, Mahalaxmi I, Aswathy NP, Dhivya V, Balachandrar V. Does retina play a role in Parkinson's Disease? *Acta Neurol Belg.* 2020; 120 (2): 257–65. DOI: 10.1007/s13760-020-01274-w.
13. Huang L, Zhang D, Ji J, Wang Y, Zhang R. Central retina changes in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* 2020; 10. DOI: 10.1007/s00415-020-10304-9.
14. Harrison IF, Whitaker R, Bertelli PM, O'Callaghan JM, Csincsik L, Bocchetta M, et al. Optic nerve thinning and neurosensory retinal degeneration in the rTg4510 mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2019; 7 (1): 4. DOI: 10.1186/s40478-018-0654-6.
15. Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain.* 2021; 13: 131–46. DOI: 10.2147/EB.S299423.
16. Boven L, Jiang QL, Moss HE. Diffuse colour discrimination as marker of afferent visual system dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroophthalmology.* 2017; 41 (6): 310–4. DOI: 10.1080/01658107.2017.1326153.
17. Rohani M, Meysamie A, Zamani B, Sowlat MM, Akhoundi FH. Reduced retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness in ALS patients: a window to disease progression. *J Neurol.* 2018; 265 (7): 1557–62. DOI: 10.1007/s00415-018-8863-2.
18. Fawzi AA, Simonett JM, Purta P, et al. Clinicopathologic report of ocular involvement in ALS patients with C9orf72 mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014; 15 (7–8): 569–80. DOI: 10.3109/21678421.2014.951941.
19. Ringelstein M, Albrecht P, Sudmeyer M, et al. Subtle retinal pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; 1 (4): 290–7. DOI: 10.1002/acn3.46.
20. Rojas P, Ramírez AI, Fernández-Albarral JA, López-Cuenca I, Salobar-García E, Cadena M, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurodegenerative Motor Neuron Disease With Ocular Involvement. *Front Neurosci.* 2020; 14: 566858. DOI: 10.3389/fnins.2020.566858.
21. Crivello M, Hogg MC, Jirstrom E, Halang L, Woods I, Rayner M, et al. Vascular regression precedes motor neuron loss in the FUS (1-359) ALS mouse model. *Dis Model Mech.* 2019; 12 (8): dmm040238. DOI: 10.1242/dmm.040238.
22. Rudnick ND, Griffey CJ, Guarnieri P, Gerbino V, Wang X, Piersaint JA, et al. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2017; 114: E8294–E8303.
23. Evans CS, Holzbaur ELF. Autophagy and mitophagy in ALS. *Neurobiol Dis.* 2019; 122: 35–40. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.07.005.
24. Strohm L, Behrends C. Glia-specific autophagy dysfunction in ALS. *Semin Cell Dev Biol.* 2020; 99: 172–82. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.05.024.
25. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2014; 112: 24–49. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
26. de Munter JPM, Shafarevich I, Liundup A, Pavlov D, Wolters EC, Gorlova A, et al. Neuro-Cells therapy improves motor outcomes and suppresses inflammation during experimental syndrome of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *CNS Neurosci Ther.* 2020; 26 (5): 504–17. DOI: 10.1111/cns.13280.
27. Ninkina N. Stem cell therapy and FUS[1-359]-transgenic mice: A recent study highlighting a promising ALS model and a promising therapy. *CNS Neurosci Ther.* 2020; 26 (5): 502–3. DOI: 10.1111/cns.13302.
28. Ramirez AI, de Hoz R, Salobar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, et al. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci.* 2017; 9: 214. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00214.
29. Dolzhikov AA, Bobyntsev II, Belykh AE, Shevchenko OA, Pobeda AS, Dolzhikova IN, et al. Pathogenesis of neurodegenerative pathology and new concepts of transport and metabolic systems of the brain and eye. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health".* 2020; (1): 43–57. DOI: 10.21626/vestnik/2020-1/06.

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ SARS-COV-2 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ ВО ВРЕМЕНИ

М. А. Никифорова¹✉, А. Э. Синавин^{1,2}, Е. В. Шидловская¹, Н. А. Кузнецова¹, В. А. Гушчин^{1,3}¹ Научный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Заражение вирусом SARS-CoV-2 происходит не только при непосредственном контакте с инфицированным человеком, но и через поверхности, с которыми соприкасался больной. Вопрос сохранения инфекционного вируса, способного заразить спустя время, остается открытым. Целью исследования было изучить жизнеспособность SARS-CoV-2 на различных модельных поверхностях с течением времени. В качестве модельных материалов были использованы керамическая плитка, металл (алюминиевая фольга), дерево (ДСП), пластик и ткань (полотенце). В ходе исследования проводили оценку наличия РНК SARS-CoV-2 методом количественной ОТ-ПЦР. Жизнеспособность вируса определяли на клеточной линии 293T/ACE2. Показано, что РНК SARS-CoV-2 продолжала детектироваться спустя 360 мин, но значительное снижение РНК на $1 \log_{10}$ копий/мл обнаружено после контакта вируса с тканью (полотенцем). Жизнеспособный вирус практически полностью отсутствовал через 120 мин. На жизнеспособность вируса значительно влияет тип экспериментальной поверхности.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, жизнеспособность, поверхность, ПЦР**Финансирование:** данное исследование было финансировано Министерством здравоохранения РФ в рамках государственного задания #056-00119-21-00**Благодарности:** авторы выражают благодарность И. В. Коробко за идею и обсуждение дизайна исследования.**Вклад авторов:** М. А. Никифорова — планирование эксперимента, работа с вирусом и определение его жизнеспособности, анализ данных, написание текста; А. Э. Синавин — работа с вирусом и определение его жизнеспособности, анализ данных, написание текста; Е. В. Шидловская — ПЦР-анализ, обработка данных, написание текста; Н. А. Кузнецова — ПЦР-анализ; В. А. Гушчин — планирование эксперимента, написание текста.✉ **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Никифорова
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; marianikiforova@inbox.ru**Статья получена:** 25.06.2021 **Статья принята к печати:** 09.07.2021 **Опубликована онлайн:** 13.07.2021**DOI:** 10.24075/vrgmu.2021.033

EVALUATION OF SARS-COV-2 VIABILITY ON EXPERIMENTAL SURFACES OVER TIME

Nikiforova MA¹✉, Siniavin AE^{1,2}, Shidlovskaya EV¹, Kuznetsova NA¹, Gushchin VA^{1,3}¹ Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Infected SARS-CoV-2 virus occurs not only through contact with an infected person, but also through surfaces with which the illness has contacted. The problem of preserving an infectious virus over time capable of infecting remains actual. We evaluated the SARS-CoV-2 viability preservation on different model surfaces over time. Ceramic tiles, metal (aluminum foil), wood (chipboard), plastic and cloth (towel) were used as model materials. Assessment of the presence of SARS-CoV-2 RNA was carried out by quantitative RT-PCR. Viable virus was determined by tissue culture assay on 293T/ACE2 cells. It was found that the SARS-CoV-2 RNA was detected on all studied surfaces for 360 minutes, but a significant decrease RNA by $1 \log_{10}$ copies/ml was detected after contact of the virus with cloth (towel). While the viability of the virus was completely lost after 120 minutes. Type of experimental surface significantly affects viability preservation.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, viability, surface, PCR**Funding:** this research was funded by the grant #056 - 00119 - 21-00 provided by the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia.**Acknowledgments:** the authors are grateful to Dr. I.V. Korobko for the general idea and discussion of the study design.**Author contribution:** Nikiforova MA — experiment planning, working with the virus and determining SARS-CoV-2 viability, data analyzing, writing-original draft preparation; Siniavin AE — working with the virus and determining SARS-CoV-2 viability, data analysing, writing-original draft preparation; Shidlovskaya EV — PCR-analysis, data processing, writing-original draft preparation; Kuznetsova NA — PCR-analysis; Gushchin VA — experiment planning, writing-original draft preparation.✉ **Correspondence should be addressed:** Maria A. Nikiforova
Gamaleya, 18, Moscow, 123098; marianikiforova@inbox.ru**Received:** 25.06.2021 **Accepted:** 09.07.2021 **Published online:** 13.07.2021**DOI:** 10.24075/brsmu.2021.033

Предполагается, что поверхности окружающей среды заражены SARS-CoV-2 и являются возможными источниками передачи COVID-19 [1]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила, что все еще недостаточно научных доказательств жизнеспособности SARS-CoV-2 на инертных поверхностях. Научные данные, касающиеся жизнеспособности SARS-CoV-2 на поверхностях, подтверждают, что вирус может оставаться на разных поверхностях, от нескольких часов до нескольких дней. Например, SARS-CoV-2 стабилен на стекле, нержавеющей стали, картоне и меди в течение 84,

72, 24 и 4 ч соответственно [2]. Однако это не означает, что сама поверхность опасна и при контакте с ней можно заразиться [3, 4]. В то же время показано, что SARS-CoV-2 передается между людьми при прикосновении к поверхностям, с которыми недавно контактировали больные COVID-19 (кашель или чихание), а затем касались рта, носа и глаз [5, 6].

Другие данные показывают, что после трехчасовой инкубации инфекционный вирус не детектируется на бумаге для печати, салфетках и на обработанном дереве и на ткани спустя день. Напротив, SARS-CoV-2

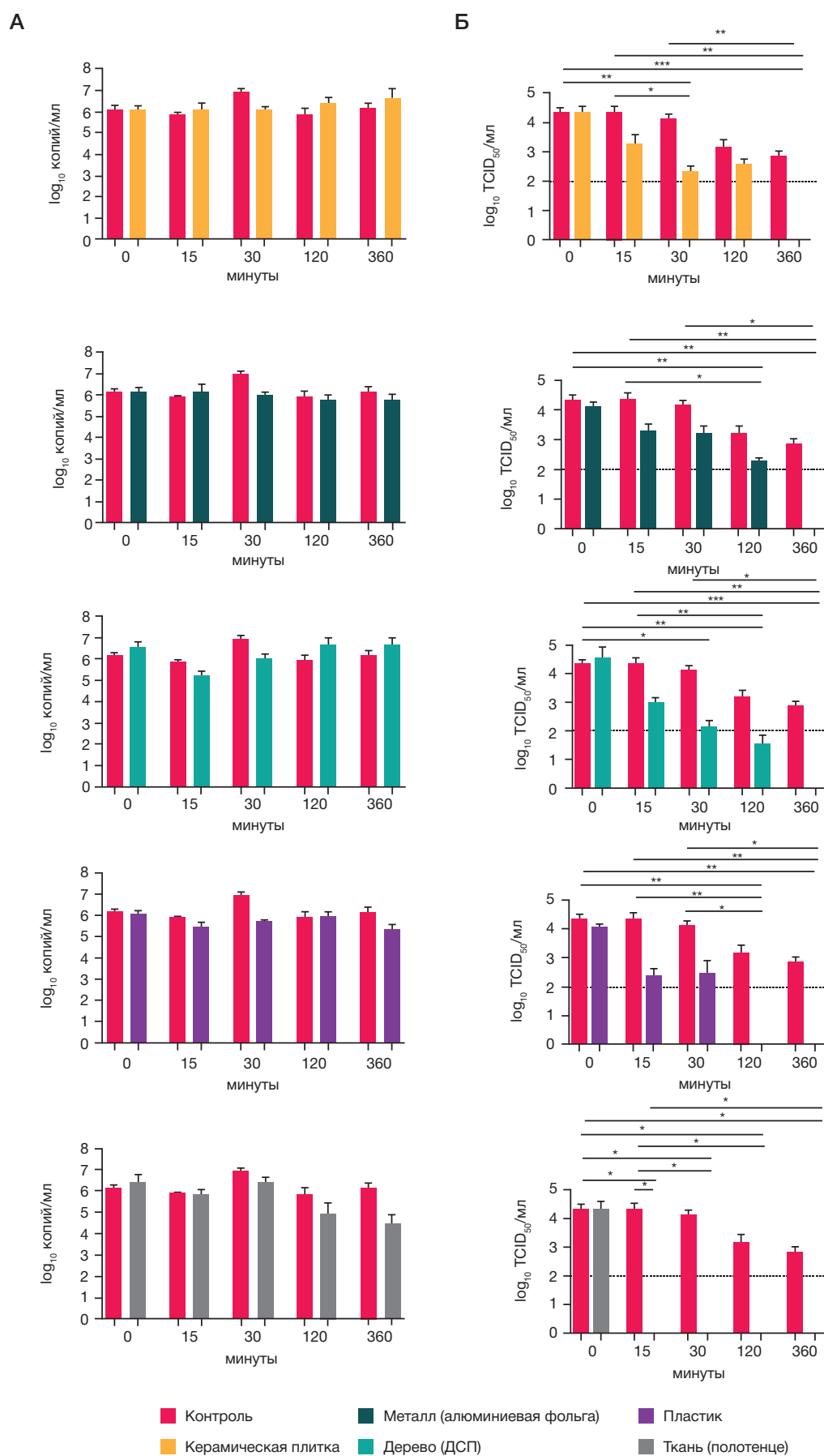


Рис. 1. Стабильность SARS-CoV-2 на модельных поверхностях в различных условиях. На перечисленные экспериментальные поверхности был нанесен SARS-CoV-2 (титр $0,4 \times 10^5$ TCID₅₀/мл) и инкубирован при комнатной температуре. В указанные временные точки вирус элюировали, резидуальный вирус детектировали с помощью (А) количественной ОТ-ПЦР, (Б) жизнеспособность вируса определяли титрованием на культуре клеток 293Т / ACE2

был более устойчивым на гладких поверхностях. Так, 39 неинфекционных образцов были позитивными, т. е. неинфекционные вирусы все еще могут быть обнаружены [7]. Целью работы было сравнить с помощью ОТ-ПЦР и культуры клеток жизнеспособность вируса на поверхностях, которые наиболее распространены вокруг нас и могут представлять риск с точки зрения передачи SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование сохранения жизнеспособности SARS-CoV-2 при контакте с пятью экспериментальными поверхностями проводили в контролируемых экспериментальных условиях при относительной влажности 55–60% и температуре 22–24 °С. Использовали наиболее распространенные материалы, включая керамическую плитку, металл (алюминиевая фольга), дерево (ДСП), пластик и ткань (полотенце). Для работы использовали штамм SARS-CoV-2 PMVL-3 (GISAID: EPI_ISL_470897), выделенный из назофарингиального мазка и размноженный в культуре клеток Vero E6 (ATCC CRL-1586). 15 мкл вирусосодержащей жидкости с титром $0,4 \times 10^5$ TCID₅₀/мл наносили на экспериментальные поверхности (площадью 1,5–2 см²) каждого материала в пяти повторах. Группы образцов и вирусных контролей инкубировали 0, 15 и 30 мин (влажные поверхности) или 120 и 360 мин (высушенные при комнатной температуре). После воздействия вируса его элюировали с экспериментальных поверхностей в объеме 200 мкл PBS. Наличие РНК вируса SARS-CoV-2 оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР. Жизнеспособный вирус определяли в культуре клеток 293T/ACE2, титр вируса рассчитывали по методу Риды–Менча. Данные обрабатывали в программе GraphPadPrism 7 и анализировали с помощью теста ANOVA, критерия Краскела–Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе экспериментов РНК SARS-CoV-2 была обнаружена на всех экспериментальных поверхностях. Значительное снижение РНК SARS-CoV-2 (на $0,5 \log_{10}$ копий/мл) было выявлено при контакте вируса с деревом (ДСП) в течение 15 мин, а также на $1 \log_{10}$ копий/мл РНК SARS-CoV-2 при контакте с металлом и пластиком через 15 и 30 мин соответственно. Однако во всех элюатах, полученных с экспериментальных материалов с экспозицией 120 и 360 мин, РНК SARS-CoV-2 детектировалась на высоком уровне (рис. 1А). Существенное снижение РНК SARS-CoV-2 до $1 \log_{10}$ копий/мл было отмечено в образцах ткани (полотенце) спустя 6 ч. В целом количество РНК SARS-CoV-2 было стабильно высоким на всех видах поверхностей и не отличалось от контроля (образцы, не контактировавшие с материалом). Определение инфекционности SARS-CoV-2 на клеточной линии 293T/ACE2 после контакта с модельными материалами показало резкое снижение жизнеспособности вируса через 120 мин (рис. 1Б). Титр

вируса постепенно снижается в зависимости от материала: керамическая плитка → металл → дерево (ДСП) → пластик → ткань (полотенце). После 120 мин экспозиции вируса на таких материалах, как пластик и ткань, жизнеспособный вирус не был обнаружен, хотя РНК SARS-CoV-2 все еще присутствовала. При оценке инфекционности вируса после контакта с модельными материалами было показано, что РНК SARS-CoV-2 выявляется на всех экспериментальных поверхностях, независимо от условий и времени. Даже через 360 мин количество вируса на поверхности, измеренное с помощью количественной ОТ-ПЦР, изменяется незначительно (в пределах порядка). Однако детекция РНК SARS-CoV-2 не указывает на наличие жизнеспособного вируса. Наиболее значительное снижение патогенности вируса было выявлено при контакте с образцами ткани (полотенце), а также пластика, более длительное сохранение инфекционного вируса наблюдали на таких поверхностях, как металл, дерево (ДСП) и керамическая плитка. Снижение инфекционности SARS-CoV-2 происходит через 120 мин после контакта с модельной поверхностью и полностью теряется в течение 360 мин, когда происходит высыхание. Можно предположить, что полная потеря жизнеспособности вируса будет происходить в течение 120–360 мин для всех материалов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа имеет ряд недостатков. Мы использовали культуральную жидкость для моделирования контаминации вирусом. Ее состав существенно отличается от среды, образующейся в результате естественного контакта человека с поверхностями. Кроме того, сам метод выделения жизнеспособного вируса с использованием культуры клеток может значительно отличаться по восприимчивости к инфекции [8, 9]. Отдельные штаммы вируса, персистирующего в организме конкретного человека, генетически разнородны и могут различаться по своей способности сохраняться на поверхности. Тем не менее принимая эти ограничения, результаты могут быть полезны при планировании дальнейших исследований и разработке практических рекомендаций.

ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в рамках этой работы, показывают, что положительные данные ОТ-ПЦР еще не позволяют говорить о жизнеспособности вируса. В течение как минимум 360 мин количество РНК SARS-CoV-2 на поверхности практически не меняется, при этом жизнеспособность вируса падает на несколько порядков за 120 мин, а через 360 мин он не детектируется ни на одной из экспериментальных поверхностей. Таким образом, в контексте экологической безопасности использование ОТ-ПЦР может привести к сильно искаженным выводам. Интерпретацию результатов ОТ-ПЦР в отношении потенциального загрязнения поверхности SARS-CoV-2 необходимо проводить с большой осторожностью.

Литература

1. Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 Virus by Droplets and Aerosols: A Critical Review on the Unresolved Dichotomy. *Environ Res.* 2020; 188: 109819.
2. 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 Engl J Med.* 2020; 382: 1564–7.
3. Fernández-Raga M, Díaz-Marugán L, García Escolano M, Bort C, Fanjul V. SARS-CoV-2 Viability under Different Meteorological Conditions, Surfaces, Fluids and Transmission between Animals. *Environ Res.* 2021; 192: 110293.
4. Xue X, Ball JK, Alexander C, Alexander MR. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2. *Matter.* 2020; 3: 1433–41.
5. Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China. 2020; *Emerg Infect Dis.* 2020; 26: 1343–5.
6. Xie C, Zhao H, Li K, Zhang Z, Lu X, Peng H, et al. The Evidence of Indirect Transmission of SARS-CoV-2 Reported in Guangzhou, China. *BMC Public Health.* 2020; 20: 1202.
7. Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. *Lancet Microbe.* 2020; 1: e10.
8. Yao H, Lu X, Chen Q, Xu K, Chen Y, Cheng M, et al. Patient-Derived SARS-CoV-2 Mutations Impact Viral Replication Dynamics and Infectivity in Vitro and with Clinical Implications in Vivo. *Cell Discov.* 2020; 6: 76.
9. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020; 371: m3862.

References

1. Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 Virus by Droplets and Aerosols: A Critical Review on the Unresolved Dichotomy. *Environ Res.* 2020; 188: 109819.
2. 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 Engl J Med.* 2020; 382: 1564–7.
3. Fernández-Raga M, Díaz-Marugán L, García Escolano M, Bort C, Fanjul V. SARS-CoV-2 Viability under Different Meteorological Conditions, Surfaces, Fluids and Transmission between Animals. *Environ Res.* 2021; 192: 110293.
4. Xue X, Ball JK, Alexander C, Alexander MR. All Surfaces Are Not Equal in Contact Transmission of SARS-CoV-2. *Matter.* 2020; 3: 1433–41.
5. Cai J, Sun W, Huang J, Gamber M, Wu J, He G. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China. 2020; *Emerg Infect Dis.* 2020; 26: 1343–5.
6. Xie C, Zhao H, Li K, Zhang Z, Lu X, Peng H, et al. The Evidence of Indirect Transmission of SARS-CoV-2 Reported in Guangzhou, China. *BMC Public Health.* 2020; 20: 1202.
7. Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen H-L, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. *Lancet Microbe.* 2020; 1: e10.
8. Yao H, Lu X, Chen Q, Xu K, Chen Y, Cheng M, et al. Patient-Derived SARS-CoV-2 Mutations Impact Viral Replication Dynamics and Infectivity in Vitro and with Clinical Implications in Vivo. *Cell Discov.* 2020; 6: 76.
9. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, Transmission, and Pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020; 371: m3862.

ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПЕРИТОНИТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Д. В. Плоткин^{1,2}✉, Т. И. Виноградова³, М. Н. Решетников¹, Б. М. Ариэль³, Ю. Р. Зюзя¹, В. Ю. Журавлев³, М. В. Сеницын¹, Е. М. Богородская¹, П. К. Яблонский³

¹ Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом, Москва, Россия

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

³ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Наблюдаемый в последние десятилетия рост числа случаев туберкулезного перитонита обусловлен лимфогематогенным распространением микобактерий туберкулеза (МБТ) из легких и других экстрапульмональных источников. До сих пор остается неясным, почему при генерализации туберкулезной инфекции в воспалительный процесс вовлекаются те или иные органы и анатомические области. Почему в одних случаях развивается туберкулез брюшины, а в других туберкулез почек? Целью работы было изучить патогенез туберкулезного перитонита с помощью создания воспроизводимой биологической модели. Туберкулезный перитонит моделировали на 18 кроликах (10 особей — экспериментальная группа, 8 — контрольная) путем внутрибрюшинной инокуляции взвеси МБТ. Кроликам экспериментальной группы перед заражением вводили ингибитор TNF — и железа (III) гидроксид сахарозный комплекс с целью подавления активности перитонеальных макрофагов и основных цитокинов; в контрольной группе введение иммуносупрессивных препаратов не производили. При аутопсии животных контрольной группы в 37,5% случаев выявлены изменения, характерные для туберкулеза легких, поражения других органов и систем не отмечено. Напротив, у кроликов экспериментальной группы в брюшной полости выявлены признаки туберкулезного перитонита. По результатам проведенной работы, анатомическая область, где развивается вторичный очаг внегочечной туберкулезной инфекции, во многом зависит от местной иммунной защиты. Так, для брюшины таким необходимым и достаточным условием развития туберкулезного перитонита являются уменьшение пула перитонеальных макрофагов и снижение цитокиновой продукции.

Ключевые слова: перитонит, животная модель, туберкулезный перитонит, абдоминальный туберкулез, TNF α , фактор некроза опухолей, кролик

Конфликт интересов: Д. В. Плоткин, Т. И. Виноградова, М. Н. Решетников, Ю. Р. Зюзя, М. В. Сеницын, Е. М. Богородская, П. К. Яблонский — подали заявку в Федеральную службу по интеллектуальной собственности «Федеральный институт промышленной собственности» на регистрацию заявления о выдаче патента Российской Федерации на изобретение «Способ моделирования туберкулезного перитонита» (регистрационный № 2021114954 от 25 мая 2021 г.). Б. М. Ариэль, В. Ю. Журавлев — заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Вклад авторов: Д. В. Плоткин, Т. И. Виноградова, М. В. Сеницын, Е. М. Богородская — разработка концепции и дизайна исследования; Д. В. Плоткин, М. Н. Решетников, В. Ю. Журавлев, Ю. Р. Зюзя — сбор материала; М. Н. Решетников, В. Ю. Журавлев — статистическая обработка; Д. В. Плоткин, Т. И. Виноградова, Б. М. Ариэль, П. К. Яблонский — анализ полученных данных; Д. В. Плоткин, Б. М. Ариэль, М. В. Сеницын, Е. М. Богородская — подготовка текста; Т. И. Виноградова, Ю. Р. Зюзя, П. К. Яблонский — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (протокол № 73 от 23 декабря 2020 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS No. 170), а также руководствуясь «Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами» (ГОСТ 33216-2014).

✉ Для корреспонденции: Дмитрий Владимирович Плоткин
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; kn13@list.ru

Статья получена: 30.06.2021 Статья принята к печати: 21.07.2021 Опубликована онлайн: 04.07.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.036

FEATURES OF THE PATHOGENETIC MECHANISMS OF TUBERCULOUS PERITONITIS IN AN EXPERIMENT

Plotkin DV^{1,2}✉, Vinogradova TI³, Reshetnikov MN¹, Ariel BM³, Zyuzya YuR¹, Zhuravlev VYu³, Sinitsyn MV¹, Bogorodskaya EM¹, Yablonsky PK³

¹ Moscow Research and Clinical Center for TB Control, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint Petersburg, Russia

The prevalence of tuberculous peritonitis that has been observed in the recent decades is the result of lymphohematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) from lungs and other extrapulmonary sources. It is still unclear why certain organs and anatomical regions get involved in the inflammatory process during generalization of the tuberculosis infection. Why do some cases develop into peritoneal tuberculosis and other into kidney tuberculosis? Thus study aimed to investigate the pathogenesis of tuberculous peritonitis in a reproducible biological model. Tuberculous peritonitis was modeled in 18 rabbits (10 in the test group, 8 in control) by intraperitoneal inoculation of the MBT suspension. In order to suppress peritoneal macrophages and major cytokines, test group rabbits were injected with the TNF α inhibitor and iron (III) hydroxide sucrose complex before being infected, while control group rabbits received no immunosuppressive drugs. Autopsy of the control group animals revealed changes characteristic of pulmonary tuberculosis in 37.5% of cases, with no damage to other organs and systems registered. Conversely, test group rabbits had the signs of tuberculous peritonitis in their abdominal cavities. The results of this study suggest that it is the local immunity of an anatomical area that largely determines whether a secondary focus of extrapulmonary tuberculosis infection will develop there or not. For the peritoneum, a smaller pool of peritoneal macrophages and weaker cytokine production is a necessary and sufficient condition to have tuberculous peritonitis developing therein.

Keywords: peritonitis, animal model, tuberculous peritonitis, abdominal tuberculosis, TNF α , tumor necrosis factor, rabbit

Conflict of interests: Plotkin DV, Vinogradova TI, Reshetnikov MN, Zyuzya YuR, Sinitsyn MV, Bogorodskaya EM, Yablonsky PK have filed a request to the Federal intellectual property service "Federal Institute for Industrial Property" to register the Russian Federation patent for the invented "Method for modeling tuberculous peritonitis" (registration #2021114954 of May 25, 2021). Ariel BM, Zhuravlev VYu claim to have no conflict of interest.

Author contributions: Plotkin DV, Vinogradova TI, Sinitsyn MV, Bogorodskaya EM — study concept and design development; Plotkin DV, Reshetnikov MN, Zhuravlev VYu, Zyuzya YuR — material collection; Reshetnikov MN, Zhuravlev VYu — statistical processing; Plotkin DV, Vinogradova TI, Ariel BM, Yablonsky PK — analysis of the data obtained; Plotkin DV, Ariel BM, Sinitsyn MV, Bogorodskaya EM — text preparation; Vinogradova TI, Zyuzya YuR, Yablonsky PK — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Saint Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology (protocol № 73 of December 23, 2020). All manipulations with animals conformed to the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS # 170) and followed guidelines provided in GOST 33216-2014 Rules for Working with Laboratory Rodents and Rabbits.

✉ Correspondence should be addressed: Dmitry Vladimirovich Plotkin
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; kn13@list.ru

Received: 30.06.2021 Accepted: 21.07.2021 Published online: 04.07.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.036

В настоящее время считается, что четверть населения мира инфицирована туберкулезом; ежегодно регистрируется более 10 млн новых случаев болезни и 1,2 млн смертей от туберкулеза. По данным Всемирной организации здравоохранения, 15–20% наблюдений туберкулеза приходится на его внелегочные формы, а туберкулезный перитонит (ТП) прочно занимает среди них шестое место [1, 2].

Представления о патогенезе внелегочного туберкулеза сформировались в 30–60-х гг. прошлого века на основе клинических наблюдений, экспериментальных работ и результатов аутопсий. ТП рассматривали в рамках полисерозита с одновременным вовлечением в специфический процесс брюшины, перикарда, плевры и синовиальных оболочек крупных суставов [3, 4], что являлось типичным проявлением прогрессирующего первичного туберкулеза.

Наблюдаемый в последние десятилетия ТП у подавляющего большинства пациентов развивается в поздние сроки туберкулезной инфекции; его патогенез изучен недостаточно и, вероятно, обусловлен лимфогематогенным распространением микобактерий туберкулеза (МБТ) из легких, внутрибрюшных лимфатических узлов, кишечника, маточных труб [5, 6]. До сих пор остается неясным, почему в таких случаях генерализация инфекции вовлекает в воспалительный процесс те или иные органы и каковы условия, благоприятствующие развитию патологических изменений именно в данной анатомической области.

Основными из таких условий до недавнего времени считали микроциркуляторные расстройства, когда первоначальные очаговые поражения органов возникали лишь при определенной функциональной перестройке микроциркуляторного русла: большой объем последнего, замедленный кровоток, тесный контакт с тканями (полужамкнутый характер системы микроциркуляции, наличие пор и фенестр в стенках капилляров) [7].

Известно, что у каждой формы внелегочного туберкулеза имеется свой *locus minoris resistentiae*, где в строго закономерной последовательности развиваются первоначальные очаговые поражения. Так, в брюшной полости это илеоцекальная зона, где минимизации кровотока способствуют замедленный кишечный пассаж (илеостаз) и относительно большая масса лимфоидной ткани в мезентериальных лимфатических узлах и пейеровых бляшках, которые «заболачиваются» при низкой скорости кровотока [3, 8].

Нарушения микроциркуляторного русла не могут не играть существенную роль в развитии ТП, хотя, безусловно, и не исчерпывают его патогенез до самого конца. Как и во всяком ином патологическом процессе, определенная роль здесь принадлежит малоизученным иммунным защитным механизмам. Применительно к ТП речь идет о защитной роли брюшины, с которой взаимодействуют МБТ, а также о местном иммунитете [9].

Эти недостаточно исследованные механизмы могут быть изучены в экспериментальных условиях на моделях, воспроизводящих ТП человека во всех его характерных особенностях. Есть основание полагать, что при таком подходе удастся понять, каким образом и в какой мере повреждение брюшины и защитные реакции в ней интегрируются и уравниваются в системе целостного организма.

При использовании поисковой системы PubMed нам не удалось выявить в текущей литературе публикаций, касающихся способов моделирования ТП. При более глубоком поиске в работах XIX и первой половины XX

веков [10, 11] были найдены немногочисленные описания неудачных попыток внутрибрюшинного заражения лабораторных животных культурой МБТ с целью экспериментального воспроизведения ТП.

Целью работы было изучение патогенеза туберкулезного перитонита с помощью создания воспроизводимой биологической модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 18 кроликах-самцах породы «Советская шиншилла» массой 2,60–3,25 кг, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» («Курчатовский институт»; Россия). Использовали животных без внешних признаков заболевания, прошедших двухнедельный карантинный режим в условиях сертифицированного вивария Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии. Животных содержали в одинаковых условиях на стандартном пищевом режиме при доступе к воде *ad libitum*.

Все кролики были разделены на две группы: экспериментальную и контрольную, в каждую из которых входили животные одного возраста, полученные из питомника одновременно.

ТП моделировали по оригинальной, разработанной нами методике путем интраперитонеальной инокуляции 6 мл суспензии стандартизованного вирулентного тест-штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv, содержащей 10⁶ микобактериальных клеток. Использовали суспензии МБТ в физиологическом растворе или в геле гидроокиси алюминия для заражения соответственно контрольных и экспериментальных групп животных. Культивирование тест-штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ТБС # 1/47, Институт гигиены и эпидемиологии; Прага, 1976) из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения проводили на среде Левенштейна–Йенсена (Becton, Dickinson and Company; США). Подготовку микобактериальной суспензии трехнедельного (вторая генерация) тест-штамма *M. tuberculosis* H₃₇Rv выполняли *ex tempore* в день заражения животных.

Внутрибрюшинное заражение осуществляли в условиях иммунодефицита. Для этого, с одной стороны, снижали концентрацию фактора некроза опухолей TNFα (основного цитокина, регулятора образования и устойчивости гранулем) путем внутривенного введения ингибитора TNFα инфликсимаба (химерного мышино-человеческого моноклонального антитела) («БИОКАД»; Россия). С другой стороны, подавляли фагоцитарную активность агранулоцитов брюшины (перитонеальных макрофагов) путем внутрибрюшинного введения железа (III) гидроксида сахарозного комплекса (Ferric (III) hydroxide saccharose complex) («ФАРМАСИНТЕЗ»; Россия). Этот препарат выбран как донатор трехвалентного железа для создания эффекта «перегрузки железом» иммунокомпетентных клеток, которые поглощают избыточное нетрансферриновое железо [12, 13].

В экспериментальную группу вошли 10 кроликов, которым за сутки до внутрибрюшинного заражения культурой МБТ вводили однократно в краевую ушную вену инфликсимаб из расчета 16 мг/кг [14], а за 1 ч до заражения — внутрибрюшинно 5 мл раствора железа (III) гидроксида сахарозного комплекса.

Восемь кроликов контрольной группы были заражены аналогичным образом, однако ингибитор TNFα и железосахарозный комплекс они уже не получали.

После заражения осуществляли мониторинг массы тела животных (взвешивали один раз в 10 дней), наблюдали за их поведением, выполняли постановку внутрибрюшных проб с антигеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) для подтверждения развития туберкулезной инфекции. Выведение животных из эксперимента проводили на 45-е сутки от момента заражения с помощью передозировки средств для наркоза: тиопентала натрия 250 мг и пипекурония бромида 1 мг внутривенно.

При проведении аутопсии оценивали наличие выпота в серозных полостях и бугорковых образований на серозных покровах печени, селезенки, кишечника и легких, а также форму и величину внутригрудных и внутрибрюшных лимфатических узлов, размеры и структуру почек. Забирали материал для микроскопического исследования париетальной брюшины, печени, почек, селезенки, легких, сердца и лимфатических узлов. Весь материал заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также специальными методами по Ван Гизону (для идентификации коллагеновых волокон) и по Перлсу (качественная реакция на трехвалентное железо). Кроме того, проводили бактериоскопическое исследование после окраски срезов по Цилю–Нельсену для обнаружения МБТ. Дополнительно выполняли молекулярно-генетическое тестирование тканей брюшины и сальника методом ПЦР для детекции ДНК МБТ с использованием набора реагентов «Амплитуб-РВ» («Синтол»; Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе динамического наблюдения за животными после их внутрибрюшинного заражения суспензией МБТ потери веса не отмечено; напротив, все кролики прибавляли в весе в среднем на $132 \pm 42,6$ г за весь период эксперимента. Проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) на 20–22-е сутки после заражения была гиперергической у всех 18 кроликов.

При аутопсии и гистологическом исследовании материала обнаружены существенные и значимые различия между кроликами экспериментальной и контрольной групп.

В контрольной группе на 45-е сутки с момента внутрибрюшинного заражения серозный покров брюшной

полости оставался интактным как на макро-, так и на микроскопическом уровне; специфические изменения не были выявлены ни в паренхиматозных органах брюшной полости, ни в почках. ДНК МБТ методом ПЦР в брюшине и сальнике не обнаружена.

Вместе с тем, у трех животных (37,5%) имелись четкие признаки туберкулезного воспаления легких. При микроскопии в легочной ткани были обнаружены нечеткие, сливавшиеся друг с другом макрофагальные гранулемы с небольшими участками некроза и слабо выраженной лейкоцитарной инфильтрацией по периферии, изредка — более крупные очаги казеозного некроза, инфильтрированные распадавшимися лейкоцитами. В прилегающей легочной ткани были обнаружены дистелектазы с преобладанием ателектазов, очаговая экссудативная реакция, явления продуктивного васкулита (рис. 1А, В). В таких участках плевра была утолщена за счет отека и мононуклеарной инфильтрации. При окраске по Ван Гизону инкапсуляции очагов казеозного некроза не найдено, признаков организации в участках туберкулезного воспаления не зафиксировано. При окраске по Цилю–Нельсену были выявлены микроколонии МБТ в очагах некроза (рис. 1Б).

Стоит отметить слабо выраженные реактивные изменения в отдельных лимфатических узлах брюшной полости и средостения без признаков специфического туберкулезного лимфаденита. При микроскопическом исследовании была обнаружена очаговая неспецифическая инфильтрация брюшины, где при бактериоскопии МБТ не определялись. Их отсутствие в таких участках брюшинного покрова было подтверждено и при ПЦР-диагностике.

В экспериментальной группе у всех животных на первой неделе после заражения были выявлены клинические симптомы интоксикации: гиподинамия, отсутствие аппетита и снижение массы тела на 75–110 г (в среднем 84 г). В последующие 35 дней отмечена положительная динамика с восстановлением обычной двигательной активности, увеличением массы тела и нормализацией аппетита.

На аутопсии через 45 суток после заражения у всех животных из экспериментальной группы отмечены характерные макроскопические признаки ТП: желтоватый серозный выпот в брюшной полости, не превышавший по объему 5 мл, плотные и рыхлые спайки

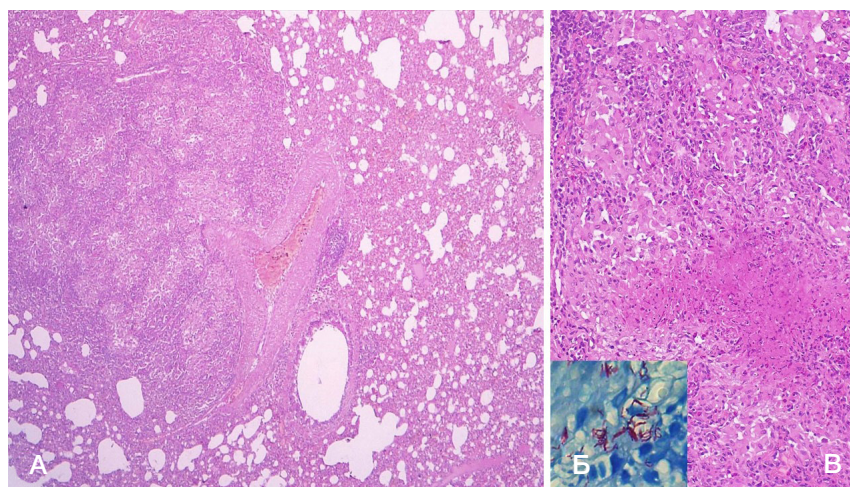


Рис. 1. Очаги туберкулезного поражения в легком кролика. **А.** Участок туберкулезного гранулематозного воспаления в легком с дистелектазами (микрпрепарат, окраска гематоксилином и эозином; $\times 40$). **Б.** Кислотоустойчивые микобактерии в очаге туберкулезного воспаления (микрпрепарат, окраска по Цилю–Нельсену; $\times 1000$). **В.** В легком очаг казеозного некроза с лейкоцитарной инфильтрацией и перифокально расположенными макрофагально-эпителиоидными гранулемами (микрпрепарат, окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$)

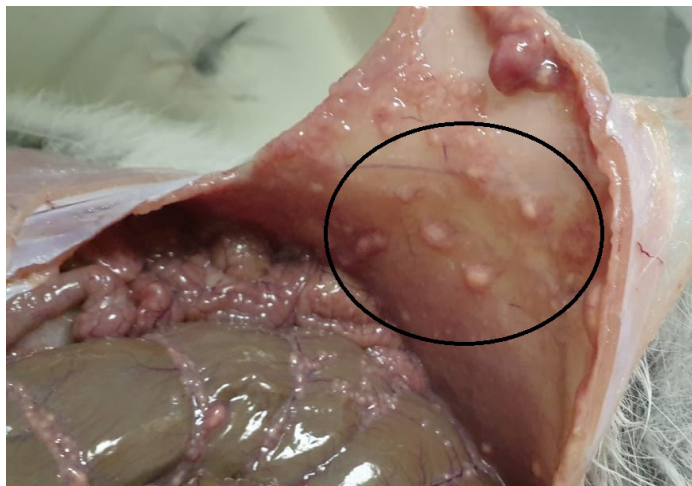


Рис. 2. На париетальной брюшине кролика множественные туберкулезные бугорки — диссемины (обведены круглой рамкой) (макропрепарат)

разной степени зрелости между петлями тонкой кишки, большим сальником и передней брюшной стенкой, множественные мелкие и крупные бугорки размерами 2–6 мм на париетальной и висцеральной брюшине (рис. 2). При гистологическом исследовании спаек и фрагментов серозного покрова были выявлены макрофагальные гранулемы с единичными гигантскими многоядерными клетками Лангханса, а также обширные очаги казеозного некроза с перифокальным скоплением сливающихся друг с другом макрофагальных гранул (рис. 3А, Б). Подобные изменения имелись также в брыжейке тонкой кишки и в большом сальнике.

У 9 из 10 (90%) экспериментальных животных был выявлен активный туберкулез легких в виде очагов казеозного некроза с небольшими скоплениями лимфоцитов по периферии и образованием специфических грануляций. При окраске по Ван Гизону признаков организации в очагах туберкулезного воспаления в легких не найдено. При окраске по Цилю–Нельсену в казеозных массах обнаружены микроколонии МБТ.

При окраске по Перлсу выявлены множественные скопления макрофагов с большим содержанием железа в цитоплазме, как в тканях брюшины, так и в тканях легких (рис. 3В, Г). В одном случае был обнаружен туберкулезный сплениит (10%), в другом — туберкулезный гепатит (10%). В

лимфатических узлах брыжейки тонкой кишки выявлены как специфические изменения, так и неспецифическая реактивная гиперплазия лимфоцитов. Наряду с этим у всех кроликов определялись дистрофические изменения в эпителии извитых канальцев почек, в печени и в миокарде, которые сопровождались выраженным полнокровием и отеком стромы органов.

Изменения со стороны серозной оболочки кишечника были двоякого рода: в одних случаях выявлялся продуктивный туберкулезный перитонит без признаков организации, а в других — неспецифическое реактивное воспаление. В серозной оболочке желудка специфические воспалительные изменения не выявлены. При детекции ДНК МБТ в тканях большого сальника во всех 10 случаях получены положительные результаты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выбор кролика (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) как лабораторного животного при разработке экспериментальной модели ТП далеко не случаен. По словам Клода Бернара, удачный выбор животного часто достаточен, для того чтобы разрешить самые сложные общие вопросы.

Было показано, что у кроликов, считающихся резистентными к инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, в

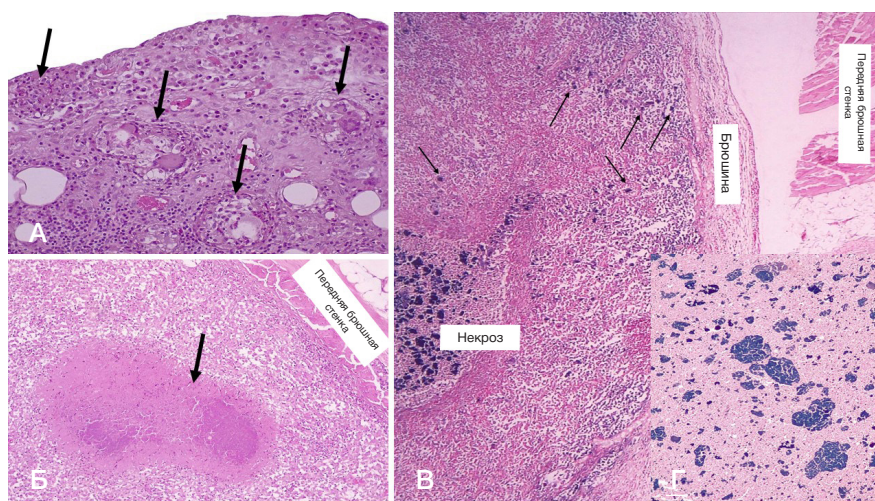


Рис. 3. Туберкулезный перитонит у кроликов (микропрепарат). **А.** Туберкулезный гранулематозный перитонит (гранулемы показаны стрелками) (окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$). **Б.** Казеозный перитонит (очаг казеозного некроза показан стрелкой) (окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$). **В.** Скопления железосодержащего пигмента в некротических массах и в прилежащих макрофагах (железосодержащий пигмент окрашен в сине-зеленый цвет, отдельные из макрофагов с пигментом показаны стрелками) (реакция Перлса; $\times 100$). **Г.** Фрагмент рис. В (реакция Перлса; $\times 200$)

определенных условиях заражения этим возбудителем закономерно развивается специфическое хронически прогрессирующее гранулематозное воспаление или латентная туберкулезная инфекция в зависимости от вирулентности МБТ [15–17]. В морфологическом дискурсе речь идет об эволюции гранулем — их формировании, созревании и распаде, аналогично тому, как это происходит у человека. Эксперименты с кроликом как с достаточно крупным лабораторным животным позволяют провести надежный мониторинг патофизиологических изменений с самого начала инфекционного процесса и вплоть до его завершения, даже не прибегая к эвтаназии [18].

Согласно нашим наблюдениям, при внутрибрюшинном заражении МБТ у кроликов с интактным иммунным статусом развивается не ТП, а туберкулезное воспаление легких и лимфатических узлов средостения. Заболевает лишь половина зараженных животных, причем изменения в легких и лимфоузлах носят у них переходящий характер и спустя 1,5 месяца после заражения сходят на нет. Наряду с исчезновением воспалительных изменений в этих органах исчезают и МБТ. Отсутствие воспалительных изменений в брюшной полости является следствием того, что серозная оболочка фигурирует в патологическом процессе как механический барьер, роль которого играет, к примеру, большой сальник, самостоятельно ограничивающий воспалительные очаги в брюшной полости, и как орган гуморальной и клеточной защиты *sui generis*.

В настоящее время общепризнано, что инвазии микроорганизмов в брюшной полости противостоят три клеточные системы: лимфоциты, мезотелиоциты и перитонеальные макрофаги, обеспечивающие первую линию защиты через фагоцитарную активность и выработку воспалительных цитокинов [19]. Защитную роль играет и секреторная функция мезотелия, наблюдаемая в нормальных и патологических условиях [20], благодаря которой МБТ высвобождаются в свободную брюшную полость, где погибают в экссудате, содержащем комплемент, свободные антитела, перитонеальные макрофаги и нейтрофильные лейкоциты, которые в совокупности обеспечивают его бактериостатические и бактерицидные свойства. Иными словами, мы рассматриваем брюшину не как морфологически сложившееся статически постоянное образование, а в качестве органа гуморального и клеточного иммунитета [21].

Очевидно, что физиологическая активность перитонеальных макрофагов играет далеко не последнюю роль в реализации защитных свойств брюшины, так как в условиях ее подавления инфликсимабом (ингибитором $\text{TNF}\alpha$) и «перегрузки железом» нам удалось воспроизвести хронически прогрессирующий ТП с формированием альтеративных и гранулематозных изменений на фоне размножения МБТ. Говоря о значении защитных реакций в патогенезе ТП, мы имеем в виду не только фагоцитоз возбудителей макрофагами, но и дальнейшую судьбу тех и других. В цитоплазме макрофагов МБТ частично или полностью погибают, сами же пораженные клетки удаляются в процессе физиологического очищения: из брюшины в результате секреции в свободную брюшную полость, а из легких — клиренсом.

Таким образом, для развития ТП, помимо наличия этиологического фактора в брюшной полости, необходима инактивация перитонеальных макрофагов и регулирующих цитокинов, главным из которых является $\text{TNF}\alpha$. Последний важен для защиты от туберкулеза и у людей. Он выполняет множество иммунорегуляторных функций,



Рис. 4. Схема патогенеза туберкулезного перитонита

включая раннюю индукцию хемокинов, приводящую к привлечению лейкоцитов, а также принимает участие в морфогенезе гранулем, которые являются обязательной морфологической структурой любого микобактериального заболевания у человека [22, 23].

Генетические исследования показали, что значительно влияют на восприимчивость (соответственно устойчивость) к туберкулезу toll-подобные рецепторы, например такие, как TLR-2. Варианты их полиморфизма изучали в основном при легочном туберкулезе, однако обнаружена существенная связь между полиморфизмом TLR-2 Arg753Gln и частотой развития ТП. Это свидетельствует о том, что лица с генетическим полиморфизмом части Arg753Gln TLR-2 находятся в зоне повышенного риска возникновения ТП [24].

Наше экспериментальное моделирование ТП позволило выявить ряд важных особенностей его патогенеза.

1. При использовании ингибитора $\text{TNF}\alpha$ и сахарозного комплекса гидроксида железа (III) у всех животных закономерно развивается распространенное активно прогрессирующее туберкулезное воспаление брюшины с преобладанием гранулематозно-некротических изменений, местами переходящих в казеоз. О его массивном характере можно судить по тому, что помимо париетальной брюшины и большого сальника туберкулезное воспаление охватывает висцеральную брюшину брыжейки и петель кишечника.

2. При описанном способе моделирования ТП развивается также деструктивный туберкулез легких с лимфаденопатией внутригрудных и внутрибрюшных лимфатических узлов, в которых обнаруживаются

специфические гранулематозные и неспецифические гиперпластические изменения.

3. Другие органые поражения гематогенного генеза (печени, селезенки, почек) встречаются при данном способе моделирования ТП лишь в единичных случаях как свидетельство гематогенной генерализации инфекции.

На нашей экспериментальной модели ТП надежно воспроизведены клинко-морфологические и патогенетические особенности туберкулезного поражения брюшины у человека. Их можно наблюдать при гематогенной диссеминации легочного туберкулеза, развивающегося на том или ином коморбидном фоне, когда имеется нарушение местного иммунитета брюшины и/или развивается общая иммуносупрессия.

По данным литературы и собственных клинических наблюдений, туберкулез брюшины развивается при беременности, у больных сахарным диабетом, при циррозе печени, болезнях сердца и сосудов, сопровождающихся асцитом, при перитонеальном диализе, при врожденных и приобретенных иммунодефицитах.

Беременность всегда сопровождается иммуносупрессией, связанная со сложной системой иммунологического взаимодействия матери и плода. Прогестерон и кортизол, уровни которых повышаются при беременности, подавляют Т- и В-клеточный иммунитет, и после разрешения беременности, ко 2–3 месяцу после родов наступает истощение пула агранулоцитов [25]. Оно затрагивает количество и активность перитонеальных макрофагов, на что указывает частота развития ТП в первые месяцы после рождения ребенка.

У больных сахарным диабетом, как в фазе декомпенсации углеводного обмена, так и при достижении компенсации отмечается достоверное повышение спонтанной и снижение индуцированной продукции IL1 и TNF α мононуклеарами периферической крови по сравнению со здоровыми лицами [26], что приводит к нарушению морфогенеза гранул и снижает их устойчивость. Это объясняет случаи выявления ТП у таких больных.

Длительно существующий асцит при вышеперечисленной патологии, а также при канцероматозе приводит к хроническому асептическому воспалению брюшины, при исходе которого значительно уменьшается численность макрофагов, в том числе перитонеальных, и снижается локальная концентрация TNF α [27].

Напрямую связан с развитием туберкулеза брюшины и хронический перитонеальный диализ. Диализные растворы содержат повышенную концентрацию глюкозы и имеют нефизиологичное значение pH, что влечет за собой нарушение функциональной активности фагоцитов и лимфоцитов в брюшине [28].

Иммунодефицитные состояния, как врожденные, так и приобретенные, в том числе после применения иммуномодулирующих препаратов (ингибиторы TNF α) и глюкокортикостероидов, влекут за собой снижение числа агранулоцитов и синтеза TNF α . Низкие концентрации TNF α и инактивация макрофагов в брюшине напрямую

способствуют развитию ТП. И, конечно, пусковым звеном в патогенезе туберкулеза брюшины может стать ВИЧ-инфекция с характерной для нее иммуносупрессией [29, 30].

Анализируя результаты нашего эксперимента и принимая во внимание клинические наблюдения и данные литературы, можно предложить следующую схему патогенеза ТП у человека. Стрессорные воздействия, такие как недоедание, беременность, внезапная смена социального статуса, иммуносупрессивные заболевания и др., приводят к реактивации первичного туберкулезного очага с деструкцией ранее образованных гранул и лимфогематогенным распространением МБТ [31]. Анатомическая область, где развивается вторичный очаг внелегочной туберкулезной инфекции, напрямую зависит не только от особенностей микроциркуляции в данном регионе, но и от местной иммунной защиты (местного иммунитета по А. М. Безредка). Так, для брюшины таким необходимым и достаточным условием развития вторичного очага является уменьшение численности пула перитонеальных макрофагов и снижение цитокиновой продукции. Схема патогенеза ТП представлена на рис. 4.

ВЫВОДЫ

Клинические проявления, методы выявления, диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания хорошо изучены и полноценно освещены в научно-медицинской литературе. Туберкулез в основном поражает легочную паренхиму, в то же время при определенных условиях, связанных с изменениями местного и гуморального иммунитета, процесс может локализоваться практически во всех органах и тканях человека. Предметом описания оказывается, как правило, активно прогрессирующий туберкулез легких, в то время как внелегочным проявлениям инфекции с тяжелыми деструктивными изменениями уделяется существенно меньше внимания. Последние десятилетия около 15% случаев выявленного туберкулеза во всем мире являются внелегочными. Их клиническая диагностика чревата объективными трудностями, поскольку при внелегочном туберкулезе результаты золотого стандарта диагностики — выявления МБТ в мокроте часто оказываются отрицательными. И самым парадоксальным образом наличие *M. tuberculosis* во внелегочных очагах зачастую вызывает широкий спектр неспецифических симптомов, тем самым создавая дополнительные трудности диагностики. Одной из таких сложных для диагностики и лечения внелегочных форм туберкулеза является ТП. В проведенной работе экспериментально показана роль перитонеальных макрофагов в формировании местного протективного иммунитета, а также TNF α в обеспечении гуморального звена защитных процессов. Полученные данные позволяют улучшить понимание особенностей современного патогенеза туберкулезного перитонита, разработать диагностические критерии и лечебную, в том числе хирургическую тактику ведения таких пациентов.

Литература

- Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Is Mycobacterium tuberculosis infection life long? BMJ. 2019; 367: l5770. PubMed PMID: 31649096. DOI: 10.1136/bmj.l5770.
- WHO. Global Tuberculosis Report 2020. World Health

Organization, Geneva, 2020. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en.

- Мирзоян Э. З. Туберкулез кишечника и брюшины. В книге: В. Л. Эйнис, редактор. Многоотомное руководство по

- туберкулезу. Т. 3. М.: Медгиз, 1960; с. 125–146.
4. Оносовский В. В. О лечении туберкулезного перитонита у детей, по материалам Ольгинской детской больницы в Москве за 36 лет. Проблемы туберкулеза. 1923; 5–6 (1): 148–155.
 5. Савоненкова Л. Н., Арямкина О. Л. Патогенез и морфогенез абдоминального туберкулеза с поражением гастроинтестинального тракта. Нижегородский медицинский журнал. 2006; 2: 89–94.
 6. Dülger AC, Karadaş S, Mete R, Türkdoğan MK, Demirkıran D, Gültepe B. Analysis of cases with tuberculous peritonitis: a single-center experience. *Turk J Gastroenterol*. 2014; 25 (1): 72–8. PubMed PMID: 24918135. DOI: 10.5152/tjg.2014.5145.
 7. Беллендир Э. Н. Патогенез внелегочных локализаций туберкулеза. В книге: А. В. Васильев, редактор. Внелегочный туберкулез. СПб., 2000; с. 36–48.
 8. Singh MM, Bhargava AN, Jain KP. Tuberculous peritonitis. An evaluation of pathogenetic mechanisms, diagnostic procedures and therapeutic measures. *N Engl J Med*. 1969; 281 (20): 1091–4. PubMed PMID: 5824174. DOI: 10.1056/NEJM196911132812003.
 9. Безредка А. М. Очерки по иммунитету. М.–Л., 1929; 267 с.
 10. Кишенский Д. Н. Влияние чревосечения на туберкулез брюшины. Экспериментальное исследование [диссертация]. М.: Товарищество типографии А. И. Мамонова, 1894; 82 с.
 11. Lurie MB. The fate of tubercle bacilli in the organs of reinfected rabbits. *J Exp Med*. 1929; 50 (6): 747–765. PubMed PMID: 19869661. DOI: 10.1084/jem.50.6.747.
 12. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002; 168 (9): 4620–7. PubMed PMID: 11971010. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4620.
 13. Brissot E, Bernard DG, Loréal O, Brissot P, Troadec MB. Too much iron: A masked foe for leukemias. *Blood Rev*. 2020; 39: 100617. PubMed PMID: 31753415. DOI: 10.1016/j.blre.2019.100617.
 14. Шекунова Е. В., Ковалева М. А., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020; 10 (1): 19–28. DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28.
 15. Земскова Р. С., Ариэль Б. М., Бабаева И. Ю., Ерохин В. В., Зюзя Ю. Р., Лепеха Л. Н. Туберкулез (вклад отечественных ученых XX столетия в развитие фтизиатрии). М.: Изд-во Сеченовского университета, 2020; 352 с.
 16. Шепелькова Г. С., Евстифеев В. В., Апт А. С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза на экспериментальных моделях. Туберкулез и болезни легких. 2012; 89 (7): 3–11.
 17. Singhal A, Aliouat el M, Hervé M, Mathys V, Kiass M, Creusy C. et al. Experimental tuberculosis in the Wistar rat: a model for protective immunity and control of infection. *PLoS One*. 2011; 6 (4): e18632. PubMed PMID: 21533270. DOI: 10.1371/journal.pone.0018632.
 18. Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*. 1996; 379 (6563): 333–5. PubMed PMID: 8552186. DOI: 10.1038/379333a0.
 19. Буянов В. М., Родоман Г. В., Белоус Г. Г. Экспериментальная модель острого гнойного перитонита. Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 1997; 1: 25–28.
 20. Knutsen KM, Skuterud B, Halvorsen S. Hemoperfusion ved forgiftninger [Hemoperfusion in poisoning]. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 1979; 99 (3): 172–4. PubMed PMID: 419497.
 21. Dobbie JW. Serositis: comparative analysis of histological findings and pathogenetic mechanisms in nonbacterial serosal inflammation. *Perit Dial Int*. 1993; 13 (4): 256–69. PubMed PMID: 8241326.
 22. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001; 69 (3): 1847–55. PubMed PMID: 11179363. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1847-1855.2001.
 23. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002; 168 (9): 4620–7. PubMed PMID: 11971010. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4620.
 24. Saleh MA, Ramadan MM, Arram EO. Toll-like receptor-2 Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms and susceptibility to pulmonary and peritoneal tuberculosis. *APMIS*. 2017; 125 (6): 558–64. PubMed PMID: 28332241. DOI: 10.1111/apm.12680.
 25. Алешкин В. А., Ложкина А. Н., Загородняя Э. Д. Иммунология репродукции. Чита, 2004; 79 с.
 26. Крекова Ю. В. Изменение функционального состояния иммунной системы у больных различными типами сахарного диабета [диссертация]. 2002; 122 с.
 27. Шаталин Ю. В., Наумов А. А., Поцелуева М. М. Изменение состава клеточных популяций и уровня активных форм кислорода в крови и асцитической жидкости опухоленосителя. Цитология. 2010; 52 (2): 131–35.
 28. Rohit A, Abraham G. Peritoneal dialysis related peritonitis due to *Mycobacterium* spp.: A case report and review of literature. *J Epidemiol Glob Health*. 2016; 6 (4): 243–8. PubMed PMID: 27443487. DOI: 10.1016/j.jegh.2016.06.005.
 29. Pornprasert S, Leechanachai P, Klinbuayaem V, Leenasirimakul P, Promping C, Inta P, et al. Unmasking tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1 infection after antiretroviral therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2010; 28 (2–3): 206–9. PubMed PMID: 21038792.
 30. Roth S, Delmont E, Heudier P, Kaphan R, Cua E, Castela J, et al. Anticorps anti-TNF alpha (infliximab) et tuberculose: à propos de trois cas [Anti-TNF alpha monoclonal antibodies (infliximab) and tuberculosis: apropos of 3 cases]. *Rev Med Interne*. 2002; 23 (3): 312–6. PubMed PMID: 11928379. DOI: 10.1016/s0248-8663(01)00556-2.
 31. Moule MG, Cirillo JD. *Mycobacterium tuberculosis* Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 65. PubMed PMID: 32161724. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00065.

References

1. Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Is *Mycobacterium tuberculosis* infection life long? *BMJ*. 2019; 367: i5770. PubMed PMID: 31649096. DOI: 10.1136/bmj.i5770.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2020. World Health Organization, Geneva, 2020. Available at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en.
3. Mirzozan JeZ. Tuberkulez kishechnika i brjushiny. V knige: V. L. Jejniz, redaktor. Mnogotomnoe rukovodstvo po tuberkulezu. T. 3. M.: Medgiz, 1960; s. 125–146. Russian.
4. Оносовский В. В. О лечении туберкулезного перитонита у детей, по материалам Ольгинской детской больницы в Москве за 36 лет. Проблемы туберкулеза. 1923; 5–6 (1): 148–155. Russian.
5. Savonenkova LN, Arjamkina OL. Patogenez i morfogenez abdominal'nogo tuberkuleza s porazheniem gastrointestinal'nogo trakta. *Nizhegorodskij medicinskij zhurnal*. 2006; 2: 89–94. Russian.
6. Dülger AC, Karadaş S, Mete R, Türkdoğan MK, Demirkıran D, Gültepe B. Analysis of cases with tuberculous peritonitis: a single-center experience. *Turk J Gastroenterol*. 2014; 25 (1): 72–8. PubMed PMID: 24918135. DOI: 10.5152/tjg.2014.5145.
7. Bellendir JeN. Patogenez vnelegochnyh lokalizacij tuberkuleza. V knige: A. V. Vasil'ev, redaktor. Vnelegochnyj tuberkulez. SPb., 2000; s. 36–48. Russian.
8. Singh MM, Bhargava AN, Jain KP. Tuberculous peritonitis. An evaluation of pathogenetic mechanisms, diagnostic procedures and therapeutic measures. *N Engl J Med*. 1969; 281 (20): 1091–4. PubMed PMID: 5824174. DOI: 10.1056/NEJM196911132812003.
9. Bezredka AM. Oчерки по иммунитету. М.–Л., 1929; 267 с. Russian.

10. Kishenskij DN. Vlijanie chrevosechenija na tuberkulez brjushiny. Jeksperimental'noe issledovanie [dissertacija]. M.: Tovarishestvo tipografii A. I. Mamontova, 1894; 82 c. Russian.
11. Lurie MB. The fate of tubercle bacilli in the organs of reinfected rabbits. *J Exp Med.* 1929; 50 (6): 747–765. PubMed PMID: 19869661. DOI: 10.1084/jem.50.6.747.
12. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol.* 2002; 168 (9): 4620–7. PubMed PMID: 11971010. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4620.
13. Brissot E, Bernard DG, Loréal O, Brissot P, Troadec MB. Too much iron: A masked foe for leukemias. *Blood Rev.* 2020; 39: 100617. PubMed PMID: 31753415. DOI: 10.1016/j.blre.2019.100617.
14. Shekunova EV, Kovaleva MA, Makarova MN, Makarov VG. Vybory preparata dlja doklinicheskogo issledovanija: mezhvidovoj perenos doz. *Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija.* 2020; 10 (1): 19–28. DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-19-28. Russian.
15. Zemskova ZS, Arijel BM, Babaeva IJu, Erohin VV, Zjuzja JuR., Lepeha LN. Tuberkulez (vklad otechestvennyh uchenyh HH stoletija v razvitie fiziatrii). M.: Izd-vo Sechenovskogo universiteta, 2020; 352 s. Russian.
16. Shepelkova GS, Evstifeev VV, Apt AS. Issledovanie molekuljarnyh mehanizmov patogeneza tuberkuleza na jeksperimental'nyh modeljah. *Tuberkulez i bolezni legkih.* 2012; 89 (7): 3–11. Russian.
17. Singhal A, Aliouat el M, Hervé M, Mathys V, Kiass M, Creusy C. et al. Experimental tuberculosis in the Wistar rat: a model for protective immunity and control of infection. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18632. PubMed PMID: 21533270. DOI: 10.1371/journal.pone.0018632.
18. Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature.* 1996; 379 (6563): 333–5. PubMed PMID: 8552186. DOI: 10.1038/379333a0.
19. Bujanov VM, Rodoman GV, Belous GG. Jeksperimental'naja model' ostrogo gnojnogo peritonita. *Hirurgija. Zhurnal im. N. I. Pirogova.* 1997; 1: 25–28. Russian.
20. Knutsen KM, Skuterud B, Halvorsen S. Hemoperfusjon ved forgiftninger [Hemoperfusion in poisoning]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1979; 99 (3): 172–4. PubMed PMID: 419497.
21. Dobbie JW. Serositis: comparative analysis of histological findings and pathogenetic mechanisms in nonbacterial serosal inflammation. *Perit Dial Int.* 1993; 13 (4): 256–69. PubMed PMID: 8241326.
22. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 2001; 69 (3): 1847–55. PubMed PMID: 11179363. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1847-1855.2001.
23. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol.* 2002; 168 (9): 4620–7. PubMed PMID: 11971010. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4620.
24. Saleh MA, Ramadan MM, Arram EO. Toll-like receptor-2 Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms and susceptibility to pulmonary and peritoneal tuberculosis. *APMIS.* 2017; 125 (6): 558–64. PubMed PMID: 28332241. DOI: 10.1111/apm.12680.
25. Aleshkin VA, Lozhkina AN, Zagorodnjaja JeD. Immunologija reprodukcii. Chita, 2004; 79 s. Russian.
26. Krekova JuV. Izmenenie funkcional'nogo sostojanija immunnoj sistemy u bol'nyh razlichnymi tipami saharnogo diabeta [dissertacija]. 2002; 122 s. Russian.
27. Shatalin JuV, Naumov AA, Pocelueva MM. Izmenenie sostava kletochnyh populacij i urovnja aktivnyh form kisloroda v krvi i asciticheskoj zhidkosti opuholenositelja. *Citologija.* 2010; 52 (2): 131–35. Russian.
28. Rohit A, Abraham G. Peritoneal dialysis related peritonitis due to *Mycobacterium* spp.: A case report and review of literature. *J Epidemiol Glob Health.* 2016; 6 (4): 243–8. PubMed PMID: 27443487. DOI: 10.1016/j.jegh.2016.06.005.
29. Pomprasert S, Leechanachai P, Klinbuayaem V, Leenasirimakul P, Promping C, Inta P, et al. Unmasking tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1 infection after antiretroviral therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2010; 28 (2–3): 206–9. PubMed PMID: 21038792.
30. Roth S, Delmont E, Heudier P, Kaphan R, Cua E, Castela J, et al. Anticorps anti-TNF alpha (infliximab) et tuberculose: à propos de trois cas [Anti-TNF alpha monoclonal antibodies (infliximab) and tuberculosis: apropos of 3 cases]. *Rev Med Interne.* 2002; 23 (3): 312–6. PubMed PMID: 11928379. DOI: 10.1016/s0248-8663(01)00556-2.
31. Moule MG, Cirillo JD. *Mycobacterium tuberculosis* Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 65. PubMed PMID: 32161724. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00065.

РАЗМЕТКА ЦВЕТНЫХ ФОТОГРАФИЙ ГЛАЗНОГО ДНА УЛУЧШАЕТ РАСПОЗНАВАНИЕ МАКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКОГО ОБУЧЕНИЯ

Х. П. Тахчиди¹, П. В. Глизнита² ✉, С. Н. Светозарский³, А. И. Бурсов⁴, К. А. Шустерзон⁵

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

² ООО «Инновационные технологии», Нижний Новгород, Россия

³ Приволжский окружной медицинский центр Федерального медико-биологического агентства, Нижний Новгород, Россия

⁴ Институт системного программирования имени В. П. Иванникова РАН, Москва, Россия

⁵ Институт систем энергетики имени Л. А. Мелентьева, Иркутск, Россия

Заболевания сетчатки остаются одной из ведущих причин слепоты в мире. Разработка методов автоматизированной диагностики может повысить эффективность и доступность программ массового скрининга патологии макулярной области. Целью работы было разработать и провалидировать алгоритмы машинного обучения для диагностики макулярной патологии на основе анализа цветных фотографий глазного дна с предварительной разметкой данных и без нее на примере возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В исследовании использовали 1200 цветных фотографий глазного дна из локальных баз данных, включая 575 изображений сетчатки пациентов с ВМД и 625 ретинальных фотографий здоровых пациентов. Алгоритм глубокого обучения был реализован на основе нейронной сети Faster RCNN с ResNet50 в качестве сверточной основы с использованием трансферного обучения. В результате, при отсутствии разметки валидация показала неудовлетворительную точность модели (79%), что было связано с неправильным выбором нейросетью областей внимания. Выполнение разметки повысило эффективность разработанной методики, на тестовом наборе данных модель продемонстрировала адекватное определение информативных участков, точность классификации достигла 96,6%. Таким образом, применение разметки изображений значительно повышает точность распознавания цветных изображений сетчатки с помощью нейросетевых технологий и позволяет создавать эффективные модели при использовании ограниченных по объему наборов данных.

Ключевые слова: болезни сетчатки, фундус-камера, машинное обучение, скрининг, биомедицинская визуализация, разметка данных

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям (договор №150Г1ЦНТИС5/64226 от 22.12.2020).

Вклад авторов: Х. П. Тахчиди — редактирование рукописи; П. В. Глизнита — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ результатов, написание текста рукописи; С. Н. Светозарский — участие в сборе данных, анализ результатов, работа с литературой, написание текста рукописи; А. И. Бурсов — работа с литературой, разработка алгоритмов, редактирование рукописи; К. А. Шустерзон — разработка и валидация алгоритмов, подготовка иллюстраций, участие в написании текста.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Викторович Глизнита
ул. Белинского, д. 58/60, эт. 5, 603000, г. Нижний Новгород; gliznitsap@icloud.com

Статья получена: 27.07.2021 **Статья принята к печати:** 15.08.2021 **Опубликована онлайн:** 28.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.040

LABELLING OF DATA ON FUNDUS COLOR PICTURES USED TO TRAIN A DEEP LEARNING MODEL ENHANCES ITS MACULAR PATHOLOGY RECOGNITION CAPABILITIES

Takhchidi HP¹, Gliznitsa PV² ✉, Svetozarskiy SN³, Bursov AI⁴, Shusterzon KA⁵

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² ООО Innovatsionniye Tekhnologii (Innovative Technologies, LLC), Nizhny Novgorod, Russia

³ Volga District Medical Center under the Federal Medical-Biological Agency, Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Ivannikov Institute for System Programming of RAS, Moscow, Russia

⁵ L.A. Melentiev Energy Systems Institute, Irkutsk, Russia

Retinal diseases remain one of the leading causes of visual impairments in the world. The development of automated diagnostic methods can improve the efficiency and availability of the macular pathology mass screening programs. The objective of this work was to develop and validate deep learning algorithms detecting macular pathology (age-related macular degeneration, AMD) based on the analysis of color fundus photographs with and without data labeling. We used 1200 color fundus photographs from local databases, including 575 retinal images of AMD patients and 625 pictures of the retina of healthy people. The deep learning algorithm was deployed in the Faster RCNN neural network with ResNet50 for convolution. The process employed the transfer learning method. As a result, in the absence of labeling, the accuracy of the model was unsatisfactory (79%) because the neural network selected the areas of attention incorrectly. Data labeling improved the efficacy of the developed method: with the test dataset, the model determined the areas with informative features adequately, and the classification accuracy reached 96.6%. Thus, image data labeling significantly improves the accuracy of retinal color images recognition by a neural network and enables development and training of effective models with limited datasets.

Keywords: retinal diseases, fundus camera, machine learning, screening, biomedical visualization, data labeling

Funding: this work was financially supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology (contract №150Г1ЦНТИС5/64226 dated December 22, 2020)

Author contribution: Takhchidi HP — manuscript editing; Gliznitsa PV — study concept and design, data collection and processing, results analysis, manuscript writing; Svetozarskiy SN — participation in data collection, literature and results analysis, manuscript writing; Bursov AI — literature analysis, algorithms development, manuscript editing; Shusterzon KA — algorithms development and validation, illustrations preparation, text writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel V. Gliznitsa
Belinskogo, 58/60, et. 5, 603000, Nizhny Novgorod; gliznitsap@icloud.com

Received: 27.07.2021 **Accepted:** 15.08.2021 **Published online:** 28.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.040

Болезни сетчатки занимают второе место и составляют 28,9% среди причин инвалидности по зрению в Российской Федерации [1]. Построение эффективной системы раннего выявления ретиальной патологии на этапе массовой диспансеризации остается нерешенной задачей. Подобные программы требуют построения логистики и выделения штата, что подразумевает, кроме разового финансирования на этапе внедрения, регулярные затраты на поддержание системы и оплату труда персонала. С помощью компьютеров можно быстрее анализировать большие массивы данных, а алгоритмы машинного обучения автоматизируют длительную и трудоемкую процедуру отбора пациентов, подлежащих углубленному обследованию. Таким образом, технологии искусственного интеллекта, способные проводить скрининг на глазные заболевания, могут сократить дефицит кадров в первичном звене здравоохранения и снизить затраты на диспансеризацию, одновременно увеличивая число пациентов, обоснованно направляемых к офтальмологу по поводу подозреваемой офтальмологической патологии [2].

Одной из основных причин слабости зрения остается возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — дегенеративное заболевание сетчатки, распространенное среди лиц в возрасте 50 лет и старше. Для него характерно наличие в макулярной зоне мягких друз диаметром 63 мкм и более, гиперпигментации и/или гипопигментации пигментного эпителия, отслойки пигментного и нейроэпителия, географической атрофии пигментного эпителия, ретиальных геморрагий и рубцовых изменений сетчатки [3].

ВМД имеет большое клиническое и социальное значение. Распространенность ВМД в возрастной группе от 50 до 85 лет составляет 8,69%, из которых ранняя ВМД занимает 8,01%, поздние стадии — 0,37% [4]. Математическое моделирование позволяет прогнозировать увеличение абсолютной численности больных ВМД от 196 млн человек в 2020 г. до 288 млн — к 2040 г. [4]. Поздние формы ВМД приводят к выраженной деградации центрального зрения, что снижает качество жизни, ограничивает жизнедеятельность и ухудшает трудоспособность. Своевременное выявление заболевания и адекватный мониторинг пациентов являются залогом успешного лечения неоваскулярной формы ВМД, поскольку эффективность антиангиогенной терапии напрямую зависит от времени, прошедшего от момента манифестации до получения первой дозы препарата [5]. Фоторегистрация глазного дна — распространенный и высокочувствительный метод визуализации макулярной патологии, его использование в целях массового скрининга позволило значительно повысить выявляемость ранних стадий ВМД в ряде стран [6].

Цель настоящего исследования — разработка и валидация алгоритмов машинного обучения для диагностики макулярной патологии на примере ВМД на основе анализа цветных фотографий глазного дна с предварительной разметкой данных и без нее, а также оценка чувствительности и специфичности методики на тестовом наборе данных.

Таблица 1. Клиническая классификация ВМД [8]

Стадия	Признаки
Нормальные возрастные изменения	Мелкие друзы до 63 мкм в отсутствие нарушений пигментации
Ранняя	Друзы диаметром 63–125 мкм без нарушений пигментации
Промежуточная	Друзы диаметром более 125 мкм, нарушения пигментации
Поздняя	Неоваскулярная форма или географическая атрофия

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали набор цветных фотографий глазного дна, собранных на базе ООО «Центр зрения» (г. Челябинск) и офтальмологического отделения ФБУЗ ПОМЦ ФМБА России (г. Нижний Новгород) на фундус-камерах Visucam 500 (Carl Zeiss; США). Критерии включения фотографических снимков в исследование: наличие диагноза ВМД на одном глазу в электронной амбулаторной карте пациента; наличие специфических признаков ВМД на фотографическом изображении; отсутствие признаков иных заболеваний сетчатки (диабетической ретинопатии и др.). Качество изображений оценивали в баллах по шкале от 1 до 4 по методике Klais С. и соавторов, где 1 балл — высокое качество, 2 балла — среднее качество, 3 балла — низкое качество, 4 балла — нечитаемый снимок [7]. Изображения, оцененные в 3–4 балла, выбраковывали. В работе использовали широко распространенную клиническую классификацию ВМД, выделяющую раннюю, промежуточную и позднюю стадии (табл. 1) [8]. Классификация изображений в первично сформированной базе была верифицирована слепым методом: обезличенный набор данных был представлен для независимой классификации и определения стадии ВМД двум врачам-офтальмологам, имеющим опыт работы более 5 лет.

В результате, набор данных составил 1200 цветных фотографий глазного дна, включая 575 изображений сетчатки пациентов с ВМД и 625 ретиальных фотографий здоровых пациентов. Согласно классификации, 127 изображений сетчатки пациентов с ВМД были отнесены к ранней стадии, 341 — к промежуточной и 107 — к поздней стадии ВМД.

Распределение данных в обучающую и тестовую выборки выполняли в случайном порядке, для обучения нейронной сети использовали 994 изображения (475 глаз с ВМД, 519 глаз здоровых пациентов), для тестирования — 206 фотографий (100 — пациентов с ВМД, 106 — здоровых пациентов).

Для решения поставленной задачи использовали два подхода к обучению:

- 1) обучение сверточной нейронной сети на наборе данных, состоящем из бинарно классифицированных изображений без указания областей интереса;
- 2) обучение сверточной нейронной сети на наборе данных, состоящем из бинарно классифицированных изображений с указанием областей интереса путем детекции объектов с помощью ограничительных рамок (bounding boxes).

В обоих случаях в качестве сверточной основы использовали архитектуру глубокого обучения ResNet-50 и трансферное обучение [9]. Трансферное обучение — это использование сверточных нейронных сетей, предварительно обученных на большом наборе сторонних данных. Подобная сеть с уже имеющимися весами впоследствии обучается на небольшом наборе непосредственно необходимых данных. В настоящей

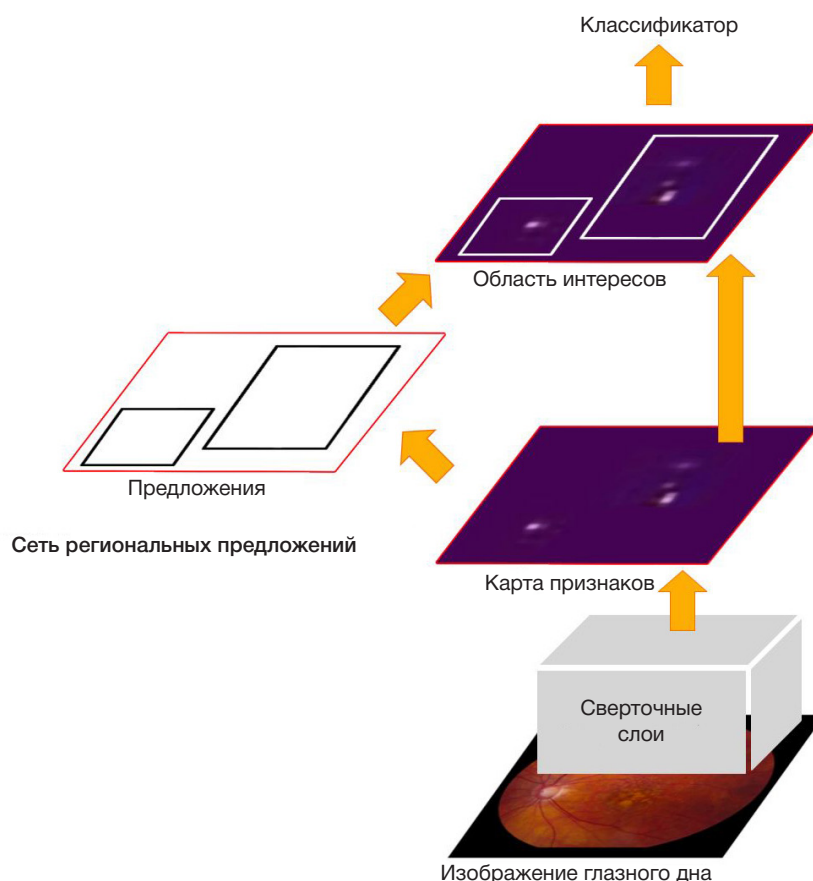


Рис. 1. Этапы анализа изображений с помощью нейронной сети Faster RCNN

работе предварительное обучение проходило на наборе данных ImageNET с миллионами изображений, разделенных на 1000 различных классов [10].

Изображения глазного дна из локальных баз данных проходили предпроцессинг в виде преобразования в стандартное разрешение 512×512 , затем были обработаны предварительно обученной нейронной сетью Faster RCNN с ResNet50 в качестве сверточной основы. Каждое окно вывода было связано с меткой категории и оценкой softmax в $[0, 1]$. Для отображения этих изображений использовали порог оценки 0,7. Время выполнения для получения этих результатов составляет 120 мс на изображение, включая все шаги. В результате, этапы анализа изображений можно представить следующим образом: предпроцессинг, обработка сверточной нейросетью с формированием карты признаков, выделение на ней региональных предложений, определение областей интереса и классификация изображения в один из двух классов (ВМД или норма) на основании признаков, расположенных в пределах области интереса (рис. 1).

Все алгоритмы были разработаны в Python 3.7 с использованием библиотек PyTorch 1.5.0, TorchVision

0.6.0, Tensorflow 1.14.0, Keras 2.0.8, Pillow 7.2, OpenCV 4.5.2, Cuda 10.1, cudnn 7.6.5. Вычисления проводили на следующем аппаратном обеспечении — GPU - RTX 2070 с дизайном Max-Q 8 ГБ GDDR6, CPU - Intel Core i7 9750H, 16 ГБ RAM 2666 МГц (Intel; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Классификация изображений сверточной нейронной сетью без указания областей интереса

Все цветные изображения глазного дна из обучающей выборки были приведены к разрешению 512×512 и нормализованы по среднему пикселю. Затем было запущено обучение нейронной сети на этих данных. Обучение продлилось 193 мин, 50 итераций, используемый размер батча (объединенная загрузка) — 10 изображений, в качестве оптимизатора был использован стохастический градиентный спуск с модификацией Нестерова, параметр Learning Rate — 0,0005, момент — 0,9. Функция потерь — категориальная кросс-энтропия, метрика — точность.

Таблица 2. Показатели эффективности разработанных моделей при выявлении ВМД на цветных фотографиях сетчатки

Показатель	Машинное обучение без разметки	Машинное обучение с предварительной разметкой данных
Чувствительность	80,9%	99,0%
Специфичность	77,4%	94,3%
Точность	79%	96,6%
Прогностичность положительного результата	74%	94,3%
Прогностичность отрицательного результата	82%	99,0%

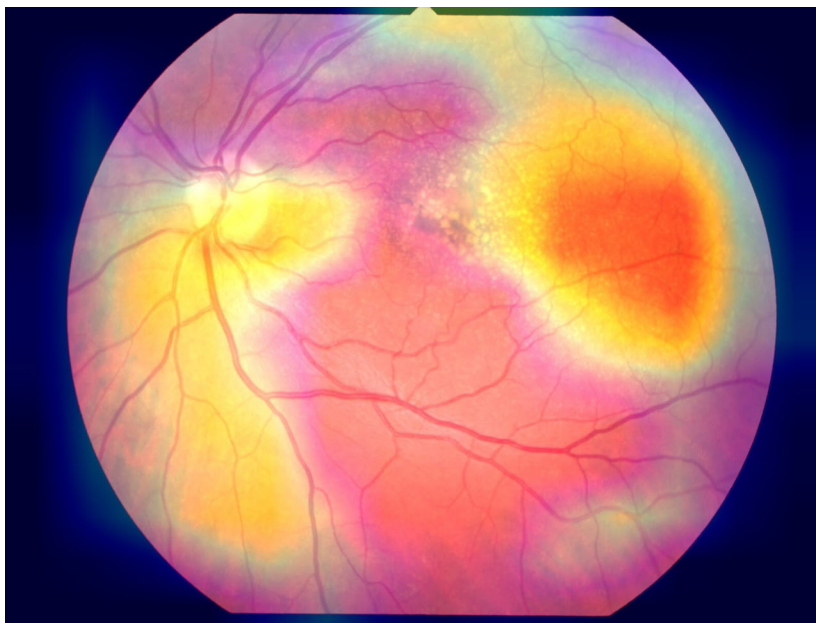


Рис. 2. Пример визуализации тепловой карты активации классов на примере фотографии глазного дна пациента с ВМД

При валидации полученной модели на тестовом наборе данных была определена следующая эффективность модели: достигнута специфичность 77,4%, чувствительность — 80,9%, точность — 79% (табл. 2). Для получения информации о том, какие именно области изображения были задействованы для классификации, были выгружены данные визуализации тепловых карт активации классов (рис. 2).

В результате установлено, что нейросетью были неверно выбраны области внимания: область диска зрительного нерва, которая не задействована при развитии патологического процесса при ВМД, и парамакулярная область. Таким образом, нейронная сеть использовала неправильные признаки при обучении, которые тем не менее коррелируют с результатом классификации.

Классификация изображений сверточной нейронной сетью с предварительным указанием областей интереса

Была использована та же выборка, что и в первом случае, но с использованием разметки макулярной области как региона интереса методом ограничительных рамок (bounding-box). Все изображения были приведены к разрешению 512×512 и нормализованы по среднему пикселю. Для имплементации object detection был использован метод Faster RCNN + FPN network [11]. Обучение продлилось 158 мин, проведено 10 итераций, используемый размер батча — 10 изображений, в качестве оптимизатора был использован стохастический градиентный спуск с модификацией Нестерова, параметр

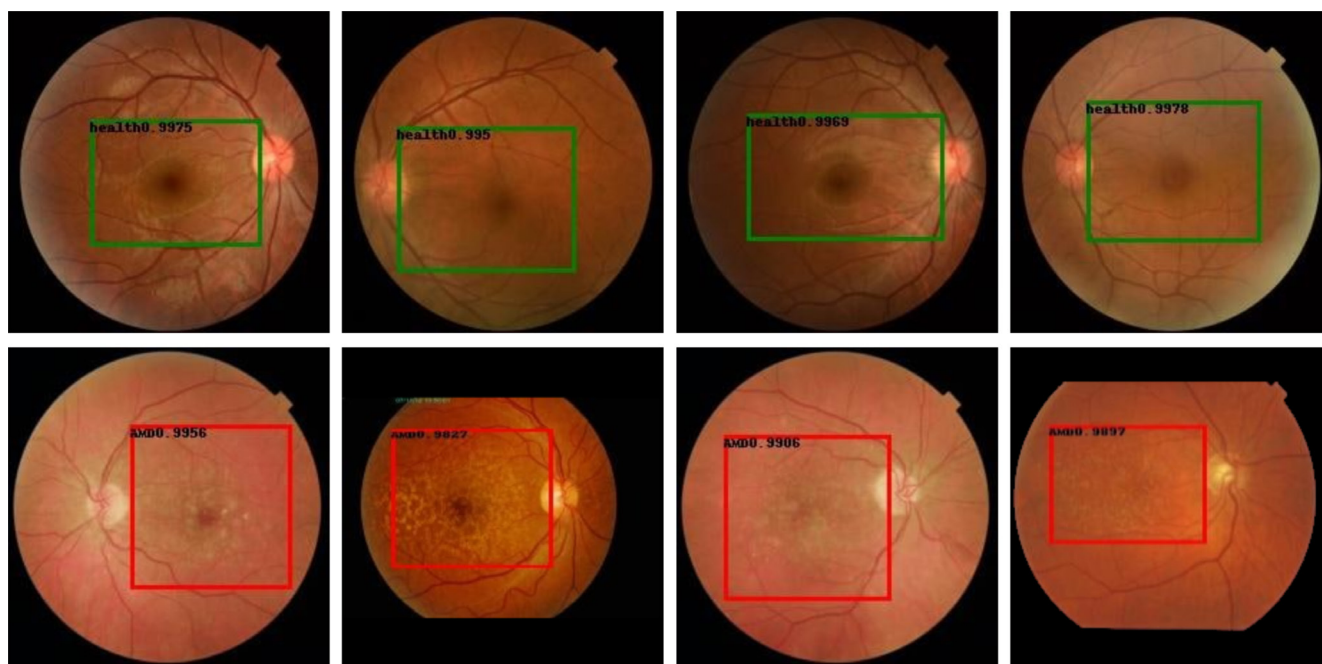


Рис. 3. Результаты обнаружения областей интереса и классификации изображений тестового набора данных сверточной нейросетью Faster RCNN с ResNet50 в качестве сверточной основы. Зеленая разметка соответствует изображениям сетчатки пациентов, верно классифицированных моделью как здоровые, красная — как пациентов с ВМД

Learning Rate — 0,0001, момент — 0,05, weight decay — 0,0005. Функция потерь — категориальная кросс-энтропия для классификации, Mean Average Accuracy — метрика измерения точности для классификации, IoU Intersection over Union — метрика измерения точности для детекции. После 10 итераций обучение разработанной модели было прекращено из-за появления эффекта переобучения [12].

На тестовом наборе данных модель продемонстрировала точность классификации, равную 96,6% при чувствительности — 99,0% и специфичности — 94,3% (табл. 2). Визуализация областей интереса показала адекватное определение информативных участков на изображениях (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что нейронная сеть Faster RCNN с ResNet50 в качестве сверточной основы позволяет эффективно дифференцировать цветные фотографии глазного дна пациентов с ВМД от фундус-изображений пациентов со здоровой сетчаткой. При этом установлено, что при использовании небольшой выборки объемом 1200 изображений можно достичь высокой точности классификации за счет предварительной разметки данных.

В работах, посвященных диагностике ВМД на основе анализа цветных фотографий сетчатки с помощью нейронных сетей, чувствительность достигала 84,5–89,0%, специфичность — 83,1–89,0%, точность — 88,4–91,6% [13, 14]. В работе, посвященной выявлению ранних стадий ВМД на фундус-изображениях, удалось добиться чувствительности и специфичности 96,7%, 96,4% [15]. Данные показатели были достигнуты при отсутствии разметки данных, однако объем выборок во всех случаях составлял более 50 000 изображений, что на порядок отличается от выборки в настоящем исследовании [13–15]. В этой связи интерес представляют сравнимые показатели эффективности, достигнутые нами при сравнительно небольшом наборе данных за счет использования простого и быстрого способа разметки.

В метаанализе результатов 13 исследований были получены следующие средние показатели эффективности нейронных сетей в дифференцировании ВМД: чувствительность — 0,92, специфичность — 0,89 [16]. Однако в данный анализ были включены работы, опирающиеся как только на снимки фундус-камеры, так и на результаты оптической когерентной томографии. В метаанализе исследований, посвященных автоматизированной диагностике ВМД только на основе цветных фотографий сетчатки, чувствительность и специфичность составили 0,88 и 0,90 соответственно

[17]. Таким образом, достигнутый в нашей работе уровень точности сравним с результатами исследований, опирающихся на значительно более масштабные наборы данных.

Следует отметить, что экспресс-диагностика ВМД на цветных изображениях глазного дна традиционно лежит в основе программ массового скрининга, но имеет ограниченное применение в сфере специализированной помощи. В данной сфере перспективным направлением является определение стадий ВМД в представленном наборе данных [18–20] и выявление на снимках отдельных патологических элементов [21], что может служить целям мониторинга в ходе клинического наблюдения и при проведении клинических испытаний.

С одной стороны, небольшой объем обучающей выборки и объединение в один класс различных стадий ВМД можно считать ограничением настоящей работы, с другой стороны, они позволили ответить на вопросы, поставленные в исследовании. Использование выборки небольшого объема подтвердило, что при ограниченном объеме локальной базы данных можно успешно разработать вычислительные модели для автоматизированной диагностики заболеваний сетчатки при условии разметки данных обучающей выборки. Клиническая гетерогенность патологических изменений позволяет моделировать реальную ситуацию скрининга, где необходимо с высокой чувствительностью выявлять разнообразную патологию с целью направления на дообследование.

ВЫВОДЫ

Автоматизированная диагностика заболеваний сетчатки как одной из ведущих причин слепоты и слабовидения открывает новые возможности для массового скрининга ВМД среди населения. Применение быстрого и простого в исполнении метода разметки изображений в виде ограничительных рамок (bounding boxes) значительно повышает точность разрабатываемых методик распознавания медицинских изображений с помощью нейросетевых технологий. В результате, можно добиться высокой точности классификации, опираясь на локальные базы данных небольшого объема. В то же время это подчеркивает важную роль врачей-специалистов в разработке новых методов диагностики, основанных на машинном обучении. Развитие данного направления требует консолидированных усилий офтальмологов и IT-инженеров по созданию крупных аннотированных баз ретинальных изображений, собранных на различных моделях фундус-камер, что при нанесении разметки позволит добиться высокой точности и воспроизводимости результатов в реальной клинической практике.

Литература

1. Назарян М. Г., Верташ О. Ю. Анализ показателей первичной и повторной инвалидности вследствие болезней глаза у лиц пенсионного возраста в Российской Федерации и Москве. Успехи геронтологии. 2019; 32 (1–2): 215–17.
2. Armstrong GW, Lorch AC. A(eye): A Review of Current Applications of Artificial Intelligence and Machine Learning in Ophthalmology. Int Ophthalmol Clin. 2020; 60 (1): 57–71. DOI: 10.1097/IIO.0000000000000298. PMID: 31855896.
3. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. Surv Ophthalmol. 1995; 39 (5): 367–74.
4. Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health. 2014; 2 (2): e106–e116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
5. Schwartz R, Warwick A, Olvera-Barrios A, Pikoula M, Lee AY, Denaxas S, et al. Evolving treatment patterns and outcomes of neovascular age-related macular degeneration over a decade.

- Ophthalmol Retina. 2021; 5 (8): e11–e22. DOI: 10.1016/j.oret.2021.04.001. Epub ahead of print. PMID: 33866023.
6. Danis RP, Domalpally A, Chew EY, et al. Methods and reproducibility of grading optimized digital color fundus photographs in the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2 Report Number 2). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54 (7): 4548–54.
 7. Klais C, et al. Photoscreening for diabetic retinopathy: a comparison of image quality between film photography and digital imaging. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004; 32: 393–6
 8. Ferris 3rd FL, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013; 120 (4): 844–51.
 9. He K, Zhang X, Ren S, Sun J. Deep Residual Learning for Image Recognition. 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). 2016, pp. 770–778. DOI: 10.1109/CVPR.2016.90.
 10. Deng J, Dong W, Socher R, Li L, Li K, Fei-Fei L. ImageNet: A large-scale hierarchical image database. 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2009; pp. 248–255. DOI: 10.1109/CVPR.2009.5206848.
 11. Ren S, He K, Girshick R, Sun J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 2017; 39 (6): 1137–49. DOI: 10.1109/TPAMI.2016.2577031.
 12. Lee CS, Baughman DM, Lee AY. Deep learning is effective for the classification of OCT images of normal versus Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2017; 1 (4): 322–7. DOI: 10.1016/j.oret.2016.12.009.
 13. Burlina P, Joshi N, Pacheco KD, Freund DE, Kong J, Bressler NM. Utility of Deep Learning Methods for Referability Classification of Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2018; 136 (11): 1305–7. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2018.3799.
 14. Burlina PM, Joshi N, Pekala M, Pacheco KD, Freund DE, Bressler NM. Automated Grading of Age-Related Macular Degeneration From Color Fundus Images Using Deep Convolutional Neural Networks. *JAMA Ophthalmol*. 2017 Nov 1; 135 (11): 1170–6. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.3782. PMID: 28973096; PMCID: PMC5710387.
 15. Keel S, Li Z, Scheetz J, Robman L, Phung J, Makeyeva G, et al. Development and validation of a deep-learning algorithm for the detection of neovascular age-related macular degeneration from colour fundus photographs. *Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Nov; 47 (8): 1009–18. DOI: 10.1111/ceo.13575. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31215760.
 16. Cheung R, Chun J, Sheidow T, Motolko M, Malvankar-Mehta MS. Diagnostic accuracy of current machine learning classifiers for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Eye (Lond)*. 2021 May 6. DOI: 10.1038/s41433-021-01540-y. Epub ahead of print. PMID: 33958739.
 17. Dong L, Yang Q, Zhang RH, Wei WB. Artificial intelligence for the detection of age-related macular degeneration in color fundus photographs: A systematic review and meta-analysis. *E Clinical Medicine*. 2021 May 8; 35: 100875. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.100875. PMID: 34027334; PMCID: PMC8129891.
 18. Grassmann F, Mengelkamp J, Brandl C, Harsch S, Zimmermann ME, Linkohr B, et al. A Deep Learning Algorithm for Prediction of Age-Related Eye Disease Study Severity Scale for Age-Related Macular Degeneration from Color Fundus Photography. *Ophthalmology*. 2018 Sep; 125 (9): 1410–20. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.02.037. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29653860.
 19. Peng Y, Dharssi S, Chen Q, Keenan TD, Agrón E, Wong WT, et al. DeepSeeNet: A Deep Learning Model for Automated Classification of Patient-based Age-related Macular Degeneration Severity from Color Fundus Photographs. *Ophthalmology*. 2019 Apr; 126 (4): 565–75. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.11.015. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30471319; PMCID: PMC6435402.
 20. Keenan TD, Dharssi S, Peng Y, Chen Q, Agrón E, Wong WT, et al. A Deep Learning Approach for Automated Detection of Geographic Atrophy from Color Fundus Photographs. *Ophthalmology*. 2019 Nov; 126 (11): 1533–40. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.06.005. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31358385; PMCID: PMC6810830.
 21. Keenan TDL, Chen Q, Peng Y, Domalpally A, Agrón E, Hwang CK, et al. Deep Learning Automated Detection of Reticular Pseudodrusen from Fundus Autofluorescence Images or Color Fundus Photographs in AREDS2. *Ophthalmology*. 2020 Dec; 127 (12): 1674–87. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.05.036. Epub 2020 May 21. PMID: 32447042.

References

1. Nazarian MG, Vertash OYu. Analiz pokazatelej pervichnoj i povtornoj invalidnosti vsledstvie boleznej glaza u lic pensionnogo vozrasta v Rossijskoj Federacii i Moskve. *Uspehi gerontologii*. 2019; 32 (1–2): 215–17. Russian.
2. Armstrong GW, Lorch AC. A(eye): A Review of Current Applications of Artificial Intelligence and Machine Learning in Ophthalmology. *Int Ophthalmol Clin*. 2020; 60 (1): 57–71. DOI: 10.1097/IIO.0000000000000298. PMID: 31855896.
3. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 1995; 39 (5): 367–74.
4. Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014; 2 (2): e106–e116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
5. Schwartz R, Warwick A, Olvera-Barrios A, Pikoula M, Lee AY, Denaxas S, et al. Evolving treatment patterns and outcomes of neovascular age-related macular degeneration over a decade. *Ophthalmol Retina*. 2021; 5 (8): e11–e22. DOI: 10.1016/j.oret.2021.04.001. Epub ahead of print. PMID: 33866023.
6. Danis RP, Domalpally A, Chew EY, et al. Methods and reproducibility of grading optimized digital color fundus photographs in the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2 Report Number 2). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54 (7): 4548–54.
7. Klais C, et al. Photoscreening for diabetic retinopathy: a comparison of image quality between film photography and digital imaging. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004; 32: 393–6
8. Ferris 3rd FL, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013; 120 (4): 844–51.
9. He K, Zhang X, Ren S, Sun J. Deep Residual Learning for Image Recognition. 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). 2016, pp. 770–778. DOI: 10.1109/CVPR.2016.90.
10. Deng J, Dong W, Socher R, Li L, Li K, Fei-Fei L. ImageNet: A large-scale hierarchical image database. 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2009; pp. 248–255. DOI: 10.1109/CVPR.2009.5206848.
11. Ren S, He K, Girshick R, Sun J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 2017; 39 (6): 1137–49. DOI: 10.1109/TPAMI.2016.2577031.
12. Lee CS, Baughman DM, Lee AY. Deep learning is effective for the classification of OCT images of normal versus Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2017; 1 (4): 322–7. DOI: 10.1016/j.oret.2016.12.009.
13. Burlina P, Joshi N, Pacheco KD, Freund DE, Kong J, Bressler NM. Utility of Deep Learning Methods for Referability Classification of Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2018; 136 (11): 1305–7. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2018.3799.
14. Burlina PM, Joshi N, Pekala M, Pacheco KD, Freund DE, Bressler NM. Automated Grading of Age-Related Macular Degeneration From Color Fundus Images Using Deep Convolutional Neural Networks. *JAMA Ophthalmol*. 2017 Nov 1; 135 (11): 1170–6. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2017.3782. PMID: 28973096; PMCID: PMC5710387.

15. Keel S, Li Z, Scheetz J, Robman L, Phung J, Makeyeva G, et al. Development and validation of a deep-learning algorithm for the detection of neovascular age-related macular degeneration from colour fundus photographs. *Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Nov; 47 (8): 1009–18. DOI: 10.1111/ceo.13575. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31215760.
16. Cheung R, Chun J, Sheidow T, Motolko M, Malvankar-Mehta MS. Diagnostic accuracy of current machine learning classifiers for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Eye (Lond)*. 2021 May 6. DOI: 10.1038/s41433-021-01540-y. Epub ahead of print. PMID: 33958739.
17. Dong L, Yang Q, Zhang RH, Wei WB. Artificial intelligence for the detection of age-related macular degeneration in color fundus photographs: A systematic review and meta-analysis. *E Clinical Medicine*. 2021 May 8; 35: 100875. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.100875. PMID: 34027334; PMCID: PMC8129891.
18. Grassmann F, Mengelkamp J, Brandl C, Harsch S, Zimmermann ME, Linkohr B, et al. A Deep Learning Algorithm for Prediction of Age-Related Eye Disease Study Severity Scale for Age-Related Macular Degeneration from Color Fundus Photography. *Ophthalmology*. 2018 Sep; 125 (9): 1410–20. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.02.037. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29653860.
19. Peng Y, Dharssi S, Chen Q, Keenan TD, Agrón E, Wong WT, et al. DeepSeeNet: A Deep Learning Model for Automated Classification of Patient-based Age-related Macular Degeneration Severity from Color Fundus Photographs. *Ophthalmology*. 2019 Apr; 126 (4): 565–75. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.11.015. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30471319; PMCID: PMC6435402.
20. Keenan TD, Dharssi S, Peng Y, Chen Q, Agrón E, Wong WT, et al. A Deep Learning Approach for Automated Detection of Geographic Atrophy from Color Fundus Photographs. *Ophthalmology*. 2019 Nov; 126 (11): 1533–40. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.06.005. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31358385; PMCID: PMC6810830.
21. Keenan TDL, Chen Q, Peng Y, Domalpally A, Agrón E, Hwang CK, et al. Deep Learning Automated Detection of Reticular Pseudodrusen from Fundus Autofluorescence Images or Color Fundus Photographs in AREDS2. *Ophthalmology*. 2020 Dec; 127 (12): 1674–87. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.05.036. Epub 2020 May 21. PMID: 32447042.

РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕПАРАЦИИ КОЖИ ПОСЛЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ С МЕЛАТОНИНОМ

М. В. Осиков^{1,2}, А. А. Агеева¹ ✉, А. А. Федосов³, В. А. Ушакова¹

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

² Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

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

Разработка и патогенетическое обоснование применения новых средств для локальной терапии термической травмы (ТТ) — одна из актуальных проблем медицины. Мелатонин (МТ) — эндогенный фактор регуляции гомеостаза с плейотропным потенциалом. Целью работы было оценить показатели репарации, функциональное состояние тучных клеток (ТК), содержание матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в очаге повреждения кожи в динамике экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной дермальной пленки (ДП) с МТ. ТТ степени IIIA площадью 3,5% моделировали погружением участка кожи в кипящую воду. ДП площадью 12 см² с МТ в концентрации 5 мг/г наносили ежедневно в течение пяти суток. Вычисляли площадь раны и скорость ее эпителизации, в ожоговой ране определяли число ТК и интенсивность дегрануляции, экспрессию MMP-9 и VEGF. В динамике ТТ абсолютная площадь ожоговой раны уменьшается на 35%, увеличивается скорость ее эпителизации, в очаге ТТ увеличивается число ТК, изменяется их функциональная характеристика; увеличивается экспрессия MMP-9 и VEGF. Выявлена обратная связь площади ожоговой раны с экспрессией MMP-9 и VEGF, коэффициентом дегрануляции ТК. Применение МТ при ТТ ведет к уменьшению площади ожоговой раны, увеличению скорости ее эпителизации, увеличению в ожоговой ране общего числа ТК и дегрануляции на 5-е и 10-е сутки, снижению общего числа и дегрануляции ТК на 20-е сутки ТТ (166,87 (154,95; 178,78) ед./мм²; в контроле — 464,84 (452,92; 476,76) ед./мм²), увеличению экспрессии MMP-9 на 5-е сутки (14,20 (11,30; 18,10); в контроле — 3,30 (2,20; 4,40)), экспрессии VEGF на 5-е и 10-е сутки (33,00 (30,20; 34,90); в контроле — 25,40 (22,20; 29,30)), снижению экспрессии MMP-9 на 10-е и 20-е сутки ТТ.

Ключевые слова: термическая травма, мелатонин, дермальная пленка, тучные клетки, репарация, VEGF, MMP-9

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-415-740016

Вклад авторов: М. В. Осиков — концепция и дизайн исследования, интегральный анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; А. А. Агеева — набор экспериментального материала, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание текста; А. А. Федосов — анализ результатов, редактирование рукописи; В. А. Ушакова — создание дермальной пленки, анализ полученных данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета г. Челябинск (протокол № 10 от 15 ноября 2019 г.), выполнено в стандартных условиях вивария при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург), Рекомендациями Европейской комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 г. по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях, а также Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии.

✉ Для корреспонденции: Анна Алексеевна Агеева
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Статья получена: 28.06.2021 **Статья принята к печати:** 12.07.2021 **Опубликована онлайн:** 07.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.035

ROLE OF MAST CELLS IN SKIN REGENERATION AFTER THERMAL BURN TREATED WITH MELATONIN-ENRICHED DERMAL FILM

Osikov MV^{1,2}, Ageeva AA¹ ✉, Fedosov AA³, Ushakova VA¹

¹ South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of novel local therapies for thermal burns (TB) and their pathogenetic rationale are a pressing challenge. Melatonin (MT) is an endogenous factor of hemostasis regulation with pleiotropic potential. The aim of this study was to assess some parameters of tissue regeneration, the functional state of mast cells and the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the experimentally induced TB treated with the original MT-enriched dermal film (DF). A second-degree burn (3.5% of the total body surface area) was modelled by exposing a patch of skin to hot water. Applications of 12 cm² DF enriched with 5 mg/g MT were performed every day for 5 days. The following parameters were calculated: the wound area, the rate of wound epithelization, the number of MC in the wound, the intensity of degranulation, and the levels of MMP-9 and VEGF expression. Over the course of treatment, the absolute wound area shrank by 35%, its epithelization rate increased, the number of MC rose, their functional state changed, and the expression of MMP-9 and VEGF increased. A negative correlation was established between the wound area and the expression of MMP-9 and VEGF, as well as between the wound area and the degranulation coefficient. Applications of MT-enriched DF resulted in the reduction of the wound area, higher epithelization rate, an increase in the total MC count and degranulation intensity on days 5 and 10; it also led to a reduction in the total MC count and a loss in degranulation intensity on day 20 (166.87 (154.95; 178.78) un/mm² vs. 464.84 (452.92; 476.76) un/mm² in the group of intact animals), an increase in MMP-9 expression on day 5 (14.20 (11.30; 18.10) vs. 3.30 (2.20; 4.40) in the intact group), an increase in VEGF expression on days 5 and 10 (33.00 (30.20; 34.90) vs 25.40 (22.20; 29.30) in the intact group), and a reduction in MMP-9 expression on days 10 and 20 after thermal injury.

Keywords: thermal burn, melatonin, dermal film, mast cells, regeneration, VEGF, MMP-9

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Chelyabinsk region (Project ID 20-415-740016).

Author contribution: Osikov MV — study concept and design; integral analysis of the obtained data; manuscript preparation and editing; Ageeva AA — data acquisition; statistical analysis; analysis of study results; manuscript preparation; Fedosov AA — analysis of study results; manuscript editing; Ushakova VA — synthesis of the dermal film; analysis of study results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of South-Ural State Medical University (Protocol № 10 dated November 15, 2019). The study was conducted at a standard vivarium in strict compliance with guidelines on the care and euthanasia of laboratory animals outlined in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS № 123, March 18, 1986, Strasbourg), the EU Commission Recommendation 2007/526/EC on Guidelines for the Accommodation and Care of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (June 18, 2007), and the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes (September 22, 2010).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Ageeva
Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Received: 28.06.2021 **Accepted:** 12.07.2021 **Published online:** 07.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.035

Термическая травма часто связана с высокой смертностью, а также временной нетрудоспособностью пораженных. По данным ВОЗ, ежегодно около 11 млн человек нуждаются в медицинской помощи после ожогов, многие из них имеют ограничение трудоспособности, ежегодно от ожогов умирает около 200 тыс. человек [1]. Несмотря на значительные достижения в лечении ожогов, в том числе применение пересадки кожи, стволовых клеток и других методов, медленное заживление, присоединение инфекции и образование рубцов составляют ключевые проблемы в комбустиологии, что приводит к удлинению сроков госпитализации, пожизненным физическим дефектам, снижению качества жизни и эмоциональным расстройствам [2]. Данную ситуацию в значительной степени объясняют сложность и многообразие патогенетических механизмов, лежащих в основе развития, течения и исхода термической травмы (ТТ). По мнению комбустиологов, понимание патофизиологии ТТ необходимо для ограничения прогрессирования ожогов, разработки патогенетически обоснованных методов закрытия раны [3]. В патогенезе ТТ ключевое значение имеют активность нейтрофилов, макрофагов, различных субпопуляций лимфоцитов, изменение цитокинового профиля, активация процессов свободно-радикального окисления, ответа острой фазы, определяющие интенсивность и эффективность репаративных реакций в очаге повреждения [4]. Одними из первых на ТТ реагируют тучные клетки (ТК), в большом количестве присутствующие в коже. Их рассматривают как резидентные воспалительные клетки, содержащие в гранулах широкий спектр преформированных и синтезируемых *de novo* медиаторов, участвующих в сосудисто-экссудативных реакциях, формировании боли, пролиферации фибробластов, синтезе коллагена, ремоделировании рубца. Регуляция функции мастоцитов при ТТ — перспективное направление при разработке новых терапевтических подходов [5].

Современные перевязочные средства разрабатывают для активации заживления, предотвращения обезвоживания раны, а не только для ее покрытия. Они представлены гидрогелевыми, гелевыми на текстильной основе, гидроколлоидными повязками, повязками из полиуретановой губки, альгинатно-кальциевыми и др. [6]. Большую часть раневых покрытий производят зарубежные фирмы, в связи с чем разработка оригинальной дермальной пленки (ДП) для применения при ТТ представляет интерес. В состав раневых покрытий могут входить антисептики и местные анестетики, гемостатики, антиоксиданты, ранозаживляющие, стимуляторы регенерации различной природы и др. В государственном реестре лекарственных средств содержатся сведения об единичных лекарственных пленках: десневые с нитроглицерином, оральнодисперсные с силденафилом, глазные с таурином. Особое внимание при поиске новых терапевтических подходов при ТТ уделяется регуляторам гомеостаза эндогенного происхождения [7, 8]. Потенциальный, но вполне обоснованный с теоретических позиций интерес при обсуждении перспективных терапевтических агентов при ТТ связан с мелатонином (МТ). Наиболее известна роль МТ в регуляции ритмов сон-бодрствование, возбуждения нейронов, синхронизации ритмов и физиологических функций [9]. По современным представлениям, МТ — это эндогенный фактор с мультитропными эффектами, включая антиоксидантные, про- и противовоспалительные, иммуномодулирующие, антиапоптозные эффекты, регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток, которые привлекают внимание

в связи с возможностью применения для терапии [10]. В доступной литературе представлены единичные работы о разрабатываемых покрытиях с МТ для раневых дефектов, не исследован механизм локального действия мелатонина при ТТ, а на фармацевтическом рынке в РФ отсутствуют лекарственные формы с МТ для локального применения при ТТ [11, 12]. Кожа млекопитающих обладает собственной мелатонинергической системой [13]. Рецепторы МТ обнаружены в коже не только в кератиноцитах и фибробластах, клетках волосяного фолликула и меланоцитах, но и в ТК, что предполагает участие МТ в регуляции функциональной активности ТК, в том числе в контексте ограничения сосудисто-экссудативных и стимуляции репаративных реакций в коже после ТТ [14]. Кроме того, клетки кожи, в том числе ТК, сами способны синтезировать и секретировать МТ. Однако механизм предполагаемого влияния МТ на участие ТК в репарации кожи после ТТ до конца не ясен и может быть связан с секрецией тучными клетками матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Цель исследования — оценить показатели репарации, функциональное состояние ТК, содержание MMP-9 и VEGF в очаге повреждения кожи в динамике экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной ДП с МТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 70 крысах-самцах линии Wistar массой 200–240 г. Животные были случайным образом разделены на четыре группы: группу 1 ($n = 7$) — интактные животные; группу 2 ($n = 21$) — животные с ТТ и наложением асептической повязки (ТТ + АСП); группу 3 ($n = 21$) — животные с ТТ и наложением ДП-матрицы и асептической повязки (ТТ + ДП); группу 4 ($n = 21$) — животные с ТТ в условиях применения ДП с МТ и асептической повязки (ТТ + ДП МТ). Асептическую повязку и ДП меняли ежедневно до 20 суток после ТТ.

Наиболее частыми причинами ТТ являются горячая жидкость и пламя; у двух третей больных площадь ожога составляет менее 10% поверхности тела [15]. В связи с этим для моделирования ТТ II степени по МКБ-10 (IIIa степени по классификация XXVII съезда хирургов СССР 1960 г.) относительной площадью 3,5% поверхности тела межлопаточный участок кожи погружали в дистиллированную воду при 98–99 °C на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. Для анестезии использовали препарат, содержащий тилетамин и золазепам в дозе 20 мг/кг. ДП-матрицу и ДП с МТ площадью 12 см² в группах 3 и 4 соответственно наносили сразу после ТТ, закрепляя асептической повязкой, а затем ежедневно при перевязке в течение пяти суток. В предварительных исследованиях был разработан состав ДП на основе натрийкарбоксиметилцеллюлозы (поли-1,4-β-О-карбоксиметил-Д-пиранозил-Д-гликопираноза натрия), с включением МТ в концентрации 5 мг/г. Проведена оценка ДП по фармако-технологическим параметрам: органолептическим показателям (вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие примесей и микротрещин), адгезивным свойствам, механической прочности на разрыв, толщине [16]. В группе 3 использовали аналогичную по площади и свойствам, но не содержащую МТ ДП (ДП-матрица).

Для вычисления площади раны на 5-е, 10-е и 20-е сутки после ТТ методом цифровой планиметрии использовали

фотокамеру «Nikon Coolpix S2800» (Nikon; Китай) и пакет программ «Microsoft Office Visio» (Microsoft; США). Скорость эпителизации (VS) рассчитывали по формуле: $VS = S - S_n / t$, где S — начальная площадь раны до лечения (в дальнейшем, площадь при предыдущем измерении); S_n — площадь при последующем измерении; t — число дней между измерениями. Площадь раны в последующих измерениях определяли в %, принимая за 100% площадь до лечения, результат выражали в % / сут.

На 5-е, 10-е и 20-е сутки от момента индукции ТТ кожный лоскут иссекали по границе раны с захватом участка неповрежденной кожи для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований. Микроскопические исследования проводили на микроскопе «DMRXA» (Leika; Германия) с использованием компьютерной программы «ImageScope M» (Германия), совмещенной с микроскопом, при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.

После окрашивания срезов толуидиновым синим (рН = 2,0) (Biovitrum; Россия) проводили подсчет общего числа тучных клеток, числа клеток в разной степени дегрануляции: I степень (1–2 гранулы за пределами клетки), II степень (3–10 гранул за пределами клетки), III степень (больше 10 гранул за пределами клетки); средней яркости ТК. Вычисляли коэффициент дегрануляции ТК как соотношение числа дегранулированных ТК к общему числу мастоцитов в 10 случайных полях зрения препарата.

Оценку содержания матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в ожоговой ране проводили иммуногистохимическим методом с использованием специфичных поликлональных антител к MMP-9 крысы (host – rabbit, номер в каталоге — PAA553Ra01 «Cloud-Clone Corp.»; Китай) и поликлональных антител к VEGF крысы (host rabbit, каталожный номер PAA143Ra01 «Cloud-Clone Corp.»; Китай) и полимерной системы детекции «Rabbit HRP/DAB Detection IHC Detection Kit» (Abcam; Латвия) для обнаружения в срезах тканей иммуноглобулинов кролика, связанных с антигеном. В качестве субстрата/хромогена для визуализации полимерного комплекса в системе использовали диаминобензидин. Определяли относительную площадь MMP-9 и VEGF-положительно окрашенных структур, а также интегральный показатель содержания MMP-9 и VEGF

как произведение относительной площади окрашенных структур на интенсивность окраски в баллах; результат выражали в условных единицах (ед./мм²).

Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 («SPSS: An IBM Company»; США). Показатели представляли в виде медианы (Me) и квартилей (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскелла–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$ с учетом поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке параметров репарации ожоговой раны при ТТ (группа 2) обнаружено, что в динамике наблюдений на 10-е сутки наблюдения по сравнению с пятью сутками уменьшается абсолютная площадь раневого дефекта, что приводит к увеличению расчетных показателей — скорости эпителизации раны и доли уменьшения ее площади (табл. 1). На 20-е сутки эксперимента абсолютная площадь ожога уменьшается по сравнению с пятью и 10-ми сутками, относительная площадь ожога уменьшается по сравнению с пятью сутками наблюдения, что сопровождается увеличением скорости эпителизации раны и доли уменьшения ее площади по сравнению с пятью и 10-ми сутками. Площадь раневого дефекта от пятых к 20-м суткам экспериментальной ТТ уменьшилась по медиане на 35%.

Для изучения роли ТК в патофизиологии раневого процесса проводили оценку их представительства и активности по интенсивности дегрануляции в ожоговой ране (табл. 2). На 5-е сутки в ожоговой ране общее число ТК увеличивается на 43% по медиане, что может быть связано с активной миграцией базофилов из кровотока в очаг повреждения. Более чем в 3 раза возрастает число дегранулированных ТК: с I степени дегрануляции — в 3 раза, со II степени дегрануляции — в 4 раза, с III степени дегрануляции — в 10 раз, коэффициент дегрануляции возрастает в 3,5 раза по медиане относительно группы

Таблица 1. Показатели репарации ожоговой раны при экспериментальной ТТ и в условиях применения ДП с МТ (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 2 (ТТ + АсП)			Группа 3 (ТТ + ДП)			Группа 4 (ТТ + МТ ДП)		
	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
Площадь ожога, см ²	11,66	9,48	7,59	11,59	9,4	7,29	10,33	8,34	5,54
	(11,50; 11,94)	(9,28; 9,93)	(7,23; 7,84)	(11,00; 11,99)	(9,22; 9,81)	(7,01; 7,52)	(10,17; 10,56)	(8,19; 8,51)	(5,24; 5,88)
		*	* **				#	#	#
Относительная площадь, %	3,34	3,17	2,99	3,31	3,16	2,81	3,36	3,02	1,98
	(3,25; 3,39)	(3,10; 3,29)	(2,94-3,12)	(3,22; 3,42)	(3,10; 3,28)	(2,74-3,09)	(3,23; 3,42)	(2,91; 3,13)	(1,87; 2,23)
			*					#	#
Скорость эпителизации, % / сутки	0,89	1,9	2,26	0,91	2,01	3,06	1,33	6,57	14,3
	(0,86; 0,89)	(1,88; 1,95)	(2,14; 2,55)	(0,85; 0,92)	(1,93; 2,05)	(2,73; 3,15)	(1,29; 1,35)	(5,92; 6,93)	(13,38; 15,17)
		*	* **				#	#	#
Уменьшение площади раны, %	2,61	3,68	11,49	2,6	3,71	13,58	9,8	16,1	19,98
	(2,59; 2,64)	(3,53; 4,23)	(11,43; 11,64)	(2,58; 2,64)	(3,63; 4,31)	(12,93; 14,01)	(9,64; 10,08)	(14,62; 17,73)	(19,30; 20,38)
		*	* **				#	#	#

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2 на 5-е сутки; ** — с группой 2 на 10-е сутки; # — с группой 3 на соответствующие сутки.

Таблица 2. Функциональная характеристика тучных клеток в очаге повреждения при экспериментальной ТТ и в условиях применения ДП с МТ (Ме (Q_{25} ; Q_{75}))

Показатели	Группа 1 Интakтные (n = 7)	Группа 2 (ТТ + АСП)			Группа 3 (ТТ + ДП)			Группа 4 (ТТ + МТ ДП)		
		5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
Общее число клеток, ед./мм ²	166,87	238,38	286,05	441	226,46	286,06	464,84	250,3	369,49	166,87
	(160,91; 172,82)	(226,46; 238,38) *	(274,14; 286,05) *	(441,00; 452,92) * # # #	(202,62; 262,22)	(274,14; 297,97)	(452,92; 476,76)	(250,30; 250,30)	(357,57; 381,41)	(154,95; 178,78)
					*	*	*	* &	* &	&
Число дегра- нуированных клеток, ед./мм ²	35,76	178,78	166,87	214,54	178,78	166,87	226,46	202,62	190,7	83,43
	(35,76; 41,72)	(166,87; 178,78) *	(154,95; 178,78) *	(202,62; 214,54) * # # #	(154,95; 190,70)	(166,87; 178,78)	(226,46; 250,30)	(190,70; 214,54)	(178,78; 202,62)	(83,43; 83,43)
					*	*	*	* &	* &	* &
Число дегра- нуированных клеток I ст., ед./мм ²	23,84	83,43	59,59	178,78	83,43	59,6	178,78	143,03	154,95	59,6
	(11,92; 29,79)	(71,51; 83,43)	(47,68; 71,51)	(178,78; 178,78) * # # #	(71,51; 95,35)	(59,60; 71,51)	(178,78; 202,62)	(143,03; 154,95)	(131,11; 154,95)	(59,60; 59,60)
		*	* #		*	*	*	* &	* &	* &
Число дегра- нуированных клеток II ст., ед./мм ²	11,92	47,68	35,76	11,92	47,68	47,68	13,84	35,76	23,84	13,84
	(0; 17,88)	(35,76; 47,68)	(35,76; 47,68)	(11,92; 11,92)	(35,76; 47,68)	(23,84; 59,60)	(13,84; 13,84)	(35,76; 59,60)	(23,84; 39,20)	(11,92; 15,76)
		*	* #	# # #	*	*		*	* &	
Число дегра- нуированных клеток III ст., ед./мм ²	5,96	59,59	59,59	11,92	59,6	59,6	23,84	11,92	11,92	11,92
	(0; 11,92)	(47,68; 59,59)	(59,59; 83,43)	(11,92; 11,92)	(35,76; 59,60)	(47,68; 71,51)	(11,92; 23,84)	(11,92; 23,84)	(0,00; 11,92)	(0,00; 11,92)
		*	*	# # #	*	*	*	* &	* &	* &
Коэффициент дегрануляции клеток, у.е.	0,22	0,75	0,59	0,49	0,76	0,6	0,5	0,81	0,5	0,5
	(0,21; 0,26)	(0,73; 0,76)	(0,56; 0,63)	(0,49; 0,49)	(0,71; 0,77)	(0,56; 0,61)	(0,48; 0,53)	(0,81; 0,86)	(0,48; 0,53)	(0,47; 0,54)
		*	* #	* # # #	*	*	*	* &	* &	*
Яркость клеток средняя, у.е.	79,51	57,14	33,83	37,69	57,38	38	36,38	51,36	38,13	37,87
	(73,14; 83,76)	(51,36; 64,76)	(33,67; 39,22)	(37,69; 39,33)	(50,0; 58,42)	(33,26; 39,57)	(34,36; 37,9599)	(48,50; 59; 32)	(33,83; 40,78)	(32,50; 39,33)
		*	* #	* #	*	*	*	*	*	*

Примечание: * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1, # — с группой 2 на 5 сутки, ## — с группой 2 на 10 сутки, & — с группой 3 на соответствующие сутки.

интактных животных. Обращает на себя внимание факт, что многие ТК (преимущественно с III степени дегрануляции) имели вид «теней» за счет утраченной зернистости, что нашло отражение в статистически значимом уменьшении средней яркости ТК на 5-е сутки эксперимента. На 10-е сутки ТТ общее число ТК возрастало еще значительнее, чем на 5-е сутки и было на 72% по медиане больше, чем в группе интактных животных. На данном этапе число ТК с I и II степенями дегрануляции возрастало в 3 раза, с III степенью дегрануляции — в 10 раз, коэффициент дегрануляции ТК возрастал в 2,5 раза по медиане относительно группы интактных животных. Средняя яркость ТК уменьшалась в 2 раза. К 20-м суткам ТТ общее число ТК было максимальным за все время наблюдения: в 1,7 раза больше, чем у интактных, число дегранулированных клеток и клеток с I и III степенями дегрануляции, а также коэффициент дегрануляции значимо возрастали, а средняя яркость клеток уменьшалась относительно значений у интактных животных. В динамике ТТ максимальное общее число ТК, число дегранулированных ТК и число клеток с I степенью дегрануляции было максимальным на 20-е сутки, число клеток со II степенью дегрануляции — на 5-е сутки, с III степенью дегрануляции — на 5-е и 10-е сутки, максимальное значение коэффициента дегрануляции — на 5-е сутки, а минимальная яркость ТК — на 5-е и 10-е сутки. Итак, максимальное число ТК зарегистрировано на 20-е сутки ТТ, максимальная их дегрануляция — на 5-е и 10-е сутки ТТ.

Результаты оценки экспрессии MMP-9 и VEGF в ожоговой ране в динамике экспериментальной ТТ представлены на рисунке. На 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ в ожоговой ране значимо повышается экспрессия VEGF, на 10-е и 20-е сутки ТТ значимо повышается экспрессия MMP-9. В динамике эксперимента экспрессия в ожоговой ране VEGF на 10-е сутки была выше, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки — ниже, чем на 10-е сутки; экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки была выше, чем на 5-е сутки ТТ. Таким образом, максимальная экспрессия VEGF зафиксирована на 10-е сутки, MMP-9 — на 10-е и 20-е сутки экспериментальной ТТ. ТК могут быть источником MMP-9 и VEGF — факторов, обеспечивающих эффективную репарацию в очаге ТТ. Нами проведена корреляция между коэффициентом дегрануляции тучных клеток и экспрессией MMP-9 и VEGF в ожоговой ране (табл. 3). На 10-е сутки ТТ выявлена прямая средней силы значимая связь, на 20-е сутки — прямая значимая слабая связь коэффициента дегрануляции ТК с экспрессией MMP-9, на 10-е сутки — прямая значимая слабая связь коэффициента дегрануляции ТК с экспрессией VEGF. Полагаем, что активность ТК и экспрессия в очаге термического повреждения MMP-9 и VEGF имеют значение в заживлении ожоговой раны, а также системных проявлениях после ТТ. С использованием корреляционного анализа между абсолютной площадью раневого дефекта кожи и коэффициентом дегрануляции ТК установлена обратная слабая связь на 5-е сутки, средней силы обратная связь — на 10-е и 20-е сутки, с экспрессией

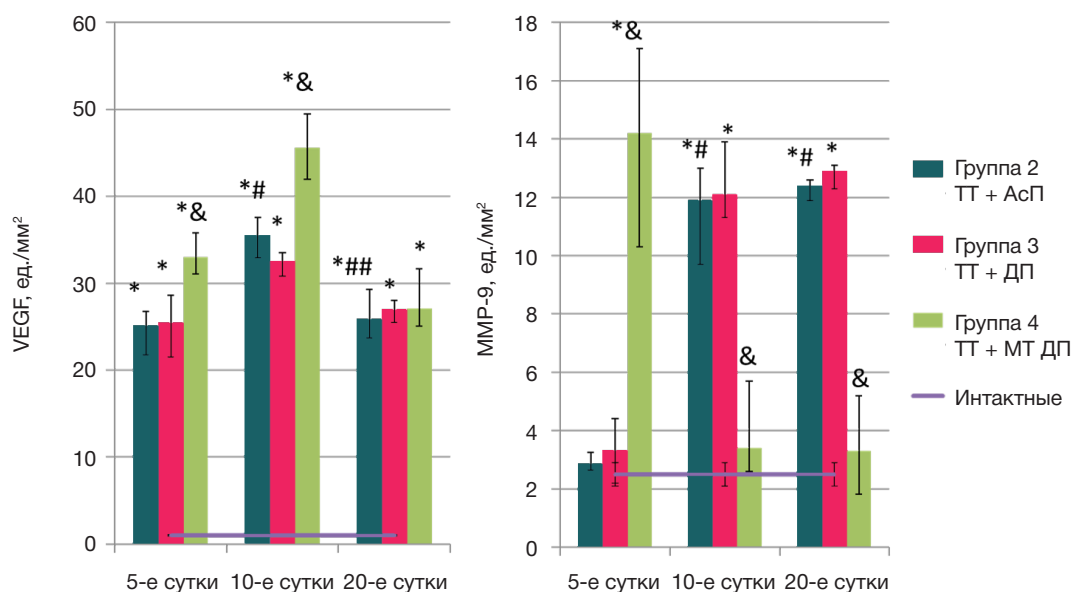


Рисунок. Влияние мелатонина в составе дермальной пленки на иммуногистохимические показатели в ожоговой ране при экспериментальной ТТ (Me (Q₂₅; Q₇₅)). * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; # — с группой 2 на 5-е сутки; ## — с группой 2 на 10-е сутки; & — с группой 3 на соответствующие сутки

MMP-9 — обратная слабая связь на 10-е сутки и средней силы обратная связь на 20-е сутки (табл. 4). На 10-е сутки выявлена обратная значимая слабая связь абсолютной площади раневого дефекта кожи с экспрессией VEGF, не обнаружено значимой корреляции между абсолютной площадью раневого дефекта и экспрессией VEGF на 5-е и 20-е сутки, экспрессией MMP-9 — на 5-е сутки.

Оценку эффективности локального применения МТ в составе ДП (группа 4) проводили при сравнении показателей в группах животных с ТТ в условиях ежедневного в течение 5 дней применения ДП с МТ и животных с ТТ в условиях ежедневного применения в течение 5 дней ДП-матрицы (группа 3). Применение МТ при ТТ приводит к статистически значимому уменьшению площади ожоговой раны в абсолютных величинах на 5-е, 10-е и 20-е сутки, в относительных величинах — на 10-е и 20-е сутки ТТ (табл. 1). На 5-е, 10-е и 20-е сутки наблюдения увеличились скорость эпителизации раны и относительное уменьшение площади раны. На 5-е сутки ТТ абсолютная площадь ожоговой поверхности уменьшилась на 12,2% по медиане, максимальные изменения зафиксированы на 20-е сутки, когда абсолютная площадь раневого дефекта уменьшилась на 31,6%, а скорость эпителизации возросла в 4,7 раза по медиане относительно группы животных с ТТ и применением ДП-матрицы. В динамике экспериментальной ТТ на 10-е и 20-е сутки по сравнению с 5-ми сутками и на 20-е сутки по сравнению с 10-ми сутками значимо ($p < 0,01$) уменьшилась абсолютная площадь ожога, увеличились скорость эпителизации раны и относительное уменьшение площади раны. Отметим, что от 5-х к 20-м суткам ТТ абсолютная площадь ожоговой раны уменьшилась по медиане на 46% против 37% в группе с ТТ и применением ДП-матрицы.

МТ в составе ДП изменяет представительство и функциональную активность ТК в очаге повреждения

при экспериментальной ТТ (табл. 2). Так, на 5-е сутки ТТ (группа 4) в ожоговой ране значительно увеличивается общее содержание ТК относительно группы животных с ТТ и применением ДП-матрицы. Кроме этого, на 5-е сутки ТТ возрастает общее число дегранулированных ТК, число дегранулированных ТК I степени, а также значение коэффициента дегрануляции, снижается число дегранулированных ТК II и III степеней, средняя яркость клеток значимо не изменяется. На 10-е сутки ТТ в условиях локального применения МТ зафиксировано статистически значимое увеличение в ожоговой ране общего числа ТК, числа дегранулированных ТК, числа дегранулированных ТК I степени, но снижение числа дегранулированных ТК II и III степеней, коэффициента дегрануляции клеток. Наконец, на 20-е сутки наблюдений снижается общее число ТК, число дегранулированных ТК I и III степеней. Итак, в условиях локального применения МТ при ТТ увеличение числа и активация дегрануляции ТК на 5-е и 10-е сутки, сменяется снижением их представительства и активности на 20-е сутки наблюдений. Интегральные показатели активности ТК — коэффициент дегрануляции и средняя яркость клеток — был значимо соответственно выше и ниже по сравнению с интактными животными во все сроки наблюдения.

При оценке экспрессии VEGF и MMP-9 в ожоговой ране при ТТ в условиях локального применения МТ (группа 4) обнаружено, что на 5-е сутки эксперимента экспрессия в ожоговой ране MMP-9 и VEGF значимо увеличивается, на 10-е сутки экспрессия MMP-9 снижается, VEGF — увеличивается, на 20-е сутки ТТ экспрессия MMP-9 снижается, VEGF — значимо не изменяется. В динамике ТТ экспрессия VEGF на 10-е сутки была значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки — ниже, чем на 5-е и 10-е сутки; экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки была ниже ($p < 0,01$), чем на 5-е сутки ТТ. Отметим, что

Таблица 3. Корреляция между коэффициентом дегрануляции тучных клеток и иммуногистохимическими показателями в ожоговой ране при ТТ

Показатели	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
VEGF, ед./мм²	0,26	0,37	0,31
MMP-9, ед./мм²	0,23	0,64	0,37

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи.

Таблица 4. Корреляция между абсолютной площадью ожоговой раны и экспрессией VEGF и MMP-9, коэффициентом дегрануляции тучных клеток в очаге повреждения при экспериментальной ТТ

Показатели	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
VEGF, ед./мм ²	– 0,13	– 0,37	0,17
MMP-9, ед./мм ²	– 0,31	– 0,47	– 0,54
Коэффициент дегрануляции тучных клеток, у.е.	– 0,37	– 0,51	– 0,64

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи.

экспрессия VEGF на 5-е, 10-е и 20-е сутки, а MMP-9 на 5-е сутки была значимо выше по сравнению с интактными животными, экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки не отличалась от значений в группе интактных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полагаем, что обнаруженные нами закономерности изменения показателей репарации ожоговой раны в динамике экспериментальной ТТ связаны с участием ТК в реализации ключевых событий раневого процесса. Так, в первые 5 суток, когда преобладают альтеративные (вторичная альтерация) и сосудисто-экссудативные, лейкоцитарные реакции, дегрануляция ТК и высвобождение преформированных медиаторов, в частности, гистамина, TNF α , IL1 β , IL6 и др., приводят к артериальной и венозной гиперемии, экссудации, активации фагоцитов. Протеаза-4 из ТК выступает в роли хемоаттрактанта для лейкоцитов в воспалительную фазу раневого процесса. Позднее на 10–15-е сутки эксперимента высвобождение из ТК фактора роста кератиноцитов и VEGF активирует фибробласты, синтез коллагена, зачастую избыточный с образованием гипертрофических рубцов. Увеличение синтеза коллагена, в том числе, обусловлено активацией химазой из мастоцитов сигнального пути TGF β 1/Smads и пролиферацией фибробластов [17]. Серотонин, ключевым источником которого в очаге ТТ являются ТК, снижает апоптоз, повышает выживаемость и миграцию фибробластов и кератиноцитов, участвуя таким образом в регуляции заживления ожоговой раны, а применение блокаторов высвобождения эндогенного серотонина приводит к замедлению эпителизации [18].

Интенсивность экспрессии MMP-9 в ожоговой ране и сывороточный уровень MMP-9 после ТТ являются маркерами риска синдрома системного воспалительного ответа (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) и неблагоприятного исхода при ожогах [19]. Основным источником MMP-9 являются активированные GM-CSF, IL8, TNF α и другими цитокинами нейтрофилы на ранних этапах после ТТ, а также другие клетки, включая ТК. MMP-9 отражает количественное представительство и активность преимущественно нейтрофилов и макрофагов в очаге повреждения. MMP-9 участвует в деградации внеклеточного матрикса, особенно коллагенов IV и V типов, повышении сосудистой проницаемости в очаге, хемотаксисе нейтрофилов, активации и инактивации аутокоидов и готовит плацдарм для репаративных реакций, успешной эпителизации, ингибируется тканевым ингибитором протеиназ-1 альфа-1-антихимотрипсином [20]. Особое значение имеет MMP-9 при хроническом течении раневого процесса, когда избыточная экспрессия MMP-9 приводит к разрушению внеклеточного матрикса, ингибированию активности факторов роста и ограничению репаративных реакций. Ряд исследователей приводят данные о том, что нокаутирование гена или инактивация MMP-9 ускоряет заживление ран [21]. Как правило, невысокая активность

MMP-9 при остром раневом процессе обусловлена ее блокадой альфа-1-антихимотрипсином.

Семейство VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), прежде всего VEGF-A, в очаге ТТ продуцируется кератиноцитами, ТК, моноцитами/макрофагами, активированными фибробластами; рецепторы для VEGF-A обнаружены на эндотелиоцитах, фибробластах и др. клетках [22]. GM-CSF увеличивает синтез VEGF в ране, а также напрямую повышает активность кератиноцитов и фибробластов [23]. Показано, что VEGF участвует не только в регуляции ангиогенеза, но и в синтезе коллагена и других компонентов соединительной ткани, а также в формировании рубца, а блокада эффектов VEGF ограничивает объем рубцовой ткани, образование гипертрофических и келлоидных рубцов после ТТ, что открывает дополнительные терапевтические возможности. Однако механизм данного эффекта VEGF до конца не ясен и может быть связан с прямой активацией миграции, пролиферации и синтеза коллагена фибробластами и/или косвенной активацией эндотелиоцитов, нейтрофилов, макрофагов и ТК с продукцией профиброгенных медиаторов (цитокинов, факторов роста) [24]. В частности, терапевтический эффект интерферона-альфа2b при гипертрофических и келлоидных рубцах связан со снижением эффектов VEGF и ангиогенеза, в экспериментах на животных продемонстрирован эффект бевацизумаба — гуманизированного антитела против VEGF при гипертрофическом рубцевании [25]. Весьма показательны обнаруженные нами корреляции между исследуемыми показателями при ТТ: площади ожоговой раны с содержанием в ней MMP-9 и VEGF (обратная связь), коэффициентом дегрануляции ТК (прямая связь), а также коэффициента дегрануляции ТК с содержанием в ожоговой ране MMP-9 и VEGF (прямая связь). Это позволяет предположить, что площадь ожоговой раны при экспериментальной ТТ сокращается по мере увеличения содержания в ней MMP-9 и VEGF, а содержание MMP-9 и VEGF в ожоговой ране нарастает по мере дегрануляции ТК.

Полагаем, что обнаруженные нами эффекты МТ в составе ДП в очаге ТТ обусловлены его плейотропными свойствами. Прежде всего, антиоксидантный эффект МТ может ограничивать зону вторичного повреждения при ТТ, в том числе активацию и привлечение в очаг повреждения нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов. Ранее нами было продемонстрировано, что применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ ограничивает прирост содержания продуктов окислительной деградации липидов и белков в ожоговой ране, что связано с ускорением ее заживления [26]. Модуляция реакций воспалительного процесса под влиянием МТ может быть связана со снижением выраженности альтерации и сосудисто-экссудативных реакций, продукции цитокинов и других аутокоидов, что приведет к изменениям не только в очаге ТТ, но и изменению острофазового ответа в целом. Установлено, что применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ ограничивает гибель лимфоцитов в крови [27].

Нельзя исключить прямое влияние МТ на продукцию и активность факторов, участвующих в репарации. Так, МТ в эксперименте *in vitro* на культуре эндотелиальных клеток церебральных сосудов снижает проницаемость активированных IL1 β клеток путем ингибирования MMP-9 [28]. Показана способность МТ напрямую связывать MMP-9. В частности, МТ связывает избыточное число MMP-9 при COVID-19-опосредованных иммунных реакциях, плоскоклеточном раке полости рта [29]. МТ снижает избыточную экспрессию и активность MMP-9 путем регуляции сигнальных путей NOTCH3/NF- κ B, TLR4/ NF- κ B [30]. В экспериментах *in vitro* с сывороткой обожженных крыс МТ снижает увеличенную проницаемость эндотелиоцитов за счет ингибирования MMP-9 и антиоксидантного действия [31]. МТ оказывает протекторное действие от повреждения химическими агентами ТК, что может влиять на их секреторную активность [32]. Кроме того, эффект МТ на ТК может различаться в зависимости от типа рецептора, с которым он взаимодействует (M1 или M2). Таким образом, неоднозначный эффект локального применения МТ при ТТ на содержание MMP-9 в ожоговой ране может быть связан на 5-е сутки с протекцией ТК от действия повреждающих факторов в очаге ТТ, и увеличение секреции ТК MMP-9, в свою очередь, может обеспечивать более эффективное и быстрое очищение раны от клеточного детрита, раннюю подготовку для реализации репаративных реакций. Позднее, на 10-е и 20-е сутки ТТ снижение экспрессии MMP-9 в очаге может быть обусловлено прямым или опосредованным ингибированием и снижением синтеза данной протеиназы под влиянием МТ, что приводит к прекращению деструктивных реакций в ожоговой ране, активации пролиферации и дифференцировки клеток под влиянием факторов роста и, как следствие, ускорению восстановления поврежденных тканей. В связи с этим целесообразность увеличения экспрессии VEGF в ожоговой ране на 5-е и 10-е сутки ТТ в условиях локального применения МТ вполне обоснована.

Сведения о влиянии МТ на синтез и экспрессию VEGF крайне неоднозначны. С одной стороны, МТ ингибирует синтез VEGF в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, рака простаты и других злокачественных опухолей, оказывая антиангиогенное действие и препятствуя росту опухоли [33]. Это связано с блокадой стабилизации комплекса STAT3 и HIF-1 α и подконтрольных им генов, в том числе VEGF, а также рецептора VEGFR2 [34]. Другие исследователи показали, что МТ не изменяет экспрессию VEGF в очаге ишемического повреждения [35]. Однако последние данные свидетельствуют о мультифункциональном регуляторном характере влияния МТ на ангиогенез в зависимости от дозы (концентрации в тканях) и исходного состояния ткани. При репарации костной ткани после перелома, заживлении кожи после механических и химических повреждений, экспериментальных язвенных дефектах слизистой желудка, экспериментальной ишемии миокарда,

головного мозга применение МТ приводит к усилению ангиогенеза прямо или опосредованно [33]. МТ повышает ангиогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток в очаге повреждения за счет синтеза VEGF по пути Erk1/2 [36]. Кроме этого, МТ самостоятельно стимулирует синтез тромбоцитарного фактора роста — известного стимулятора ангиогенеза и не только увеличивает ангиогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток, но и делает их устойчивыми к ишемическому стрессу.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило выполнить поставленную цель и установить, что в динамике экспериментальной ТТ от 5-х к 20-м суткам абсолютная площадь ожоговой раны уменьшается на 35%, увеличивается скорость ее эпителизации, в очаге термического повреждения увеличивается число и изменяется функциональная активность ТК: снижается гранулярное насыщение, усиливается их дегрануляция; увеличивается экспрессия MMP-9 и VEGF. Выявлена обратная связь площади ожоговой раны с экспрессией MMP-9 и VEGF, коэффициентом дегрануляции ТК в очаге ТТ; экспрессия MMP-9 и VEGF в ожоговой ране нарастает по мере увеличения дегрануляции ТК. Продemonстрировано, что применение МТ в составе оригинальной ДП при экспериментальной ТТ приводит на 5-е, 10-е и 20-е сутки наблюдения к уменьшению площади ожоговой раны, увеличению скорости ее эпителизации, увеличению в ожоговой ране общего числа и дегрануляции ТК на 5-е и 10-е сутки, снижению общего числа и дегрануляции ТК на 20-е сутки ТТ, увеличению экспрессии MMP-9 на 5-е сутки, экспрессии VEGF на 5-е и 10-е сутки, снижению экспрессии MMP-9 на 10-е и 20-е сутки ТТ. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли изменений активности ТК, экспрессии MMP-9 и VEGF в патогенезе ТТ, служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению роли ТК в коже в клинических условиях у больных с ожогами для обозначения их секреторных продуктов в качестве диагностических маркеров и предикторов осложнений, а также показателей эффективности проводимой терапии. Установленный при ТТ на доклиническом этапе стимулирующий репарацию эффект МТ в составе ДП связан с изменением числа и активности ТК, экспрессии MMP-9 и VEGF в ожоговой ране и является предпосылкой для дальнейшего изучения механизма действия и эффективности применения МТ в клинических условиях при ТТ. Принимая во внимание единство многих механизмов, обеспечивающих заживление ран, независимо от их этиологии, полагаем, что полученные данные о стимулирующем репарацию при ТТ эффекте МТ в составе оригинальной ДП за счет изменения активности ТК и содержания в ожоговой ране MMP-9 и VEGF, можно экстраполировать на раны другого происхождения.

Литература

1. WHO Fact Sheet: Burns. [(accessed on 6 March 2018)]; Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
2. Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 123: 3–17. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.018.
3. Saavedra PA, deBrito ES, Areda CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma*. 2019 Oct 15; 9 (5): 88–98.
4. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J Immunol Res*. 2019 Feb 28; 2019: 8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.

5. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 12; 20 (8). pii: E1811. DOI: 10.3390/ijms20081811.
6. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma*. 2019 Jan 25; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.
7. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 202–47.
8. Осиков М. В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 3: 326–9.
9. Tordjman S, Chokron S2, Delorme R, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Apr; 15 (3): 434–43.
10. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, et al. The impact of melatonin in research. *Molecules*. 2016 Feb 20; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
11. Lopes RCV, Assis Martins J, Ribeiro de Souza T, de Castro Nunes Rincon G, Pacheco Miguel M, Borges de Menezes L, Correa Amaral A. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 1; 162: 1465–75. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.027.
12. Kaczmarek-Szczepańska B, Ostrowska J, Kozłowska J, Szota Z, Brożyna AA, Dreier R, et al. Evaluation of polymeric matrix loaded with melatonin for wound dressing. *Int J Mol Sci*. 2021 May 26; 22 (11): 5658. DOI: 10.3390/ijms22115658.
13. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido J, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 8; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
14. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol*. 2017 Sep; 26 (9): 751–9.
15. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep*. 2017 Apr 6; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
16. Агеева А. А., Осиков М. В., Симонян Е. В., Топорев Т. А., Потехина Е. А., авторы. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, патентообладатель. Средство в виде пленки лекарственной, содержащей мелатонин, для лечения термической травмы патент № 2 751 048 07.07.2021.
17. Chen H, Xu Y, Yang G, Zhang Q, Huang X, Yu L, et al. X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017 Nov; 14 (5): 4438–42.
18. Sadiq A, Shah A, Jeschke MG, et al. The Role of Serotonin during Skin Healing in Post-Thermal Injury. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 29; 19(4). pii: E1034. DOI: 10.3390/ijms19041034.
19. Nagy B, Szélig L, Rendei S, et al. Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care*. 2015; 30 (1): 162–6. DOI: 10.1016/j.jcrc.2014.07.008.
20. Lang TC, Zhao R, Kim A, et al. A Critical Update of the Assessment and Acute Management of Patients with Severe Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019; 8 (12): 607–33. DOI:10.1089/wound.2019.0963.
21. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2 (7): 379–88. DOI: 10.1089/wound.2012.0383.
22. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3: 647–61.
23. Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma*. 2019 Apr 5; 7: 10. DOI: 10.1186/s41038-019-0148-1.
24. Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019 Dec 1; 8 (12): 671–8.
25. Kwak DH, Bae TH, Kim WS, Kim HK. Anti-vascular endothelial growth factor (Bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model. *Arch Plast Surg*. 2016; 43: 491–7.
26. Osikov MV, Simonyan EV, Ageeva AA, Ageev YI, Sinitsky AI, Fedosov AA. Local antioxidant effect of original dermal film with melatonin in thermal injury. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020; 6: 104–12.
27. Осиков М. В., Симонян Е. В., Агеева А. А., Агеев Ю. И. Мелатонин в составе дермальной пленки ограничивает гибель лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме. *Медицинская иммунология*. 2021; 23 (2): 389–94.
28. Alluri H, Wilson RL, Anasooya Shaji C, et al. Melatonin Preserves Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability via Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0154427. DOI: 10.1371/journal.pone.0154427.
29. Hazra S, Chaudhuri AG, Tiwary BK, Chakrabarti N. Matrix metalloproteinase 9 as a host protein target of chloroquine and melatonin for immunoregulation in COVID-19: A network-based meta-analysis. *Life Sci*. 2020; 257: 118096. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118096.
30. Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11 (23): 11391–415. DOI: 10.18632/aging.102537.
31. Wiggins-Dohlvik K, Han MS, Stagg HW, Alluri H, Shaji CA, Oakley RP, et al. Melatonin inhibits thermal injury-induced hyperpermeability in microvascular endothelial cells. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014; 77: 899–905.
32. Maldonado MD, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol*. 2013 Sep 15; 262 (1–2): 62–5.
33. Rahbarghazi A, Siahkouhian M, Rahbarghazi R, et al. Role of melatonin in the angiogenesis potential; highlights on the cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond)*. 2021; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12950-021-00269-5.
34. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem*. 2019 Dec; 462 (1–2): 133–55.
35. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, et al. Melatonin protects ADSC s from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2015; 19 (9): 2232–43.
36. Lee JH, Han YS, Lee SH. Melatonin-Induced PGC-1 α Improves Angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Hindlimb Ischemia. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020; 28 (3): 240–9. DOI: 10.4062/biomolther.2019.131.

References

1. WHO Fact Sheet: Burns. [accessed on 6 March 2018]; Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
2. Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 123: 3–17. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.018.
3. Saavedra PA, de Brito ES, Arede CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma*. 2019 Oct 15; 9 (5): 88–98.
4. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J Immunol Res*. 2019 Feb 28; 2019: 8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
5. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 12; 20 (8). pii: E1811. DOI: 10.3390/ijms20081811.
6. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma*. 2019 Jan 25; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.

- 2019 Jan 25; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.6
7. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 202–4.7
8. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev Yul. Vliyanie jeritropojetina na apoptoz limfocitov pri jeksperimental'noj hronicheskoj pochechnoj nedostatochnosti. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015; 3: 326–9. Russian.
9. Tordjman S, Chokron S2, Delorme R, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2017 Apr; 15 (3): 434–43.
10. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, et al. The impact of melatonin in research. *Molecules*. 2016 Feb 20; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
11. Lopes RCV, Assis Martins J, Ribeiro de Souza T, de Castro Nunes Rincon G, Pacheco Miguel M, Borges de Menezes L, Correa Amaral A. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 1; 162: 1465–75. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.027.
12. Kaczmarek-Szczepańska B, Ostrowska J, Kozłowska J, Szota Z, Brożyna AA, Dreier R, et al. Evaluation of polymeric matrix loaded with melatonin for wound dressing. *Int J Mol Sci*. 2021 May 26; 22 (11): 5658. DOI: 10.3390/ijms22115658.
13. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido J, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 8; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
14. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol*. 2017 Sep; 26 (9): 751–9.
15. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep*. 2017 Apr 6; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
16. Ageeva AA, Osikov MV, Simonjan EV, Toporec TA, Potehina EA, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «Juzhno-Ural'skij gosudarstvennyj medicinskij universitet» Ministerstva zdoravoohraneniya Rossijskoj Federacii, patentoobladatel'. Sredstvo v vide plenki lekarstvennoj, soderzhashhej melatonin, dlja lechenija termicheskoj travmy patent # 2 751 048 07.07.2021. Russian.
17. Chen H, Xu Y, Yang G, Zhang Q, Huang X, Yu L, et al. X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017 Nov; 14 (5): 4438–42.
18. Sadiq A, Shah A, Jeschke MG, et al. The Role of Serotonin during Skin Healing in Post-Thermal Injury. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 29; 19(4). pii: E1034. DOI: 10.3390/ijms19041034. 12.
19. Nagy B, Szélig L, Rendeki S, et al. Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care*. 2015; 30 (1): 162–6. DOI: 10.1016/j.jcrc.2014.07.008.
20. Lang TC, Zhao R, Kim A, et al. A Critical Update of the Assessment and Acute Management of Patients with Severe Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019; 8 (12): 607–33. DOI:10.1089/wound.2019.0963.
21. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2 (7): 379–88. DOI: 10.1089/wound.2012.0383
22. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3: 647–61.
23. Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma*. 2019 Apr 5; 7: 10. DOI: 10.1186/s41038-019-0148-1.
24. Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019 Dec 1; 8 (12): 671–8.
25. Kwak DH, Bae TH, Kim WS, Kim HK. Anti-vascular endothelial growth factor (Bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model. *Arch Plast Surg*. 2016; 43: 491–7.
26. Osikov MV, Simonyan EV, Ageeva AA, Ageev YI, Sinitsky AI, Fedosov AA. Local antioxidant effect of original dermal film with melatonin in thermal injury. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020; 6: 104–12.
27. Osikov MV, Simonjan EV, Ageeva AA, Ageev Yul. Melatonin v sostave dermal'noj plenki ogranichivaet gibel' limfocitov v krovi pri jeksperimental'noj termicheskoj travme. *Medicinskaja immunologija*. 2021; 23 (2): 389–94. Russian.
28. Alluri H, Wilson RL, Anasooya Shaji C, et al. Melatonin Preserves Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability via Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0154427. DOI: 10.1371/journal.pone.0154427.
29. Hazra S, Chaudhuri AG, Tiwary BK, Chakrabarti N. Matrix metalloproteinase 9 as a host protein target of chloroquine and melatonin for immunoregulation in COVID-19: A network-based meta-analysis. *Life Sci*. 2020; 257: 118096. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118096.
30. Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11 (23): 11391–415. DOI: 10.18632/aging.102537.
31. Wiggins-Dohlvik K, Han MS, Stagg HW, Alluri H, Shaji CA, Oakley RP, et al. Melatonin inhibits thermal injury-induced hyperpermeability in microvascular endothelial cells. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014; 77: 899–905.
32. Maldonado MD, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol*. 2013 Sep 15; 262 (1–2): 62–5.
33. Rahbarghazi A, Siahkhouhian M, Rahbarghazi R, et al. Role of melatonin in the angiogenesis potential; highlights on the cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond)*. 2021; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12950-021-00269-5.
34. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem*. 2019 Dec; 462 (1–2): 133–55.
35. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, et al. Melatonin protects ADSC s from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2015; 19 (9): 2232–43.
36. Lee JH, Han YS, Lee SH. Melatonin-Induced PGC-1 α Improves Angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Hindlimb Ischemia. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020; 28 (3): 240–9. DOI: 10.4062/biomolther.2019.131.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГИБРИДНОЙ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ АЛЛОПЛАСТИКИ ПРИ ПАРАКОЛОСТОМИЧЕСКИХ ГРЫЖАХ

Н. В. Мальгина^{1,2}, Т. Ю. Долгина^{1,2} ✉, А. Д. Епифанова³, Г. В. Родоман^{1,2}¹ Городская клиническая больница № 24, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

Современный уровень развития медицины позволил значительно сократить частоту операций, сопровождающихся формированием концевых кишечных стом. Такие операции предпринимают для спасения жизни, когда невозможно поступить другим образом. К сожалению, из-за роста числа такого рода заболеваний число стомированных пациентов во всем мире увеличивается. Наличие стомы само по себе приводит человека к социальной дезадаптации, а осложненная стома стойко снижает качество жизни и трудоспособность. Целью исследования было оценить эффективность применения операции гибридной интраперитонеальной аллопластики параколостомических грыж при помощи оценки качества жизни пациентов на основании опросника EUROQOL 5D-5L. Включенные в исследование 60 пациентов с параколостомическими грыжами были разделены на две группы по 30 человек в каждой. Группа исследования (мужчины 10 (33%), женщины 20 (67%)) и группа сравнения (мужчины 11 (37%), женщины 19 (63%)) были сопоставимы по полу ($p = 0,787$) и возрасту (66,5 (62,2; 72,0) лет и 65,0 (61,25; 71,75), соответственно; $p = 0,246$). Пациентам первой группы была выполнена операция Sugarbaker, второй — гибридная интраперитонеальная аллопластика. Оценку качества жизни пациентов до операции, через год и через два года после нее осуществляли при помощи опросника EUROQOL 5D-5L. Показана эффективность гибридной интраперитонеальной аллопластики до операции и в раннем и позднем послеоперационных периодах. На основании значительного улучшения качества жизни пациентов после гибридной интраперитонеальной аллопластики можно сделать вывод о том, что эта операция является эффективным методом хирургического лечения пациентов с параколостомическими грыжами.

Ключевые слова: параколостомическая грыжа, качество жизни, опросник, хирургическое лечение**Вклад авторов:** Г. В. Родоман — утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Н. В. Мальгина — концепция и дизайн работы; Т. Ю. Долгина — сбор данных, написание текста статьи; А. Д. Епифанова — статистический анализ.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол заседания № 160 от 19 декабря 2016 г.)✉ **Для корреспонденции:** Тамара Юрьевна Долгина
ул. Писцовая, д. 10, г. Москва, 127015; dolgina-tamara@yandex.ru**Статья получена:** 10.07.2021 **Статья принята к печати:** 25.07.2021 **Опубликована онлайн:** 17.08.2021**DOI:** 10.24075/vrgmu.2021.037

EFFECTIVENESS OF HYBRID INTRAPERITONEAL MESH REPAIR FOR PARACOLOSTOMY HERNIA

Malgina NV^{1,2}, Dolgina TYu^{1,2} ✉, Epifanova AD³, Rodoman GV^{1,2}¹ City Clinical Hospital № 24, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Due to advances in medical science, the frequency of surgical interventions that once ended in end-stoma formation has decreased significantly. An ostomy is a life-saving surgery performed when there are no other options. Unfortunately, the number of patients with life-threatening conditions requiring colostomy or ileostomy is growing. A stoma in itself is a cause of social alienation; stoma-associated complications reduce the quality of life and debilitate the patient. The aim of this study was to assess the effectiveness of hybrid intraperitoneal mesh repair of paracolostomy hernia using a modified EUROQOL 5D-5L questionnaire. Sixty patients with paracolostomy hernias included in the study were divided in 2 groups (30 persons per group). The experimental group (10 (33%) men and 20 (67%) women) and the control group (11 (37%) men and 19 (63%) women) were comparable in terms of sex ($p = 0,787$) and age (66.5 (62.2; 72.0) years vs. 65.0 (61.25; 71.75) years, respectively; $p = 0,246$). Patients included in the control group underwent a classic Sugarbaker procedure; the experimental group underwent hybrid intraperitoneal mesh repair. The quality of life of the patients was evaluated before surgery and then 1 and 2 years after surgery using a modified EUROQOL 5D-5L questionnaire. Hybrid intraperitoneal mesh repair proved to be effective in the early and late postoperative periods. Based on the significant improvement of the patients' quality of life after hybrid intraperitoneal mesh repair, we conclude that this technique is an effective surgical treatment for paracolostomy hernias.

Keywords: paracolostomy hernia, quality of life, questionnaire, surgery**Author contribution:** Rodoman GV — the final version of the manuscript; Malgina NV — study concept and design; Dolgina TYu — data acquisition, manuscript draft; Epifanova AD — statistical analysis.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 160 dated December 19, 2016)✉ **Correspondence should be addressed:** Tamara Yu. Dolgina
Pistovaya, 10, 127015, Moscow; dolgina-tamara@yandex.ru**Received:** 10.07.2021 **Accepted:** 25.07.2021 **Published online:** 17.08.2021**DOI:** 10.24075/brsmu.2021.037

Параколостомическая грыжа относится к наиболее часто возникающим поздним осложнениям кишечных стом. Формирование кишечных стом осложняется гернизацией в 28–100% наблюдений [1–6]. Кишечная стома является

серьезной психологической проблемой для пациента, а наличие параколостомической грыжи значительно снижает качество жизни. Осложненной стоме сопутствуют болевой синдром при эпизодах ущемления, хроническое

нарушение эвакуации кишечного содержимого, трудности при креплении калоприемника; немаловажно, что она доставляет эстетический дискомфорт [6–9].

Проблема хирургического лечения параколомостомических грыж в настоящий момент до конца не решена [10]. Несмотря на большое число способов их оперативного лечения, остается высокой частота рецидивов заболевания (14–50%), а повторные операции сопровождаются ее увеличением до 20–64% [11–13]. Пластические операции с использованием местных тканей сопровождаются крайне высокой частотой рецидивов параколомостомических грыж (46–100%) [14]. Аллопластика из местного доступа предполагает использование сетчатых аллотрансплантатов в условно контаминированной ране (вблизи стомы), что сопряжено с высоким риском возникновения гнойных осложнений (27,6%) и, как следствие, влечет за собой удаление сетчатых аллотрансплантатов в ближайшем послеоперационном периоде с последующим развитием рецидива параколомостомической грыжи. Лапаротомия с транспозицией стомы и переводом ее в забрюшинную стому характеризуется крайне высокой частотой рецидивирования (75–100%). На сегодняшний день описанные методики представляют лишь исторический интерес [10]. Наименьшая частота рецидивирования характерна для операции Sugarbaker и ее вариации. В среднем она составляет 15% [15; 16]. Значимая частота рецидива заболевания побуждает исследователей к поиску новых технологий оперативного пособия при данной патологии. Нами был предложен новый способ хирургического лечения параколомостомических грыж — гибридная интраперитонеальная аллопластика [17].

Целью данного исследования было оценить эффективность гибридной интраперитонеальной аллопластики параколомостомических грыж при помощи оценки качества жизни пациентов на основании модифицированного опросника EUROQOL 5D-5L.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 60 пациентов с параколомостомическими грыжами, оперированных в период с 2013 по 2019 г. в Городской клинической больнице № 24 города Москвы. Проведено проспективное одноцентровое контролируемое сплошное пилотное клиническое исследование эффективности гибридной интраперитонеальной аллопластики при параколомостомических грыжах. Объем выборки предварительно не рассчитывали. Объектом исследования были пациенты, для которых кишечная стома является пожизненной. Объем ранее перенесенной инвалидизирующей операции зависел от характера патологии прямой кишки: брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки по поводу рака анального канала; брюшно-анальная резекция при раке нижнеампулярного отдела прямой кишки; колостомия вследствие деструкции анального сфинктера травматического генеза [9].

Отбор пациентов для данного исследования проводили на основании критериев включения и исключения пациентов. Критерии включения пациентов в исследование: наличие инструментально подтвержденной параколомостомической грыжи, обуславливающей снижение качества жизни; наличие указаний на эпизоды ущемления, сопровождающиеся характерной клинической симптоматикой, а также документированных

случаев кишечной непроходимости; наличие подписанного информированного согласия пациента на выполнение хирургического вмешательства и включения его в клиническое исследование с последующим мониторингом не менее двух лет; активное желание пациента следовать рекомендациям, полученным от врача. Критерии исключения: аллергические реакции на йодсодержащие препараты; риск кардиальных осложнений IV–V степени по шкале МНОАП [18]; IV степень риска развития кардиальных осложнений по индексу Ли [19]; хроническая обструктивная болезнь легких тяжелого течения со снижением жизненной емкости легких до 70%; психические заболевания, деградация когнитивных функций; прогрессирование и генерализация онкологического процесса; возможность выполнения реконструктивно-восстановительной операции.

Пациенты, включенные в исследование, были распределены на две группы. Группу сравнения составили 30 пациентов с параколомостомической грыжей, которым выполнена классическая операция Sugarbaker — ненатяжная герниопластика с установкой сетчатого аллотрансплантата интраперитонеально вокруг стомированной кишки, без ушивания грыжевого дефекта [20]. В группу исследования вошли 30 больных с соответствующей патологией, которым выполнили гибридную интраперитонеальную аллопластику. Гибридная интраперитонеальная пластика с использованием композитных эндопротезов является модификацией операции Sugarbaker. В ходе операции производят первоначальное ушивание грыжевого дефекта брюшной стенки отдельными узловыми швами под диаметр стомированной кишки. Затем линию шва и переднюю брюшную стенку укрепляют композитным аллотрансплантатом вокруг стомированной кишки, из которого формируют «чехол» для стомированной кишки. Протез фиксируют при помощи герниостеплера к париетальной брюшине с наложением фиксирующих швов к серозной оболочке кишки (рис. 1–3). При отсутствии интраоперационных технических ошибок этот способ обеспечивает профилактику рецидива грыжи на время биоинтеграции аллотрансплантата. Таким образом, отличие в лечении больных группы исследования от группы сравнения состояло в методе оперативного лечения; распределение пациентов по группам осуществляли методом случайной выборки параллельно.

Группа исследования и группа сравнения сопоставимы по степеням парастомальных грыж (группа исследования:

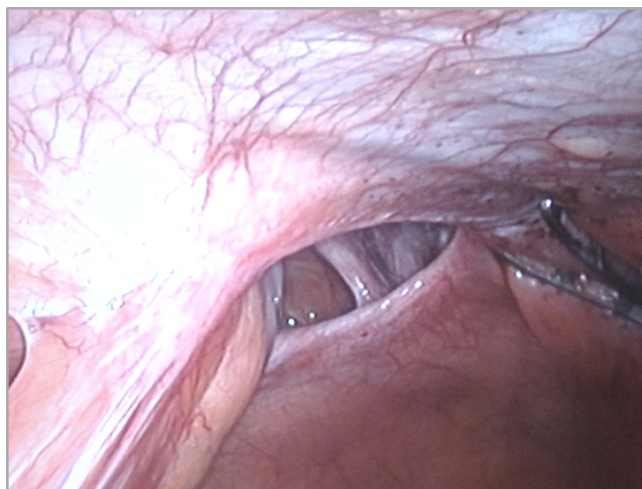


Рис. 1. Интраоперационное фото параколомостомического дефекта апоневроза

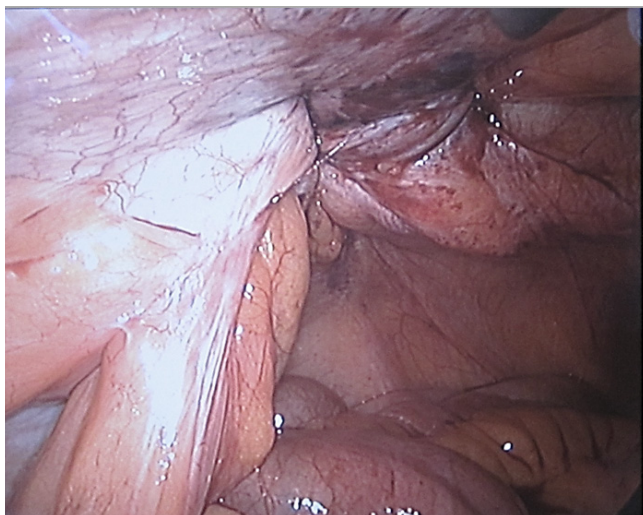


Рис. 2. Интраоперационное фото ушивания дефекта апоневроза

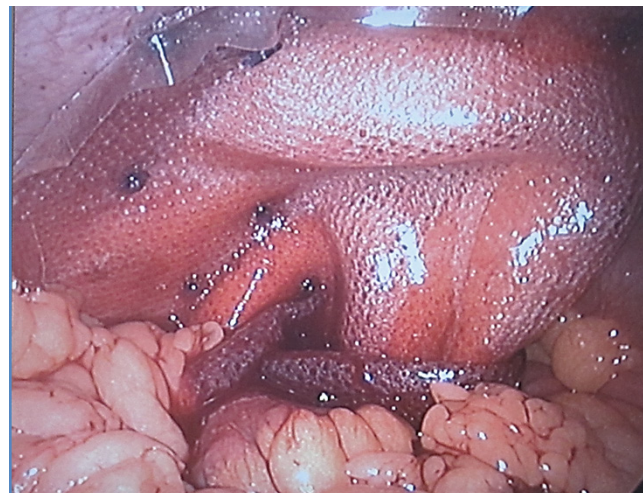


Рис. 3. Интраоперационное фото формирования «чехла» для стомированной кишки

с III степенью — 20 (67%), с IV степенью — 10 (33%); группа сравнения: с III степенью — 15 (50%), с IV степенью — 15 (50%); $p = 0,191$).

Подавляющему числу пациентов постоянная кишечная стома была выведена по поводу рака анального канала: 22 (73%) — в группе исследования и 20 (67%) — в группе сравнения. Исследуемые группы сопоставимы по основному заболеванию, по поводу которого была выведена пожизненная кишечная стома ($p = 0,763$). Выделенные группы сопоставимы по хирургическому анамнезу ($p = 0,394$). Основное первичное оперативное пособие — брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки: 22 (73%) — в группе исследования и 17 (57%) — в группе сравнения. В таблице представлено распределение больных группы исследования и группы сравнения по инициальным характеристикам.

Для оценки ранних послеоперационных осложнений в исследуемых группах использовали классификацию хирургических осложнений Clavien–Dindo [21]. Летальных исходов в обеих группах не зафиксировано. Большинство осложнений (раневые осложнения — серомы, гематомы послеоперационной раны, парез желудочно-кишечного тракта) были отнесены к I степени осложнений. Серомы послеоперационной раны диагностированы у 7% (2–21%) пациентов группы исследования и у 10% (4–25%) пациентов группы сравнения (различия статистически не значимы, $p > 0,05$ (F -критерий)). Гематомы послеоперационной раны выявлены у 3% (1–17%) пациентов группы сравнения, у пациентов группы исследования гематомы не обнаружены. Парез желудочно-кишечного тракта в раннем послеоперационном периоде выявлен в одинаковом процентном соотношении у пациентов в группе исследования и в группе сравнения — по 7% (2–21%) в обеих группах. Таким образом, частота развития ранних послеоперационных осложнений в обеих группах не имела статистически значимых различий [17].

Оценку поздних послеоперационных осложнений (выявление рецидивов параколомических грыж) проводили при помощи динамической контрольной компьютерной томографии (КТ) органов брюшной полости с внутривенным контрастированием через год и через два года после операции. При выполнении КТ через два года после операции получены следующие результаты: в группе исследования выявлено три случая рецидива грыжи, что составляет 10% (3–26%); в группе сравнения — у 13

пациентов был выявлен рецидив, что составляет 43% (27–61%) (различия статистически значимы, $p = 0,01$ (χ^2 с поправкой Йейтса)). Необходимо отметить, что помимо рецидива параколомической грыжи к наиболее частым поздним послеоперационным осложнениям относят выпадение и стриктуру колостомы. В группе исследования и в группе сравнения стриктуры колостом не выявлены. Отсутствие стриктурообразования, по-видимому, обусловлено использованием при обоих вариантах аллопластики композитного сетчатого аллотрансплантата, который не прорастает в стенку кишки, не вызывает деформацию и сужение просвета кишки [22]. В группе исследования не было зафиксировано случаев выпадения колостомы. В группе сравнения было выявлено выпадение колостомы у трех пациентов (10%). Данное осложнение в контрольной группе с большей вероятностью обусловлено отсутствием фиксации стомированной кишки к тканям передней брюшной стенки в зоне стомального отверстия и большей подвижностью стомированной кишки. При гибридной интраперитонеальной аллопластике стомированная кишка плотно фиксирована за счет ушивания отверстия в передней брюшной стенке строго под свой диаметр без свободного пространства в данной зоне.

Для оценки качества жизни пациентов с параколомическими грыжами был выбран европейский опросник EUROQOL 5D-5L. Наши пациенты с параколомическими грыжами в большинстве — пожилые люди с сопутствующей хронической неврологической патологией (цереброваскулярная болезнь, хроническая ишемия головного мозга). Заполнение более объемных опросников для них трудновыполнимо на практике, что обуславливает малую достоверность результатов [9]. В соответствии с дизайном исследования оценку качества жизни пациентов группы исследования и группы сравнения осуществляли при помощи опросника EUROQOL 5D-5L до операции, а также после операции через год и через два года. Выбранный временной интервал обусловлен частотой возникновения рецидивов параколомической грыжи, по данным мировой литературы и нашим данным. Рецидив заболевания возникает в течение года послеоперационного периода [15; 21].

Опросник EUROQOL 5D-5L состоит из двух частей. В первой части опросника пациенту необходимо дать оценку своего состояния по пяти пунктам: подвижность,

Таблица. Инициальные характеристики пациентов, включенных в исследование

Параметр	Общее число пациентов (n = 60)	Основная группа (гибридная интра-перитонеальная аллопластика) (n = 30)	Группа сравнения (классическая операция Sugarbaker) (n = 30)	p	Критерий
Пол Мужской Женский	21 (35%) 39 (65%)	10 (33%) 20 (67%)	11 (37%) 19 (63%)	0,787	χ^2
Медиана возраста, лет	65,5 (61,75; 72,0)	66,5 (62,25; 72,0)	65,0 (61,25; 71,75)	0,246	Манна-Уитни
Степень парастомальных грыж III IV	35 (58%) 25 (42%)	20 (67%) 10 (33%)	15 (50%) 15 (50%)	0,191	χ^2
Заболевание Рак нижнеампулярного отдела прямой кишки Рак анального канала Осложненное течение дивертикулярной болезни Травма сфинктера прямой кишки	15 (25%) 42 (70%) 1 (2%) 2 (3%)	7 (23%) 22 (73%) 0 (0%) 1 (3%)	8 (27%) 20 (67%) 1 (3%) 1 (3%)	0,763	χ^2
Хирургический анамнез Брюшно-анальная резекция прямой кишки Колостомия Брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки	18 (30%) 3 (5%) 39 (65%)	7 (23%) 1 (3%) 22 (73%)	11 (37%) 2 (7%) 17 (57%)	0,394	χ^2

самообслуживание, активность в повседневной жизни, боль и дискомфорт, тревога и депрессия. Каждый пункт по степени выраженности разделен на пять уровней: отсутствие проблемы, небольшие затруднения, умеренные трудности, серьезные проблемы, постоянное наличие серьезной проблемы. Комбинирование уровней по пяти пунктам позволяет получить 3125 вариантов «состояния здоровья» [23; 24].

Данный опросник был модифицирован нами по отношению к пациентам с параколомическими грыжами таким образом, чтобы анкетированный четко понимал смысловую нагрузку вопросов, относящихся к повседневной жизни и эмоциональной оценке происходящего только на основании влияния на вышеперечисленные аспекты именно параколомической грыжи.

Далее представлена модифицированная анкета опросника EUROQOL 5D-5L [9].

1. Подвижность:

а) я не испытываю трудностей во время прогулки, которые связаны с наличием грыжи, — 1 балл;

б) я испытываю небольшие затруднения во время прогулки, которые связаны с наличием грыжи, — 2 балла;

в) я испытываю умеренные трудности во время прогулки, которые связаны с наличием грыжи, — 3 балла;

г) я испытываю серьезные проблемы во время прогулки, которые связаны с наличием грыжи, — 4 балла;

д) я не могу гулять из-за грыжи, — 5 баллов.

2. Самообслуживание:

а) я не испытываю трудностей с тем, чтобы помыться и одеться, — 1 балл;

б) я испытываю небольшие трудности с тем, чтобы помыться и одеться, — 2 балла;

в) я испытываю умеренные трудности с тем, чтобы помыться и одеться, — 3 балла;

г) я испытываю большие трудности с тем, чтобы помыться и одеться, — 4 балла;

д) я не в состоянии самостоятельно помыться и одеться — 5 баллов.

3. Активность в повседневной жизни (работа, домашнее хозяйство, семейные дела, увлечения):

а) я не испытываю проблем в повседневной деятельности — 1 балл;

б) я испытываю небольшие проблемы в повседневной деятельности, с проведением досуга, которые связаны с наличием грыжи, — 2 балла;

в) я испытываю умеренные проблемы в повседневной деятельности, с проведением досуга, которые связаны с наличием грыжи, — 3 балла;

г) я испытываю серьезные проблемы в повседневной деятельности, с проведением досуга, которые связаны с наличием грыжи, — 4 балла;

д) я не в состоянии заниматься повседневной деятельностью — 5 баллов.

4. Боль или дискомфорт:

а) у меня нет боли или дискомфорта — 1 балл;

б) я иногда испытываю незначительную боль или дискомфорт, которые я связываю с наличием грыжи, — 2 балла;

в) я иногда испытываю умеренную боль или дискомфорт, которые я связываю с наличием грыжи, — 3 балла;

г) я часто испытываю сильную боль или дискомфорт, которые я связываю с наличием грыжи, — 4 балла;

д) я почти постоянно испытываю очень сильную боль или дискомфорт, которые я связываю с наличием грыжи, — 5 баллов.

5. Тревога или депрессия:

а) я не испытываю беспокойства и депрессии — 1 балл;

б) я испытываю легкое беспокойство и депрессию — 2 балла;

в) я испытываю умеренное беспокойство и депрессию — 3 балла;

г) я испытываю сильное беспокойство и депрессию — 4 балла;

д) я испытываю очень сильное беспокойство или нахожусь в состоянии глубокой депрессии — 5 баллов.

Оцените, пожалуйста, Ваше состояние здоровья на сегодняшний день по шкале от 0 до 100 (где 0 — худшее состояние здоровья, которое Вы можете себе представить, 100 — лучшее состояние здоровья, которое Вы можете себе представить)

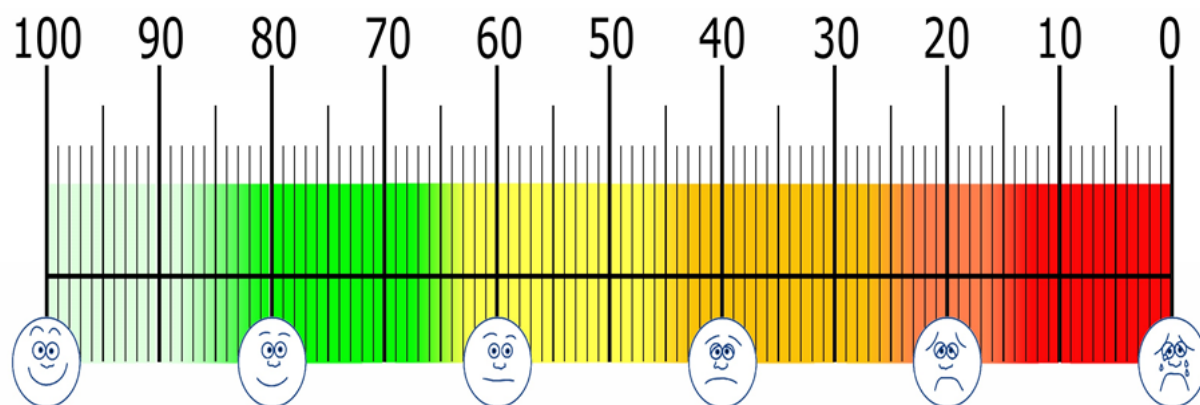


Рис. 4. Визуальная аналоговая шкала опросника EUROQOL 5D-5L

Вторая часть опросника представляет собой визуальную аналоговую шкалу (ВАШ), позволяющую пациенту наглядно оценить общее состояние здоровья в процентах (рис. 4).

Опросник пациенты заполняют самостоятельно за 2–3 мин и его заполнение обычно не вызывает трудностей даже у пожилых пациентов с имеющимися мнестико-когнитивными нарушениями. Оценку качества жизни пациента осуществляли на основании подсчета индекса качества жизни (взвешенного коэффициента) при помощи специального калькулятора EUROQOL 5D-5L Crosswalk Index Value Calculator for Windows индивидуально [24]. Разность взвешенных коэффициентов до и после лечения позволяет оценить эффективность проведенного лечения. Градации оценки эффективности операции по индексу EUROQOL 5D-5L приведены ниже:

$\Delta EQ-5D-5L < 0,10$ балла — нет эффекта

$0,10 \leq \Delta EQ-5D-5L \leq 0,24$ — минимальный эффект

$0,24 \leq \Delta EQ-5D-5L < 0,31$ — удовлетворительный эффект

$\Delta EQ-5D-5L \geq 0,31$ баллов — выраженный эффект

Статистическую обработку результатов проводили с помощью Python 3.8. (Guido van Rossum; Netherlands). Для расчетов были использованы встроенные функции из модуля Scipy. Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовали критерий Шапиро–Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании не имеют нормального распределения. Поэтому в дальнейшем расчеты производили методами непараметрической статистики. Совокупности

количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывали при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q_1 ; Q_3). Для сравнения несвязанных выборок использовали U-критерий Манна–Уитни, связанных — критерий Уилкоксона.

С целью изучения взаимосвязи между явлениями, представленными количественными данными, использовали непараметрический метод — рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Результаты качественных признаков представляли в абсолютных числах с указанием долей (%) и 95%-го доверительного интервала (ДИ), рассчитанного по методу Уилсона. Сравнение номинальных данных в группах проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона. В случае анализа четырехпольных таблиц при ожидаемом явлении хотя бы в одной ячейке менее 10 рассчитывали критерий χ^2 с поправкой Йейтса. В тех случаях, когда число ожидаемых наблюдений в любой из ячеек четырехпольной таблицы было менее 5, для оценки уровня значимости различий использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Медиана взвешенного коэффициента (ВК) перед операцией была сопоставима в исследуемых группах и составила в группе исследования 0,56 (0,42; 0,69), в группе сравнения — 0,46 (0,29; 0,68) ($p = 0,113$). Медианы значения по ВАШ-термометру до операции также были

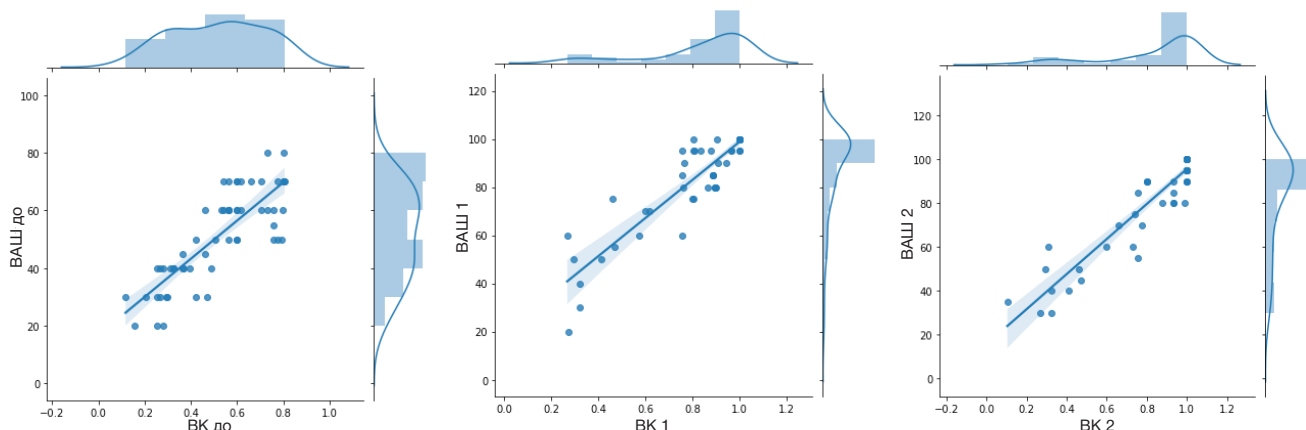


Рис. 5. Корреляция шкал ВК и ВАШ

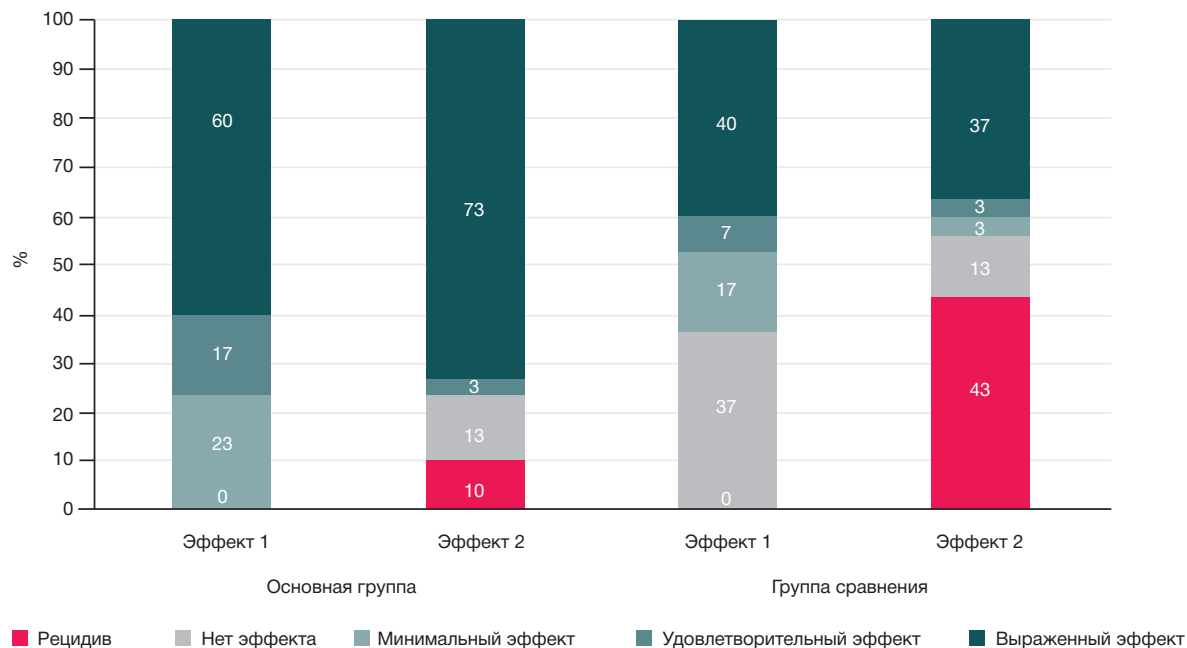


Рис. 6. Эффективность хирургического лечения пациентов с параэзофагическими грыжами

сопоставимы: в группе исследования: 52,5 (41,25; 67,5), в группе сравнения: 47,5 (40,0; 60,0) ($p = 0,156$).

Через год после операции как в группе исследования, так и в группе сравнения произошли статистически значимые изменения и по ВК ($p < 0,001^*$), и по ВАШ ($p < 0,001^*$) [* — статистически значимые различия, т. е. $p < 0,05$]. Однако изменения в группах различались между собой: медианные значения ВК и ВАШ стали статистически значимо выше в группе исследования, чем в группе сравнения (ВК: в группе исследования — 0,92 (0,81; 1,0), в группе сравнения — 0,89 (0,5; 1,0), $p = 0,046^*$; ВАШ: в группе исследования — 95,0 (86,25; 100,0), в группе сравнения — 85,0 (62,5; 100,0), $p = 0,021^*$).

Через два года после операции медианное значение взвешенного коэффициента (ВК) сохранило статистически значимое превосходство в группе исследования (в группе исследования — 1,0 (0,93; 1,0), в группе сравнения — 0,8 (0,46; 1,0), $p = 0,048^*$). Однако стоит заметить, что в основной группе с первого по второй год после операции значение ВК статистически значимо выросло с 0,92 (0,81; 1,0) до 1,0 (0,93; 1,0) ($p = 0,033^*$), а в группе сравнения — статистически значимо снизилось с 0,89 (0,5; 1,0) до 0,8 (0,46; 1,0) ($p = 0,028^*$).

На второй год после операции значения очень консолидированы около 1 (0,93; 1,0), а в группе сравнения значения значительно разбросаны от 0,46 до 1,0, что говорит о неустойчивом эффекте по шкале ВК после двух лет после операции. Значение ВАШ через два года после операции в группе исследования также было выше, чем в группе сравнения, однако без статистически значимого различия (в группе исследования — 95,0 (85,0; 100,0), в группе сравнения — 85,0 (50,0; 95,0), $p = 0,054$). При этом в группе исследования значение ВАШ стабилизировалось ко второму году после операции на значении 95 и не показало статистически значимых изменений. В группе сравнения медианное значение также осталось на прежнем уровне — 85, но межквартильный отрезок расширился и сместился в сторону более низких значений, что отразилось на появлении статистически значимого различия в значении ВАШ от первого ко второму году после операции с 85,0 (62,5; 100,0) до 85,0 (50,0; 95,0) ($p = 0,004^*$).

Следует отметить, что шкалы ВК и ВАШ хорошо коррелируют между собой на всех этапах измерения: до операции ($rs = 0,8246$; $p < 0,001^*$), через год ($rs = 0,8909$; $p < 0,001^*$) и через два года после операции ($rs = 0,9161$; $p < 0,001^*$), что указывает на «слаженную работу» шкал по оценке показателей качества жизни пациента (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования установлено, что в обеих группах средние показатели качества жизни значительно улучшились. Однако для оценки эффективности хирургического лечения пациентов с параэзофагическими грыжами необходимо учитывать не только общее улучшение качества жизни в группе, но и наличие эффекта от проведенного лечения, т. е. долю пациентов с отсутствием рецидивов заболевания [25].

Анализ разности взвешенных коэффициентов через год после операции и до операции (эффект 1), а также через год и через два года после операции (эффект 2) продемонстрировал статистически значимую эффективность от проведенного лечения (рис. 6). В основной группе и группе сравнения по результатам как через год после операции (эффект 1; $p = 0,004^*$), так и через два года после операции (эффект 1; $p = 0,028^*$).

Эффект отсутствия рецидивов заболевания в основной группе после операции гибридной интраперитонеальной аллопластики статистически значимо выше (90% (74; 97%)), чем в группе сравнения после классической операции Sugarbaker (57% (39; 73%)); $p = 0,009^*$ (критерий χ^2 с поправкой Йейтса). Разность взвешенных коэффициентов до и после лечения позволяет оценить эффективность проведенного лечения на основе градаций оценки эффективности. Результаты исследования могут быть полезны при планировании дальнейших исследований и разработке практических рекомендаций.

Совокупность полученных данных позволяет рассмотреть возможность отказа от скринингового выполнения контрольной КТ органов брюшной полости в отдаленные сроки послеоперационного периода всем стомированным пациентам. Тестирование в амбулаторных

условиях с использованием модифицированного опросника EUROQOL 5D-5L позволит избежать больших экономических затрат на выполнение КТ. В случаях отсутствия значительного улучшения качества жизни, по данным опросника, в связи с подозрением на рецидив грыжи следует выполнять контрольное КТ-исследование.

Анализ поздних осложнений показал следующие результаты: в группе исследования выявлено три случая рецидива грыжи, что составляет 10% (95%-й ДИ: 3–26%); в группе сравнения у 13 пациентов был выявлен рецидив, что составляет 43% (95% ДИ: 27–61%) ($p = 0,01$; критерий χ^2 с поправкой Йейтса). Процент рецидива в исследуемой группе остается высоким, что определяет наряду с совершенствованием хирургической тактики парастомальных грыж необходимость поиска эффективных способов профилактики данной патологии [26–28].

Ограничением исследования следует признать небольшой объем выборки, обусловленный строгими критериями исключения.

ВЫВОДЫ

Пластика парастомальной грыжи остается сложной операцией, для которой отсутствует четкий стандарт оптимальной оперативной тактики. Применение опросника EUROQOL 5D-5L позволяет сделать вывод о том, что гибридная интраперитонеальная аллопластика является эффективным методом лечения пациентов с параколостомическими грыжами и статистически значимо улучшает качество жизни пациентов. Этот метод можно рекомендовать при хирургическом лечении парастомальной грыжи.

Литература

1. Allen-Mersh TG, Thomson JP. Surgical treatment of colostomy complications. *Br J Surg*. 1988 May; 416–8.
2. Israelson LA. Preventing and treating Parastomal hernia. *World Journal of Surgery*. 2005; 1086–9.
3. Israelson LA. Parastomal hernias. *Surgical Clinics of North America*. 2008; 113–25.
4. Hiranyakas A, Ho YH. Laparoscopic parastomal hernia repair. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2010; 53 (9): 1334–6.
5. Śmietański M, Bury K, Matyja A, et al. Polish guidelines for treatment of patients with parastomal hernia. *Pol Przegl Chir*. 2013; 85: 152–80.
6. De Robles MS, Young CJ. BMC. Parastomal hernia repair with onlay mesh remains a safe and effective approach. 2020; 24; 20 (1): 296. DOI: 10.1186/s12893-020-00964-9.
7. Tivenius M, Näsval P, Sandblom G. *Int J. Parastomal hernias causing symptoms or requiring surgical repair after colorectal cancer surgery—a national population-based cohort study. Colorectal Dis*. 2019; 34 (7): 1267–72. DOI: 10.1007/s00384-019-03292-4.
8. Van Dijk SS, Timmermans L, Deerenberg EB, et al. Parastomal Hernia: Impact on Quality of Life? *World J Surg*. 2015; 39: 2596–601.
9. Родоман Г. В., Мальгина Н. В., Разбирин В. Н., Долгина Т. Ю. Оценка индивидуального качества жизни пациента с параколостомической грыжей. *Хирург*. 2019; 3–4: 14–23.
10. Родоман Г. В., Мальгина Н. В., Разбирин В. Н., Долгина Т. Ю. Состояние проблемы оперативного лечения параколостомических грыж. *Хирург*. 2016; 10 (144): 24–30.
11. Hansson BM, Slater NJ, Schouten van der Velden AP, et al. Surgical techniques for parastomal hernia repair: a systematic review of the literature. *Ann Surg*. 2012; 255: 685–95.
12. Tadeo-Ruiz G, Picazo-Yeste JS, Moreno-Sanz C, Herrero-Bogajo ML. Parastomal hernias: background, current status and future prospects. *Cirugía Española (English Edition)*. 2010; 87 (6): 339–49.
13. Antoniou SA, Agresta F, Garcia Alamin JM, et al. European Hernia Society guidelines on prevention and treatment of parastomal hernias. *Hernia*. 2018; 22: 183–98.
14. Gregg ZA, Dao HE, Schechter S, Shah N. Paracolostomal Hernia Repair: who and when? *Journal of the American College of Surgeons*. 2014; 1105–12.
15. Szczepkowski M, Gil G, Kobus A. Parastomal hernia repair: Bielański hospital experience. *Acta chirurgica lugoslavica*. 2006; 53 (2): 99–102.
16. Okorji LM, Kasten KR. Diagnosis and Management of Parastomal Hernias. *Dis Colon Rectum*. 2019 Feb; 62 (2): 158–62. DOI: 10.1097/DCR.0000000000001293.
17. Родоман Г. В., Мальгина Н. В., Разбирин В. Н., Епифанова С. В., Долгина Т. Ю., Кузнецов А. И. Применение мультиспиральной компьютерной томографии для оценки эффективности хирургического лечения пациентов с параколостомической грыжей. *Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова*. 2021; (3): 36–41.
18. Буров Н. Е. Краткий обзор истории МНОАР. К 50-летию МНОАР. *Анестезиология и реаниматология*. 2013; (4): 77–82.
19. Lee TH, Marcantonio ER, Mangione CM, et al. Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation*. 1999; 100 (10): 1043–9.
20. Sugarbaker PH. Peritoneal approach to prosthetic mesh repair of parastomy hernias. *Ann Surg*. 1985; 201: 344–6.
21. Dindo D, Demartines N, Clavien P. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*. 2004; 240: 205–13.
22. Родоман Г. В., Мальгина Н. В., Разбирин В. Н., Долгина Т. Ю. Выбор синтетического аллотрансплантата для операций по поводу параколостомических грыж. *Хирург*. 2018; 9–10: 3–12.
23. The EuroQol group. EuroQol — a new facility for the measurement of health related quality of life. *Health Policy*. December 1990; 16: 199–208. Available from: [https://doi.org/10.1016/0168-8510\(90\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0168-8510(90)90421-9).
24. Notes on the use of EQ-5D developed by the EuroQol Group, 2003, EuroQol Business Management, PO Box 4445 3006 AK Rotterdam, the Netherlands, Available from: www.euroqol.org.
25. Blackwell S, Pinkney T. Quality of life and parastomal hernia repair: the PROPHET study. *Hernia*. 2020; 24: 429–30.
26. Gachabayov M, Orujova L, Latifi LA, Latifi R. Use of Biologic Mesh for the Treatment and Prevention of Parastomal Hernias. *Surg Technol Int*. 2020 Nov; 28; 37: 115–9.
27. Cross AJ, Buchwald PL, Frizelle FA, Eglinton TW. Meta-analysis of prophylactic mesh to prevent parastomal hernia. *Br J Surg*. 2017 Feb; 104 (3): 179–186. DOI: 10.1002/bjs.10402. Epub 2016 Dec 22.
28. Pich J. Prosthetic mesh for the prevention of parastomal hernias. *Am J Nurs*. 2019 Apr; 119 (4): 49. DOI: 10.1097/01.NAJ.0000554548.93403.64.

References

1. Allen-Mersh TG, Thomson JP. Surgical treatment of colostomy complications. *Br J Surg*. 1988 May; 416–8.
2. Israelson LA. Preventing and treating Parastomal hernia. *World Journal of Surgery*. 2005; 1086–9.
3. Israelson LA. Parastomal hernias. *Surgical Clinics of North America*. 2008; 113–25.
4. Hiranyakas A, Ho YH. Laparoscopic parastomal hernia repair. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2010; 53 (9): 1334–6.
5. Śmietański M, Bury K, Matyja A, et al. Polish guidelines for treatment of patients with parastomal hernia. *Pol Przegl Chir*. 2013; 85: 152–80.
6. De Robles MS, Young CJ. *BMC*. Parastomal hernia repair with onlay mesh remains a safe and effective approach. 2020; 24: 20 (1): 296. DOI: 10.1186/s12893-020-00964-9.
7. Tivenius M, Näsval P, Sandblom G. *Int J*. Parastomal hernias causing symptoms or requiring surgical repair after colorectal cancer surgery—a national population-based cohort study. *Colorectal Dis*. 2019; 34 (7): 1267–72. DOI: 10.1007/s00384-019-03292-4.
8. Van Dijk SS, Timmermans L, Deerenberg EB, et al. Parastomal Hernia: Impact on Quality of Life? *World J Surg*. 2015; 39: 2596–601.
9. Rodoman GV, Malgina NV, Razbirin VN, Dolgina TYu. Ocenka individual'nogo kachestva zhizni pacienta s parakolostomicheskoy gryzhej. *Hirurg*. 2019; 3–4: 14–23. Russian.
10. Rodoman GV, Malgina NV, Razbirin VN, Dolgina TYu. Sostojanie problemy operativnogo lechenija parakolostomicheskikh gryzh. *Hirurg*. 2016; 10 (144): 24–30. Russian.
11. Hansson BM, Slater NJ, Schouten van der Velden AP, et al. Surgical techniques for parastomal hernia repair: a systematic review of the literature. *Ann Surg*. 2012; 255: 685–95.
12. Tadeo-Ruiz G, Picazo-Yeste JS, Moreno-Sanz C, Herrero-Bogajo ML. Parastomal hernias: background, current status and future prospects. *Cirugía Española (English Edition)*. 2010; 87 (6): 339–49.
13. Antoniou SA, Agresta F, Garcia-Alamino JM, et al. European Hernia Society guidelines on prevention and treatment of parastomal hernias. *Hernia*. 2018; 22: 183–98.
14. Gregg ZA, Dao HE, Schechter S, Shah N. Paracolostomal Hernia Repair: who and when? *Journal of the American College of Surgeons*. 2014; 1105–12.
15. Szczepkowski M, Gil G, Kobus A. Parastomal hernia repair: Bielański hospital experience. *Acta chirurgica iugoslavica*. 2006; 53 (2): 99–102.
16. Okorji LM, Kasten KR. Diagnosis and Management of Parastomal Hernias. *Dis Colon Rectum*. 2019 Feb; 62 (2): 158–62. DOI: 10.1097/DCR.0000000000001293.
17. Rodoman GV, Malgina NV, Razbirin VN, Epifanova SV, Dolgina TYu, Kuznecov AI. Primenenie mul'tispiral'noj komp'yuternoj tomografii dlja ocenki jeffektivnosti hirurgicheskogo lechenija pacientov s parakolostomicheskoy gryzhej. *Hirurgija. Zhurnal im. N. I. Pirogova*. 2021; (3): 36–41. Russian.
18. Burov NE. Kratkij obzor istorii MNOAR. K 50-letiju MNOAR. *Anesteziologija i reanimatologija*. 2013; (4): 77–82. Russian.
19. Lee TH, Marcantonio ER, Mangione CM, et al. Derivation and prospective validation of a simple index for prediction of cardiac risk of major noncardiac surgery. *Circulation*. 1999; 100 (10): 1043–9.
20. Sugarbaker PH. Peritoneal approach to prosthetic mesh repair of parastomy hernias. *Ann Surg*. 1985; 201: 344–6.
21. Dindo D, Demartines N, Clavien P. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*. 2004; 240: 205–13.
22. Rodoman GV, Malgina NV, Razbirin VN, Dolgina TYu. Vybór sinteticheskogo allotransplantata dlja operacij po povodu parakolostomicheskikh gryzh. *Hirurg*. 2018; 9–10: 3–12. Russian.
23. The EuroQol group. EuroQol — a new facility for the measurement of health related quality of life. *Health Policy*. December 1990; 16: 199–208. Available from: [https://doi.org/10.1016/0168-8510\(90\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0168-8510(90)90421-9).
24. Notes on the use of EQ-5D developed by the EuroQol Group, 2003, EuroQol Business Management, PO Box 4445 3006 AK Rotterdam, the Netherlands, Available from: www.euroqol.org.
25. Blackwell S, Pinkney T. Quality of life and parastomal hernia repair: the PROPER study. *Hernia*. 2020; 24: 429–30.
26. Gachabayov M, Orujova L, Latifi LA, Latifi R. Use of Biologic Mesh for the Treatment and Prevention of Parastomal Hernias. *Surg Technol Int*. 2020 Nov; 28; 37: 115–9.
27. Cross AJ, Buchwald PL, Frizelle FA, Eglinton TW. Meta-analysis of prophylactic mesh to prevent parastomal hernia. *Br J Surg*. 2017 Feb; 104 (3): 179–186. DOI: 10.1002/bjs.10402. Epub 2016 Dec 22.
28. Pich J. Prosthetic mesh for the prevention of parastomal hernias. *Am J Nurs*. 2019 Apr; 119 (4): 49. DOI: 10.1097/01.NAJ.0000554548.93403.64.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КОЛЛАГЕНОВЫХ МЕМБРАН ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ ПОЛНОСЛОЙНЫХ ДЕФЕКТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Г. Д. Лазишвили¹ ✉, К. А. Егиязарян¹, Д. В. Никишин², А. А. Воронцов³, Д. В. Клинов⁴

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

² ООО «Аптос групп», Москва, Россия

³ Клиника «Ветеринарный центр хирургии и онкологии доктора Воронцова», Москва, Россия

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

Изучение эффективности применения коллагеновых мембран при хирургическом лечении полнослойных дефектов гиалинового хряща крайне актуально для практического здравоохранения. Отсутствие сведений о том, в какие сроки, как и в какую хрящевую ткань трансформируются коллагеновые мембраны, каково качество вновь образованного хряща, сдерживает их применение в клинической практике. Целью исследования было изучить биологический потенциал коллагеновых мембран и их способность к трансформации в хрящевую ткань. Исследование проводили на четырех свиньях. На суставах правых задних конечностей формировали полнослойный дефект хряща и имплантировали коллагеновую мембрану Ortokeep. На суставах левых задних конечностей формировали по два полнослойных дефекта хряща. На один дефект имплантировали коллагеновую мембрану Chondro-Gide, на второй дефект мембрану не имплантировали. Животных выводили из эксперимента в сроки 2, 3, 4, 6 месяцев после операции. Представлены макроскопический и микроскопический анализ характера регенерации хрящевой ткани в различные сроки после операции. Результаты показали высокий биологический потенциал коллагеновых мембран и их возможность трансформироваться в хрящевую ткань. Хрящ выявлялся с 3-го месяца исследования. Отмечена тенденция к статистически достоверному ($p < 0,05$) увеличению его толщины вплоть до 4-го месяца (в группе 1 — на 18,7%, во группе 2 — на 12,8%) с последующим его «созреванием». Показано, что при использовании технологии AMIC статистически достоверно ($p < 0,05$) уменьшается область деструкции костной ткани.

Ключевые слова: хрящ, локальный дефект, коленный сустав, технология AMIC, костно-хрящевой дефект, коллагеновая мембрана, мозаичная пластика

Вклад авторов: Г. Д. Лазишвили — дизайн эксперимента, участие в выполнении экспериментальных операций, анализ данных литературы и материалов эксперимента, написание статьи; К. А. Егиязарян — анализ данных литературы, результатов эксперимента; Д. В. Никишин — обработка и анализ данных эксперимента, участие в написании статьи; А. А. Воронцов — выполнение экспериментальных операций; Д. В. Клинов — автор и разработчик коллагеновой мембраны Ortokeep.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Центра доклинических исследований г. Пенза (протокол № 1–19 от 11 марта 2019 г.). Содержание животных и манипуляции с ними соответствуют этическим нормам и Международным требованиям по гуманному отношению к лабораторным (экспериментальным) животным, а также ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009 «Изделия медицинские».

✉ **Для корреспонденции:** Гурам Давидович Лазишвили
ул. Островитянова, д. 1, 117997, г. Москва; guramlaz@gmail.com

Статья получена: 19.07.2021 **Статья принята к печати:** 05.08.2021 **Опубликована онлайн:** 20.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.038

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF BIOLOGICAL POTENTIAL OF COLLAGEN MEMBRANES IN RECONSTRUCTION OF FULL-THICKNESS HYALINE CARTILAGE DEFECTS

Lazishvili GD¹ ✉, Egiazaryan KA¹, Nikishin DV², Vorontsov AA³, Klinov DV⁴

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Aptos Group, Moscow, Russia

³ Doctor Vorontsov's Veterinary Center for Surgery and Oncology, Moscow, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine under the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Investigation of the efficacy of collagen membranes used in the full-thickness hyaline cartilage defect surgery is extremely urgent from the point of view of everyday healthcare. However, there is no information about the collagen membrane transformation timeframe, patterns and type of tissue the membrane transforms into, nor on the quality of the newly formed cartilage, which hinders the use of collagen membranes in clinical practice. This study aimed to investigate the biological potential of collagen membranes and their capacity to transform into cartilage tissue. The study involved four pigs as subjects. We induced a full-thickness cartilage defect on their right hind limb joint and implanted an Ortokeep collagen membrane to remedy it. Two full-thickness cartilage defects were induced on the left hind limb joints of the animals, one was treated with an implanted Chondro-Gide collagen membrane, the other remained without a membrane. The animals were withdrawn from the experiment at 2, 3, 4, 6 months after the operation. This report contains results of the macroscopic and microscopic analyses revealing the character of cartilage tissue regeneration at various timepoints post-surgery. The collagen membranes proved to have a high biological potential and a capacity to transform into cartilage tissue. The cartilages were identifiable from the 3rd month of the study. Their thickness was growing significantly ($p < 0.05$) up to the 4th month post-surgery, gaining 18.7% in group 1 and 12.8% in group 2; afterwards, the formed tissue "matured". We have shown that the AMIC technique allows significant ($p < 0.05$) reduction of the bone tissue destruction area.

Keywords: cartilage, local defect, knee joint, AMIC technology, osteochondral defect, collagen membrane, mosaicplasty

Author contribution: Lazishvili GD — design of the experiment, participation in the experimental surgery, analysis of literature and experimental materials, article authoring; Yeghiazaryan KA — analysis of literature, experimental results; Nikishin DV — processing and analysis of the experimental data, article authoring; Vorontsov AA — execution of the experimental surgery; Klinov DV — Ortokeep collagen membrane design and development.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Center for Preclinical Research of Penza (Minutes № 1–19 of March 11, 2019). The animals were kept and used in compliance with the ethical standards and International requirements for humane treatment of laboratory (experimental) animals, as well as GOST R ISO 10993-1-2009 Medical Devices.

✉ **Correspondence should be addressed:** Guram D. Lazishvili
Ostrovityanova, 1, 117997, Moscow; guramlaz@gmail.com

Received: 19.07.2021 **Accepted:** 05.08.2021 **Published online:** 20.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.038

За последнее годы для восстановления полнослойных дефектов гиалинового хряща широкую популярность получила технология индуцированного матрицей аутохондрогенеза AMIC (autologous matrix induced chondrogenesis) [1–4]. Этот метод основан на формировании отверстий в субхондральной кости (обеспечивающих транспорт костного мозга на поверхность дефекта) и регенеративной способности стромальных клеток костного мозга, поступающего через сформированные отверстия. Образующийся в результате «суперсгусток» из красного костного мозга стабилизируется коллагеновой мембраной, имплантируемой в зону дефекта хряща. Естественный клеточный каркас защищает и связывает прогениторные клетки внутри «биологической камеры», стимулируя их дифференциацию для репарации хряща [3, 5].

Преимущества AMIC очевидны. Это мало инвазивная одноэтапная процедура, не требующая культивирования хондроцитов; возможность восстановления крупных дефектов хряща ($\geq 6\text{--}8\text{ см}^2$); простая хирургическая техника; подтвержденная эффективность в отношении купирования болевого синдрома, восстановления функции сустава и удовлетворенности больных исходами лечения.

Несмотря на широкую популярность AMIC, остается много спорных и нерешенных вопросов: сроки деградации мембраны; характер ее трансформации в хрящевую ткань; качество вновь образованной на месте имплантации мембраны хрящевой ткани и др. [6, 7].

В настоящее время коллагеновая мембрана является одним из наиболее востребованных биологических материалов для восстановления хрящевой ткани. К сожалению, высокая стоимость импортных предложений не позволяет внедрить AMIC в широкую клиническую практику отечественных медицинских учреждений. В то же время потребность в выполнении операций по восстановлению хряща остается высокой. Этот факт определил необходимость разработки отечественного аналога, отвечающего всем современным требованиям, предъявляемым клиницистами к коллагеновым мембранам.

Целью исследования было экспериментальным путем изучить биологический потенциал коллагеновых мембран и их способность к трансформации в хрящевую ткань.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали два вида коллагеновых мембран, отличающихся по составу, структуре и характеру производства.

В качестве основной (тестируемой) использовали разработанную российскими учеными мембрану Ortokeep («Ортософт»; Россия). Мембрана сформирована методом электроспиннинга из нановолокон диаметром 300–500 нм, состоящих из смеси бычьего коллагена I типа и полилактида. Мембрана имеет одинаковый микрорельеф и смачиваемость с обеих сторон. Метод формирования мембраны и структура нановолокон радикально отличают ее от зарубежных аналогов, что позволяет произвести объективный сравнительный анализ их биологического потенциала.

В качестве контрольной использовали коллагеновую мембрану Chondro-Gide (Geistlich Pharma; Швейцария), синтезированную из свиного коллагена I и III типа, который резорбируется естественным путем. Эта мембрана является наиболее популярным биопродуктом и широко используется для восстановления полнослойных дефектов хряща. Поэтому данная мембрана была выбрана нами в качестве контрольной.

Модель эксперимента

Исследование проводили на четырех свиньях породы Русская белая возраста 6 месяцев, весом 68/67,4/79/73 кг, которых содержали в подсобном хозяйстве Центра доклинических исследований (г. Пенза) изолированно от общего поголовья. Животные на момент начала эксперимента находились в удовлетворительном состоянии, имели светлый окрас, самостоятельно принимали пищу и воду, внешние признаки заболевания отсутствовали. В анамнезе указаний на перенесенные

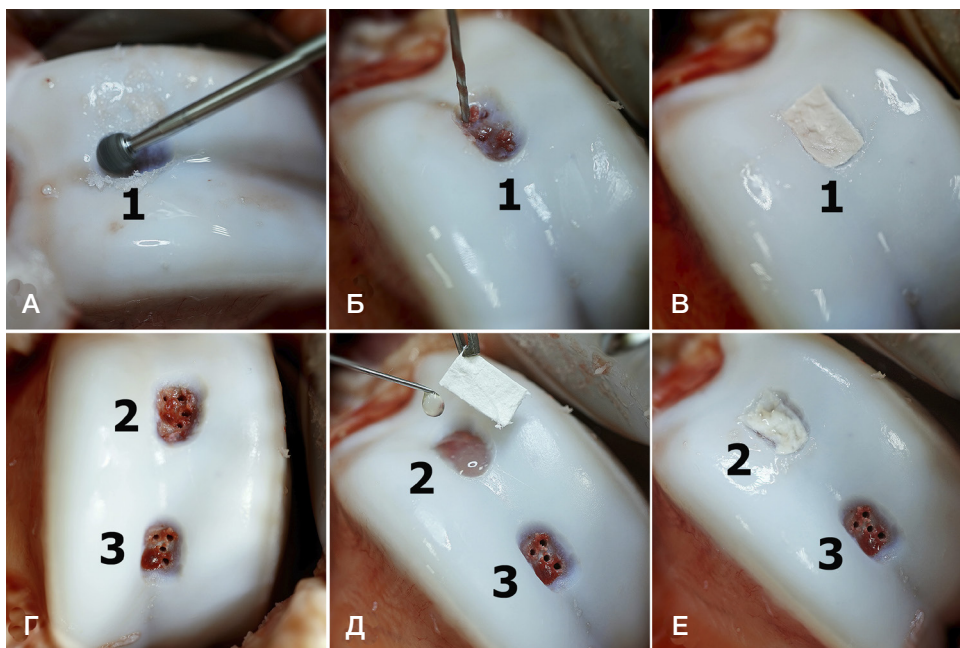


Рис. 1. Этапы формирования полнослойных дефектов и имплантации коллагеновых мембран. 1 — дефект № 1 (имплантация мембраны Ortokeep); 2 — дефект № 2 (имплантация мембраны Chondro-Gide); 3 — дефект № 3 (без имплантации мембраны)

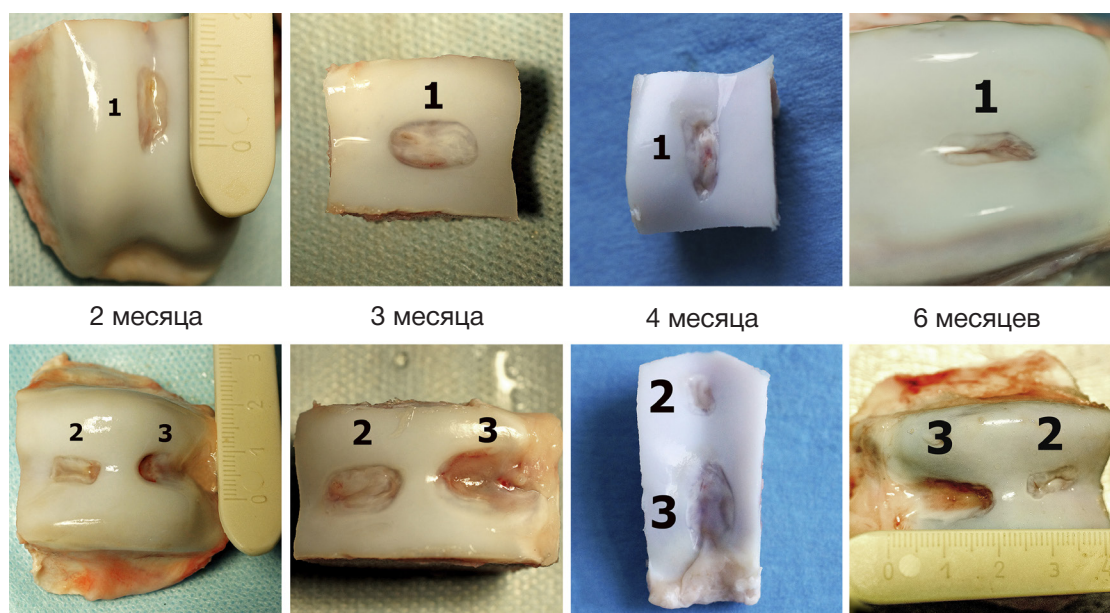


Рис. 2. Макропрепараты на различных сроках после операции. 1 — дефект № 1 после имплантации мембраны Ortokeer; 2 — дефект № 2 после имплантации мембраны Chondro-Gide; 3 — дефект № 3 — без имплантации мембран

заболевания не было. Все особи пребывали в изоляции за три недели до эксперимента, на дозированном кормлении. Исследование выполняли с использованием анальгетиков системного действия, применяемых в ветеринарии и клинической медицине в соответствующих для конкретного животного дозировках (ксилазин и др.). Глубину анестезии контролировали по системным реакциям: спонтанному дыханию, частоте сердечных сокращений, артериальному давлению, состоянию зрачка, пульсоксиметрии. Респираторную поддержку осуществляли при помощи наркозно-дыхательного аппарата, путем ингаляции кислородно-воздушной (газо-наркотической) смеси, состоящей из 75–85% кислорода, воздуха и 1,0–3,0 об.% изофлюрана (аеррана) по полузакрытому типу.

На суставах правых задних конечностей каждого животного с помощью круглого бора формировали по одному полнослойному дефекту хряща (дефект № 1) прямоугольной формы размером $1 \times 0,5$ см, достигающего до субхондральной кости (рис. 1А). Тонким сверлом диаметром 1,5 мм производили рассверливание

субхондральной кости на глубину 1 см, что позволяло обеспечить транспорт костного мозга на поверхность дефекта (рис. 1Б). Коллагеновую мембрану Ortokeer моделировали по форме и размеру дефектов и фиксировали к субхондральной кости с помощью фибринового клея (рис. 1В).

На суставах левых задних конечностей формировали по два дефекта: дефект (№ 2) — для имплантации мембраны Chondro Gide и контрольный дефект (№ 3) — без имплантации мембраны (рис. 1Г). Коллагеновую мембрану моделировали по форме и размеру дефекта. После рассверливания субхондральной кости на дефект № 2 наносили фибриновый клей и имплантировали коллагеновую мембрану Chondro-Gide (рис. 1Д). На контрольный дефект № 3 имплантацию мембраны не осуществляли (рис. 1Е).

Животных выводили из эксперимента в сроки 2, 3, 4, 6 месяцев после операции путем наркотизации (ксилазин 15 мл, золетил 1,5 мл внутримышечно) с последующим кровопусканием (пересечением сонных артерий).

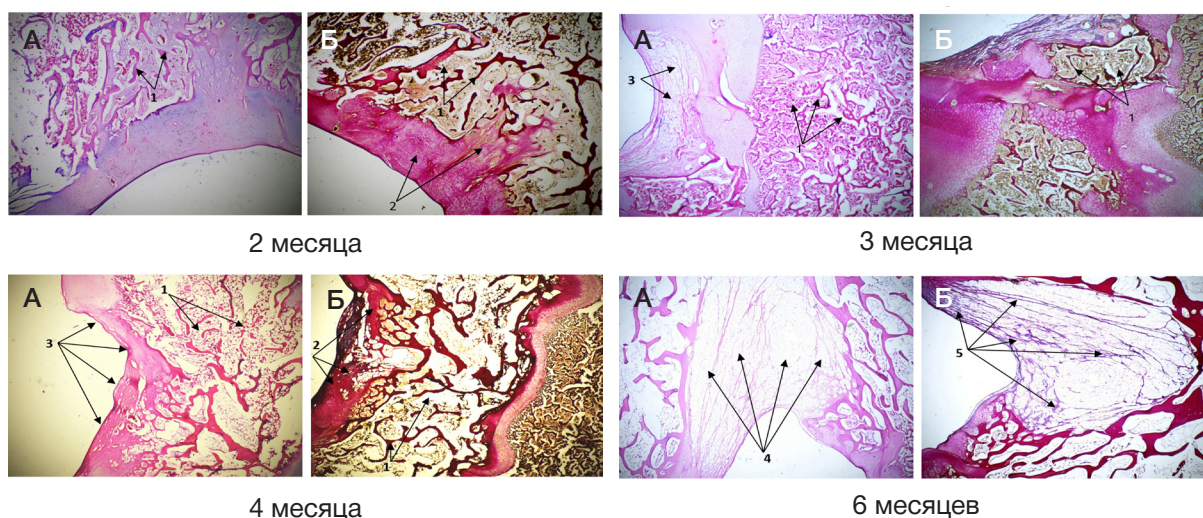


Рис. 3. Микроскопическое исследование дефекта № 3, контрольная группа; окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$ (А); окраска по методу Ван-Гизона, $\times 40$ (Б). 1 — остеодистрофия; 2 — грубоволокнистая соединительная ткань; 3 — формирующийся «кратерообразный» дефект в хрящевой и костной тканях; 4 — группы адипоцитов, заполняющие «кратерообразный» дефект; 5 — пучки коллагеновых волокон между островков адипоцитов

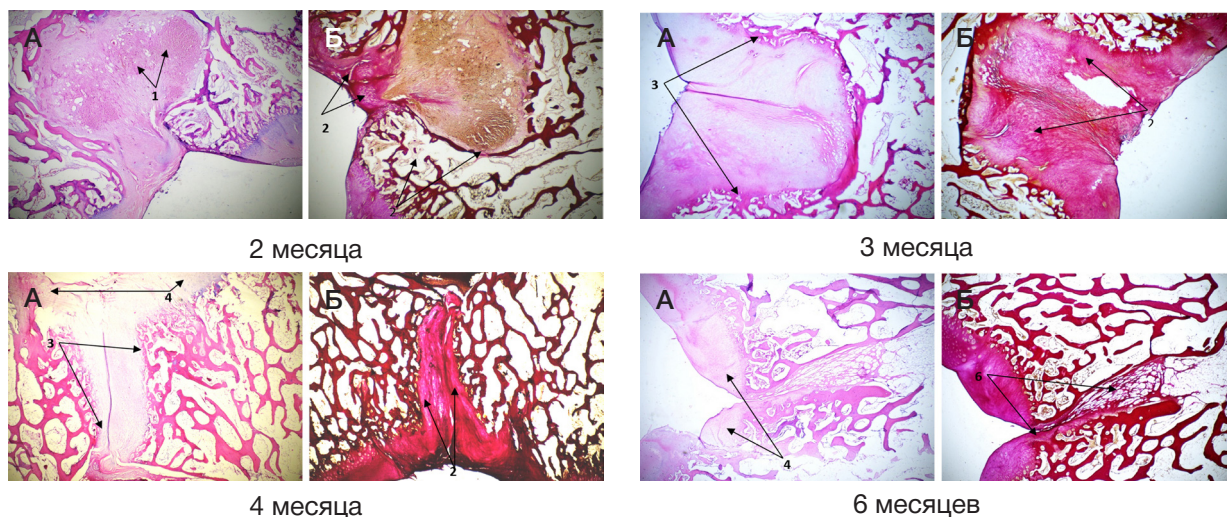


Рис. 4. Микроскопическое исследование дефекта № 1 после имплантации мембраны «Ortokeep»; окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$ (А); окраска по методу Ван-Гизона, $\times 40$ (Б). 1 — фибрин; 2 — грубоволокнистая соединительная ткань; 3 — формирующийся дефект цилиндрической формы, по краям активный неоостеогенез; 4 — неоондрогенез; 5 — резко уменьшенный дефект с щелевидной полостью по центру

Для последующего гистологического исследования предоставляли крупные костно-хрящевые фрагменты с расположенными на них исследуемыми дефектами. Для последующего микроскопического исследования из центральной части каждого дефекта производили забор одного фрагмента-биоптата.

Проводили щадящую кислотную декальцинацию костных фрагментов с последующей стандартной гистологической обработкой. Гистологические срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван-Гизона. Используя микроскоп с цифровой фотонасадкой разрешением 12 мегапикселей (Sony; Япония), с каждого гистологического среза производили микросъемку препарата (не менее 5 полей зрения); исследовали ответную воспалительную реакцию, структуру тканей, процентное соотношение тканей в области дефекта, состояние микроциркуляторного русла.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием статистических пакетов Statistica v.10 (StatSoft; США). Для проверки нормальности распределения в данной работе был использован критерий Шапиро–Уилка. Все описанные в работе параметры имели

распределение, близкое к нормальному. Для каждого параметра рассчитывали среднюю арифметическую (М), ошибку средней арифметической (m).

Достоверность различий между группами определяли с помощью параметрического критерия Фишера и непараметрического критерия Колмогорова–Смирнова. Различия считали достоверными при 95%-м пороге вероятности ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Макроскопическое исследование

При макроскопическом исследовании контрольной группы (дефект № 3, без имплантации мембран) было отмечено прогрессирующее увеличение его размеров без признаков регенерации хрящевой ткани на поверхности дефекта, вплоть до 6-месячного срока (рис. 2).

В то же время в экспериментальных группах (дефекты № 1 и 2) выраженное увеличение размеров дефекта не выявлено. Дно дефектов ровное, но не равномерное. При пальпации дно ткани на ощупь упруго-эластичное. Оба

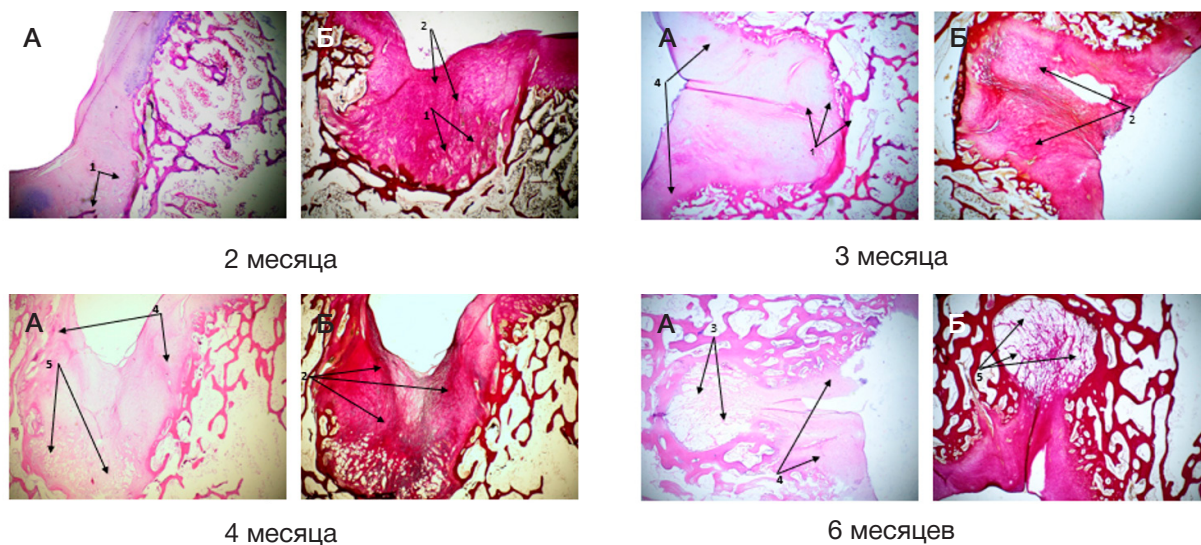


Рис. 5. Микроскопическое исследование дефекта № 2 после имплантации мембраны «Chondro-Gide»; окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$ (А); окраска по методу Ван-Гизона, $\times 40$ (Б). 1 — фибрин; 2 — грубоволокнистая соединительная ткань; 3 — формирующийся дефект колбообразной формы, по краям активный неоостеогенез; 4 — неоондрогенез; 5 — дно дефекта костной ткани, заполненное адипоцитами

дефекта покрыты жизнеспособной стабильной хрящевой тканью (см. рис. 2).

Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование в контрольной группе (дефект № 3) показало признаки прогрессирующей деструкции костной ткани и очень слабые признаки хондрогенеза, которые проявлялись только в непосредственной близости от интактного хряща (рис. 3).

При исследовании гистологических стекол после имплантации мембраны Ortokeep во всех сроках вывода воспалительный процесс и лейкоцитарная инфильтрация не выявлены. Четкая граница интактного хряща выявляется до срока 4 месяца, а на 6-м месяце она стирается. Отмечено, что подлежащая костная ткань подверглась значительной резорбции в непосредственной близости от дефекта. Но признаков остеодистрофии в окружающем губчатом веществе не выявлено (рис. 4).

На месте удаленного хряща и резорбированной костной ткани формировалась грубоволокнистая соединительная ткань. С первого срока вывода отмечены образование и созревание соединительной ткани и, как следствие, к 6-месячному сроку вывода — уменьшение ее объема (табл.). Параллельно по краям дефекта костной ткани происходили активные репаративные процессы костной ткани — неоостеогенез. Дефект первоначально имел колбообразную форму, но в дальнейшем приобретал

цилиндрическую форму и к 6 месяцам становился клиновидным. Со 2-го до 4-го месяца дефект в основном был заполнен грубой волокнистой тканью, а на 6-м месяце практически полностью закрылся костной тканью. Формирование хондроцитов (неохондрогенез) происходило активно и не только у края неповрежденного хряща, островки хондроцитов образовывались также по центру дефекта (см. рис. 4). В центре дефекта имелось глубокое щелевидное пространство, уходящее относительно глубоко в губчатое вещество.

При исследовании гистологических стекол после имплантации мембраны Chondro-Gide воспалительный процесс и лейкоцитарная инфильтрация не выявлены. Граница разрушенного хряща нечеткая. По центру на месте дефекта образовалась щелевидная полость, подлежащая костная ткань подверглась резорбции (глубина резорбции меньше по сравнению с контрольной группой), на месте резорбированной костной ткани сформировалась грубоволокнистая соединительная ткань с тенденцией к образованию костной ткани по краю дефекта и множественными островками хондроцитов в толще дефекта. Дефект имел колбообразную форму, и формирование неохондроцитов происходило активнее в направлении от периферии к центру. Имелись отдельные щелевидные полости в толще грубоволокнистой соединительной ткани. На дне дефекта между соединительной тканью и костной тканью сформировалась довольно выраженная прослойка, состоящая из жировых

Таблица. Размерные характеристики гистологического строения центра дефекта при различных видах вмешательств

	Группа	2 месяца (M ± m)	3 месяца (M ± m)	4 месяца (M ± m)	6 месяцев (M ± m)
Толщина интактного хряща, мкм	Контроль	734,0 ± 16,12	2247,5 ± 36,94	2359,8 ± 38,79	842,10 ± 21,23
	Chondro-Gide	1118,5 ± 21,81	1230,4 ± 23,99	1291,9 ± 25,19	838,67 ± 19,12
	Ortokeep	1519,0 ± 38,42	1670,5 ± 42,26	1341,3 ± 25,08	886,35 ± 10,44
Толщина хряща в центре вмешательства, мкм	Контроль	0	0	0	0
	Chondro-Gide	0	503,9 ± 22,74	571,4 ± 29,96	252,68 ± 12,19
	Ortokeep	0	534,0 ± 36,42	657,1 ± 34,46	335,94 ± 13,47
Толщина соединительной ткани в области имплантации, мкм	Контроль	1635,2 ± 187,33	1152,2 ± 124,80	1094,6 ± 118,56	2406,98 ± 178,05
	Chondro-Gide	1648,2 ± 137,34	1615,2 ± 134,60	1534,5 ± 127,87	900,58 ± 72,43
	Ortokeep	2072,0 ± 339,89	1968,6 ± 322,90	2905,7 ± 204,92	1688,66 ± 71,60
Толщина кортикальной пластинки в интактной области, мкм	Контроль	162,9 ± 6,33	121,9 ± 7,27	134,0 ± 8,00	53,22 ± 4,08
	Chondro-Gide	162,2 ± 8,37	181,6 ± 9,38	199,8 ± 10,32	102,18 ± 6,60
	Ortokeep	181,0 ± 9,92	198,6 ± 10,91	226,0 ± 12,03	84,53 ± 5,15
Толщина кортикальной пластинки в центре вмешательства, мкм	Контроль	121,6 ± 7,73	96,8 ± 5,53	106,5 ± 6,08	147,54 ± 18,67
	Chondro-Gide	140,4 ± 13,67	157,3 ± 15,31	173,0 ± 16,84	184,76 ± 5,48
	Ortokeep	149,0 ± 11,01	164,4 ± 12,11	163,9 ± 14,81	142,66 ± 19,93
Объем костной ткани, %	Контроль	18,9 ± 0,63	18,5 ± 0,62	20,4 ± 0,68	10,42 ± 0,67
	Chondro-Gide	16,3 ± 0,28	19,2 ± 0,33	21,1 ± 0,36	17,41 ± 0,36
	Ortokeep	27,0 ± 0,67	29,8 ± 0,73	27,1 ± 0,57	30,23 ± 0,34
Объем хрящевой ткани, %	Контроль	15,4 ± 0,51	22,4 ± 0,74	24,6 ± 0,82	10,64 ± 0,38
	Chondro-Gide	23,1 ± 0,29	25,8 ± 0,33	28,4 ± 0,36	15,04 ± 0,72
	Ortokeep	27,0 ± 0,57	29,4 ± 0,63	32,1 ± 1,88	19,99 ± 0,43
Объем соединительной ткани, %	Контроль	53,3 ± 0,70	52,3 ± 0,69	44,4 ± 0,58	13,31 ± 1,04
	Chondro-Gide	53,2 ± 0,50	40,4 ± 0,48	34,4 ± 0,41	17,03 ± 0,56
	Ortokeep	43,0 ± 0,47	33,7 ± 0,47	31,2 ± 0,46	18,19 ± 0,53
Объем кровеносных сосудов, %	Контроль	5,8 ± 0,16	7,1 ± 0,20	6,8 ± 0,19	8,39 ± 0,42
	Chondro-Gide	7,5 ± 0,45	8,9 ± 0,53	8,4 ± 0,50	11,91 ± 0,42
	Ortokeep	9,0 ± 0,36	9,5 ± 0,40	10,7 ± 0,83	12,79 ± 0,65

клеток. Процессы неоангиогенеза выраженные. В толще соединительной ткани формировались также островки хондроцитов, но в отличие от дефекта № 1 островки хондроцитов отмечены ближе к формирующейся костной мозоли (рис. 5).

При анализе результатов измерений отмечено, что в центре области вмешательства у контрольной группы новообразованный хрящ так и не появлялся во всех сроках исследования (табл.). В группах 1 и 2 на 2-м месяце исследования хрящ также не выявлен. Но уже с 3-го месяца исследования хрящ выявлялся и отмечена тенденция к статистически достоверному ($p < 0,05$) увеличению его толщины вплоть до 4-го месяца (в группе 1 — на 18,7% ($657,1 \pm 34,46$ мкм), в группе 2 — на 12,8% ($571,4 \pm 29,96$ мкм)). Однако к 6 месяцам толщина статистически достоверно ($p < 0,05$) уменьшалась в группе 1 — на 51,1%, в группе 2 — на 44,2% ($335,94 \pm 13,47$ мкм и $252,68 \pm 12,19$ мкм соответственно), что связано скорее всего с «организацией» хрящевой ткани. Данный факт подчеркивает эффективность применения мембран.

Толщина соединительной ткани в контрольной группе к 6-месячному сроку увеличилась на 32,1% ($p < 0,05$), тогда как в группах 1 и 2 уменьшилась ($p < 0,05$) на 18,5% ($1688,66 \pm 71,60$ мкм) и 46,4% ($900,58 \pm 72,43$ мкм) соответственно. Уменьшение толщины соединительной ткани свидетельствует о репаративных процессах в области вмешательства. Столь бурная динамика уменьшения толщины соединительной ткани в группе 2 обусловлена замещением ее жировой тканью. Данный факт несколько ухудшает конечный процесс восполнения костной ткани.

Толщина кортикальной пластинки в области вмешательства в контрольной группе и группе 2 к 6-месячному сроку увеличивалась ($p < 0,05$) на 17,6 и 24,0% соответственно, тогда как в группе 1 толщина кортикальной пластинки с 2-месячного срока до 6-месячного срока наоборот уменьшилась ($p > 0,05$) на 4,3%. Увеличение толщины кортикальной пластинки происходило в основном за счет новообразованной ткани (остеоида). В последующем происходило ее созревание с формированием зрелой ткани, при этом «созревание» костной ткани начиналось быстрее в группе 1, что говорит о более благоприятных условиях в области вмешательства.

Вышеописанные изменения в зонах вмешательства подтверждаются данными процентного соотношения компонентов, представленных в таблице.

Стоит также отметить процессы неоангиогенеза. Во всех группах был отмечен статистически достоверный ($p < 0,05$) прирост общей площади кровеносных сосудов. Но наиболее быстрый прирост выявлен в первой группе

(до $12,79 \pm 0,65$ %), что свидетельствует о лучшей трофике тканей, расположенных в области вмешательства. В группе 2 площадь соединительной ткани увеличилась до $11,91 \pm 0,42$ %.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Показанная низкая эффективность одной лишь туннелизации субхондральной кости ставит под сомнение целесообразность выполнения подобных операций в клинической практике, что подтверждают исследования других авторов [1]. Высокая эффективность коллагеновых мембран для регенерации хрящевой ткани, отмеченная в нашем исследовании, соответствует результатам, полученным другими авторами [1–4]. К сожалению, корректно сопоставить цифровые значения не представляется возможным, так как в приведенных работах использовали разные биомодели. Представляется также важным изучить данные с более отдаленными результатами и провести исследование с различными по составу мембранами.

ВЫВОДЫ

Оба исследуемых материала (коллагеновые мембраны Ortokeep и Chondro-Gide) показали отличные результаты в регенерации полнослойного дефекта хряща. В обеих группах были получены практически идентичные макро- и микроскопические результаты. Однако более детальный анализ данных гистологического исследования выявил следующие особенности: 1) в обеих группах зона имплантации коллагеновых мембран была представлена волокнистой соединительной тканью с включениями хондроцитов; 2) коллагеновые мембраны в месте дефекта создавали более благоприятные условия для репаративных процессов, что подтверждается самыми короткими сроками закрытия дефекта собственной соединительной тканью; 3) созревание соединительной ткани протекало в более короткие сроки; 4) в зоне имплантации мембран хондрогенез протекал по «рассыпному» типу — в сформированной грубоволокнистой соединительной ткани появлялись «островки» гиалинового хряща, которые выявлялись уже на 3 месяце эксперимента, первоначально располагались на удалении друг от друга, но имели тенденцию к слиянию между собой в последующие сроки вывода из эксперимента; процессы неоангиогенеза протекали не только на границе со здоровой тканью, но и в толще соединительно-тканной мозоли; 5) эффективность применения коллагеновых мембран подтверждают цифровые значения объема костной и хрящевой тканей.

Литература

1. Гаркави А. В., Блоков М. Ю. Артроскопическая хондропластика локальных хрящевых дефектов коленного сустава с использованием коллагеновой мембраны Chondro-Gide. Кафедра травматологии и ортопедии. 2015; 15 (3): 4–7.
2. Gao L, Orth P, Cucchiari M, Madry H. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. Am J Sports Med. 2019; 47 (1): 222–31.
3. Benthien JP, Behrens P. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. Cartilage. 2010; 1 (1): 65–8.
4. Girolamo L, Schönhuber HI, Vigano M, et al. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) and AMIC Enhanced by Autologous Concentrated Bone Marrow Aspirate (BMAC) Allow for Stable Clinical and Functional Improvements at up to 9 Years Follow-Up: Results from a Randomized Controlled Study. Journal of Clinical Medicine. 2019; 8 (3): 392–405.
5. Kon E, Filardo G, Brittberg M, Busacca M, et al. Multilayer biomaterial for osteochondral regeneration shows superiority vs microfractures for the treatment of osteochondral lesions in a multicentre randomized trial at 2 years. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy. 2018; 26 (2): 2704–15.
6. Егиазарян К. А., Лазишвили Г. Д., Храменкова И. В., Шпак М. А.,

Бадриев Д. А. Алгоритм хирургического лечения больных с рассекающим остеохондритом коленного сустава. Вестник РГМУ. 2018; 2: 77–83.

7. Лазишвили Г. Д., Егиазарян К. А., Ратьев А. П., Гордиенко Д. И.,

Бут-Гусаим А. Б., Чуловская И. Г., и др. Гибридная костно-хрящевая трансплантация — инновационная технология для хирургического лечения обширных костно-хрящевых дефектов коленного сустава. Хирургическая практика. 2019; 40 (4): 10–18.

References

1. Garkavi AV, Blokov MYu. Artroskopicheskaja hondroplastika lokal'nyh hrjashhevyyh defektov kolennogo sustava s ispol'zovaniem kollagenovoj membrany Chondro-Gide. Kafedra travmatologii i ortopedii. 2015; 15 (3): 4–7. Russian.
2. Gao L, Orth P, Cucchiariini M, Madry H. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. Am J Sports Med. 2019; 47 (1): 222–31.
3. Benthien JP, Behrens P. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. Cartilage. 2010; 1 (1): 65–8.
4. Girolamo L, Schönhuber HI, Vigano M, et al. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) and AMIC Enhanced by Autologous Concentrated Bone Marrow Aspirate (BMAC) Allow for Stable Clinical and Functional Improvements at up to 9 Years Follow-Up: Results from a Randomized Controlled Study. Journal of Clinical Medicine. 2019; 8 (3): 392–405.
5. Kon E, Filardo G, Brittberg M, Busacca M, et al. Multilayer bio-material for osteochondral regeneration shows superiority vs microfractures for the treatment of osteochondral lesions in a multicentre randomized trial at 2 years. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy. 2018; 26 (2): 2704–15.
6. Егиазарян КА, Лазишвили ГД, Храменкова ИВ, Шпак МА, Бадриев ДА. Knee osteochondritis desiccans: surgery algorithm. Bulletin of RSMU. 2018; 2: 73–80. Russian.
7. Lazishvili GD, Egiazarjan KA, Ratev AP, Gordienko DI, But-Gusaim AB, Chulovskaja IG, i dr. Gibrdnaja kostno-hrjashhevaja transplantacija — innovacionnaja tehnologija dlja hirurgicheskogo lechenija obshirnyh kostno-hrjashhevyyh defektov kolennogo sustava. Hirurgicheskaja praktika. 2019; 40 (4): 10–18. Russian.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АМИЛОИДНЫХ СКОПЛЕНИЙ В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА

В. В. Гусельникова^{1,2}✉, Д. А. Суфиева¹, Д. Л. Цыба¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В последнее время метод флуоресцентной микроскопии приобретает все большее распространение, открывая новые возможности для решения целого ряда задач экспериментальной биологии и медицины. Целью настоящей работы было оценить эффективность применения метода флуоресцентной микроскопии для идентификации амилоидных скоплений в тканях человека. В качестве материала для исследования были использованы фрагменты миокарда ($n = 12$) и коры головного мозга ($n = 8$) людей обоих полов в возрасте от 60 до 98 лет с верифицированным амилоидозом. Препараты окрашивали с применением 11 разных гистохимических красителей с последующим анализом методами световой и флуоресцентной микроскопии. Проведенные качественный и количественный анализ показали, что тиофлавин Т является наиболее эффективным красителем для флуоресцентного выявления β - и транстиретинового амилоида в тканях человека. Методика окраски конго красным обладает высокой эффективностью в отношении транстиретинового амилоидоза, но плохо подходит для идентификации β -амилоидных бляшек. Установлено, что способность конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидными фибриллами может быть использована для верификации амилоидных скоплений вместо традиционной поляризационной микроскопии. Впервые отмечено, что краситель метиловый фиолетовый обладает способностью специфично связываться с β -амилоидными скоплениями с формированием флуоресцирующего комплекса, одновременно подавляя автофлуоресценцию нервной ткани. Это делает методику окраски метиловым фиолетовым перспективной для диагностики патологии альцгеймеровского типа.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, амилоид, амилоидные бляшки, гистохимия, конго красный, тиофлавин, метиловый фиолетовый

Вклад авторов: В. В. Гусельникова — анализ литературы, планирование исследования, окраска препаратов, анализ и интерпретация результатов, подготовка черновика рукописи; Д. А. Суфиева — количественный анализ данных; Д. Л. Цыба — количественный анализ данных; Д. Э. Коржевский — разработка концепции, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013) и одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/18 от 22 ноября 2018 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Владимировна Гусельникова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376; Guseynicova.Valeria@yandex.ru

Статья получена: 12.07.2021 **Статья принята к печати:** 25.07.2021 **Опубликована онлайн:** 31.07.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.034

FLUORESCENCE DETECTION OF AMYLOID DEPOSITS IN HUMAN TISSUES USING HISTOCHEMICAL DYES

Guseynikova VV^{1,2}✉, Sufieva DA¹, Tsyba DL¹, Korzhevskii DE¹

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Recently, fluorescence microscopy becomes more available, presenting new opportunities to face several challenges of experimental biology and medicine. The study was aimed to assess the effectiveness of fluorescence microscopy for the identification of amyloid deposits in human tissues. Post-mortem samples of the myocardium ($n = 12$) and cerebral cortex ($n = 8$) obtained from subjects of both sexes aged 60–98 with verified amyloidosis were used as a material for the study. The specimens were stained using 11 different histochemical dyes and subsequently analyzed by light and fluorescence microscopy. Qualitative and quantitative analysis has shown that Thioflavin T is the most effective stain for fluorescence detection of β - and transthyretin amyloid in human tissues. Congo red staining is highly effective for the detection of transthyretin amyloidosis, however, it is ill-suited for the identification of β -amyloid plaques. It has been found that the ability of Congo red to exhibit fluorescence when binding to amyloid fibrils can be used for verification of amyloid deposits instead of the traditional polarized light microscopy. As has been first noted, methyl violet can selectively bind to β -amyloid with fluorescent complex formation. In addition, methyl violet treatment effectively reduces the autofluorescent background in the nervous tissue. This makes methyl violet staining a promising diagnostic tool for Alzheimer's-type pathology.

Keywords: fluorescence microscopy, amyloid, amyloid plaques, histochemistry, congo red, thioflavin, methyl violet

Author contribution: Guseynikova VV — literature analysis, study planning, staining specimens, analysis and interpretation of the results, manuscript draft writing; Sufieva DA — quantitative data analysis; Tsyba DL — quantitative data analysis; Korzhevskii DE — conceptual development, study planning, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in accordance with the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki (2013) and approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol № 3/18 dated November 22, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guseynikova
Acad. Pavlova, 12, Saint Petersburg, 197376; Guseynicova.Valeria@yandex.ru

Received: 12.07.2021 **Accepted:** 25.07.2021 **Published online:** 31.07.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.034

В последние годы при проведении морфологических исследований все шире применяют метод флуоресцентной микроскопии. Появление этого метода в арсенале исследователей и его быстрое внедрение в клинико-диагностическую практику открывает новые возможности для решения целого ряда задач экспериментальной биологии и медицины. Одной из таких задач является совершенствование методов морфологической диагностики амилоидозов.

Амилоидозы — это группа конформационных заболеваний, общим признаком которых является внеклеточное отложение в органах и тканях нерастворимых патологических фибриллярных белков, амилоидов [1]. Амилоидоз представляет собой тяжелое заболевание с высоким уровнем летальности, при этом наиболее злокачественные формы развиваются у лиц трудоспособного возраста. Накопление амилоида в разных органах (сердце, почках, печени,

легких, желудочно-кишечном тракте и др.) приводит к нарушению их функции и может стать причиной развития кардиомиопатии, сердечной и почечной недостаточности, тромбоза печеночных вен и т. д. Накопление амилоида в мозге является гистопатологическим признаком таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [2–4]. Дифференциальная диагностика амилоидозов сильно затруднена вследствие большого разнообразия клинических проявлений и отсутствия патогномоничных симптомов. В настоящее время наиболее надежным методом диагностики остается гистологическое исследование образцов тканей с применением красителя Конго красного и последующим исследованием препаратов методами световой и поляризационной микроскопии [5]. Однако применение такого подхода нередко приводит к получению ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов [6], что указывает на несовершенство существующей методической базы. Это обуславливает актуальность проблемы поиска новых подходов к улучшению качества морфологической диагностики амилоидозов. Определенный вклад в решение этой задачи может внести применение метода флуоресцентной микроскопии. В настоящее время многие клиничко-диагностические центры оснащены флуоресцентными микроскопами, что позволяет им использовать флуоресцентные свойства ряда красителей в диагностических целях, в том числе для диагностики амилоидозов.

Целью работы было оценить эффективность применения метода флуоресцентной микроскопии для идентификации амилоидных скоплений в тканях человека.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования были использованы фрагменты миокарда ($n = 12$) и коры головного мозга ($n = 8$) пациентов обоих полов (четверо мужчин и восемь женщин, трое мужчин и пять женщин соответственно) в возрасте от 60 до 98 лет с иммуногистохимически детектированным амилоидозом. Критерии включения: присутствие иммунопозитивных β -амилоидных бляшек в коре головного мозга и скоплений агрегированного транстиретина в миокарде. Критерии исключения: выраженные посмертные аутолитические изменения в ткани мозга или миокарда.

Для верификации присутствия амилоидных скоплений применяли кроличьи поликлональные ОС-антитела (Anti-

Amyloid Fibrils OC Antibody) к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл (разведение 1:1000, кат. номер AB2286, Sigma-Aldrich; США) и мышинные моноклональные (клон TA5F4) антитела к агрегированному транстиретину (разведение 1:600, кат. номер 848102, BioLegend; США).

Материал получен из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ». Образцы фиксировали в 10%-ом формалине и заливали в парафин. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5, 7 и 14 мкм. Чтобы оценить возможность использования гистохимических красителей для флуоресцентного выявления амилоидов, препараты коры головного мозга и миокарда человека окрашивали с применением ряда гистохимических красителей (табл. 1).

Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems; Германия) и флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems; Германия), оснащенного системой фильтров флуоресценции от 340 до 560 нм. Система фильтров состояла из следующих возбуждающих фильтров: BP=340–380 нм (первый — «А»), BP=450–490 нм (второй — «I3») и BP=515–560 нм (третий — «N2,1»).

Подсчет количества выявленных разными методами амилоидных бляшек проводили на серийных срезах коры головного мозга одного и того же случая. Подсчет осуществляли три разных исследователя в идентичных условиях, используя объектив $\times 40$. Так как распределение амилоидных бляшек в нервной ткани характеризуется выраженной неравномерностью, подсчет проводили по всей площади среза ($0,67 \text{ см}^2$) с последующим пересчетом на см^2 . В качестве контрольного значения использовали количество амилоидных бляшек, выявленных при использовании иммунофлуоресцентной реакции. Для этого применяли мышинные моноклональные (клон DE2B4) антитела к β -амилоиду (разведение 1:200, кат. номер ab11132, Abcam; Великобритания); в качестве вторичных реагентов использовали биотинилированный антимышинный Fab-фрагмент иммуноглобулина ослы (Jackson ImmunoResearch; США) и конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США).

Статистический анализ полученных данных выполнен в программе GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc.; США). Для сравнения показателей использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп (тиофлавин Т, конго красный, метиловый фиолетовый) с контролем (иммуногистохимия) с помощью post hoc критерия Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Перечень использованных красителей

Название красителя	Фирма и страна-производитель	Использованный для окраски раствор красителя
Конго красный	Sigma, США	0,1%-й водный раствор
Тиофлавин Т	Fluka, США	1%-й водный раствор
Альциановый синий	BioVitrum, Россия	Коммерческий раствор
Толуидиновый синий	Acros Organics, США	1%-й спиртовой раствор
Метиловый фиолетовый	Pr. G. Grubler, Германия	0,1%-й водный раствор
Метиленовый зеленый	Ferak Berlin, Германия	0,1%-й водный раствор
Эозин Y спиртовой	BioVitrum, Россия	Коммерческий раствор
Янус зеленый	Merck, Германия	0,1%-й водный раствор
Пиронин G	British Drug Houses, Великобритания	0,1%-й водный раствор
Фуксин основной	Serva, Германия	0,1%-й водный раствор
Нейтральный красный	National Aniline Division, США	0,1%-й водный раствор

Таблица 2. Результаты окраски β -амилоида в коре головного мозга человека

Краситель	Цвет амилоидных скоплений при наблюдении в проходящем свете	Флуоресценция амилоидных скоплений
Конго красный	Розово-красный	+
Тиофлавин Т	–	+
Альциановый синий	Синий	–
Толуидиновый синий	–	–
Метиловый фиолетовый	–	+
Метиленовый зеленый	–	–
Эозин Y	Светло-розовый	–
Янус зеленый	–	–
Пиронин G	–	–
Фуксин основной	–	–
Нейтральный красный	–	–

Данные представляли в следующем формате: среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность применения гистохимических красителей для флуоресцентного выявления амилоидных скоплений

Результаты применения разных гистохимических красителей для идентификации скоплений β -амилоида и транстиретинового амилоида с использованием методов световой и флуоресцентной микроскопии представлены в табл. 2 и 3 соответственно.

Способность связываться с амилоидными фибриллами с формированием флуоресцирующего комплекса характерна для трех красителей — тиофлавина Т (ThT), конго красного и метилового фиолетового.

При окраске ThT амилоидные бляшки в коре головного мозга хорошо визуализируются уже на малом увеличении микроскопа ($\times 10$). Выявленные скопления имеют вид компактных очаговых образований, флуоресцирующих в синем диапазоне спектра (рис. 1А). Амилоидные бляшки характеризуются морфологической гетерогенностью, которая выражается в том, что для одних бляшек характерно наличие интенсивно флуоресцирующего плотного центра округлой формы и расположенного вокруг него волокнистого ореола (рис. 1А; *стрелка 1*), при этом другие бляшки выглядят как скопления, сформированные

только волокнистыми структурами (рис. 1А; *стрелка 2*). Флуоресценция характерна для амилоидных бляшек обоих морфологических типов. При окраске ThT они визуализируются с одинаковой эффективностью (рис. 1А). Анализ препаратов выявил присутствие небольшой фоновой флуоресценции ядер клеток и автофлуоресценции липофусцина — пигмента, накапливающегося в нейронах при старении.

Транстиретиновый амилоид в миокарде человека при окраске ThT также характеризуется интенсивной флуоресценцией в синем диапазоне спектра (рис. 1Б). Как и в случае изучения препаратов коры головного мозга, в миокарде было отмечено присутствие фоновой флуоресценции ядер клеток (рис. 1Б, *головка стрелки, бирюзовый цвет*) и автофлуоресценции липофусцина (рис. 1Б, *короткая стрелка, оранжевый цвет*), накопление которого характерно не только для нейронов, но и для кардиомиоцитов. Важно отметить, что, хотя цвет флуоресценции неамилоидных компонентов ткани отличается от цвета флуоресценции связавших ThT амилоидных фибрилл, присутствие дополнительных флуоресцирующих элементов затрудняет идентификацию амилоидных скоплений и их количественный анализ.

Анализ препаратов, окрашенных конго красным, с помощью флуоресцентного микроскопа показал, что конгофильные амилоидные скопления в тканях человека флуоресцируют в красном диапазоне спектра (рис. 1В, Г). При изучении препаратов коры головного мозга было отмечено, что после окраски конго красным амилоидные бляшки выявляются не во всех исследованных образцах.

Таблица 3. Результаты окраски транстиретинового амилоида в миокарде человека

Краситель	Цвет амилоидных скоплений при наблюдении в проходящем свете	Флуоресценция амилоидных скоплений
Конго красный	Розово-красный	+
Тиофлавин Т	–	+
Альциановый синий	Синий	–
Толуидиновый синий	Светло-фиолетовый	–
Метиловый фиолетовый	Насыщенно-фиолетовый	–
Метиленовый зеленый	–	–
Эозин Y	Светло-розовый	–
Янус зеленый	Серо-фиолетовый	–
Пиронин G	Светло-розовый	–
Фуксин основной	Красный	–
Нейтральный красный	Темно-красный	–

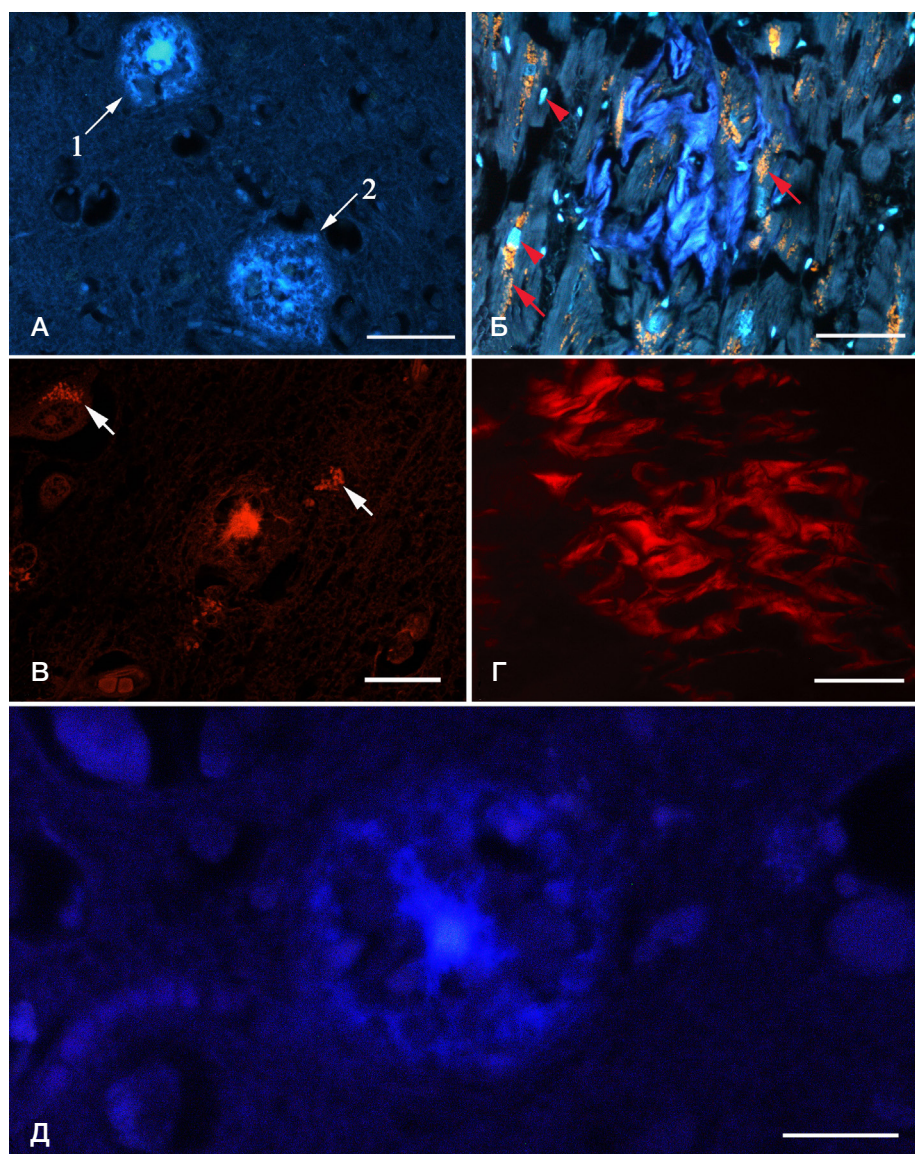


Рис. 1. Флуоресцентное выявление амилоидных скоплений в коре головного мозга (А, В, Д) и миокарде (Б, Г) человека. Окраска тиофлавином Т (А, Б), конго красным (В, Г) или метиловым фиолетовым (Д). Стрелка 1 указывает на амилоидную бляшку с центральным плотным ядром, стрелка 2 — на волокнистую амилоидную бляшку (без плотного центра), короткая стрелка — на скопление липофусцина, головка стрелки — на клеточное ядро. Масштабный отрезок равен 50 мкм (А, Б, Г) и 20 мкм (В, Д)

Лишь в трех проанализированных случаях из восьми в тканях мозга были идентифицированы единичные конгофильные скопления. Наиболее высокой интенсивностью флуоресценции при окраске конго красным обладает плотное центральное ядро амилоидной бляшки. Периферический волокнистый ареол плохо визуализируется. Бляшки, не имеющие компактного центра, значительно хуже различимы по сравнению с бляшками, имеющими ярко флуоресцирующую центральную область. Было также отмечено присутствие значительной фоновой флуоресценции (в красном диапазоне спектра) ядер клеток коры головного мозга, эритроцитов и липофусцина (рис. 1В).

При изучении препаратов миокарда, окрашенных конго красным, амилоидные скопления выглядели как волокнистые агрегаты разного размера, локализованные в интерстициальном пространстве миокарда и интенсивно флуоресцирующие в красном диапазоне (рис. 1Г). Было отмечено присутствие автофлуоресценции липофусцина, которая сильно затрудняла идентификацию амилоидных скоплений, особенно в случае накопления большого количества этого пигмента кардиомиоцитами.

При анализе препаратов, окрашенных метиловым фиолетовым, с помощью флуоресцентного микроскопа было обнаружено, что в данном случае амилоидные бляшки интенсивно флуоресцировали в синем диапазоне спектра (рис. 1Д). При этом фоновая флуоресценция ткани полностью отсутствовала. Наблюдалось лишь слабое темно-малиновое окрашивание нервной ткани, что усиливало контрастность выявления амилоидных бляшек (рис. 1Д). Полное отсутствие фоновой флуоресценции значительно облегчало идентификацию амилоидных бляшек. Бляшки с плотным центральным ядром и бляшки без него визуализировались одинаково эффективно. Интересно, что транстретиновый амилоид в миокарде человека не флуоресцирует при окраске метиловым фиолетовым (в отличие от амилоидных бляшек в коре головного мозга), хотя при наблюдении окрашенных препаратов в проходящем свете амилоидные депозиты в миокарде четко визуализируются за счет метакроматической окраски амилоида в насыщенный фиолетовый цвет (рис. 2А).

Интересной находкой в рамках проведенного исследования стала окраска транстретинового амилоида

миокарда основным фуксином. При использовании этого красителя амилоидные скопления приобретают насыщенный красный цвет при наблюдении в проходящем свете (рис. 2Б). По нашим данным, ранее способность основного фуксина метакрохроматически окрашивать амилоид описана не была.

Количественный анализ амилоидных бляшек, выявляемых с использованием разных красителей

В ходе анализа препаратов коры головного мозга человека было отмечено, что визуальное количество выявляемых амилоидных бляшек сильно варьирует в зависимости от выбранной методики окраски. В связи с этим было проведено количественное исследование, которое заключалось в подсчете амилоидных бляшек тремя разными исследователями на препаратах одного и того же случая, окрашенных разными красителями. Результаты проведенного количественного анализа представлены на рис. 3. Полученные результаты были сопоставлены с результатами иммуногистохимической реакции на β -амилоидные фибриллы как наиболее чувствительного метода идентификации амилоидных бляшек.

Из представленной гистограммы видно, что количество амилоидных бляшек, выявляемых при использовании любого гистохимического красителя, значительно меньше по сравнению с количеством иммунопозитивных бляшек. Среднее количество выявляемых методом иммунофлуоресценции амилоидных бляшек в образце, взятом для количественного анализа, составило $1106 \pm 76,72$ на см^2 ткани мозга. Наименьшие количественные различия с группой контроля наблюдались при окрашивании срезов ThT. При применении такой окраски среднее количество амилоидных бляшек составило $810,9 \pm 44,49$ на см^2 . Наибольшие различия с группой контроля наблюдались при использовании конго красного: количество визуализируемых бляшек составило $268,1 \pm 15,34$ на см^2 . Среднее количество бляшек при окраске метиловым фиолетовым было $399,0 \pm 60,03$ на см^2 , что являлось промежуточным значением между результатами использования ThT и конго красного.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Способность формировать флуоресцирующие комплексы при связывании с клеточными и тканевыми структурами ранее была показана для целого ряда гистохимических красителей. Так, флуоресцентные свойства эозина применяются для визуализации эластических волокон [7], оценки повреждения печени [8], морфологической оценки состояния селезенки [9], изучения структуры и функционального состояния пародонта [10]. Основным фуксин также обладает способностью флуоресцировать при связывании с эластическими волокнами [11]. В связи с этим поиск среди известных гистохимических красителей новых флуоресцентных зондов, специфичных в отношении амилоидных фибрилл, может способствовать разработке новых диагностических подходов для выявления амилоидозов.

Окраска срезов ThT является наиболее известным способом флуоресцентного выявления амилоида. Показано, что молекулы этого красителя способны специфично встраиваться в β -складчатую структуру амилоидных фибрилл. По мнению исследователей, такое встраивание блокирует вращение диметиламинобензольного кольца

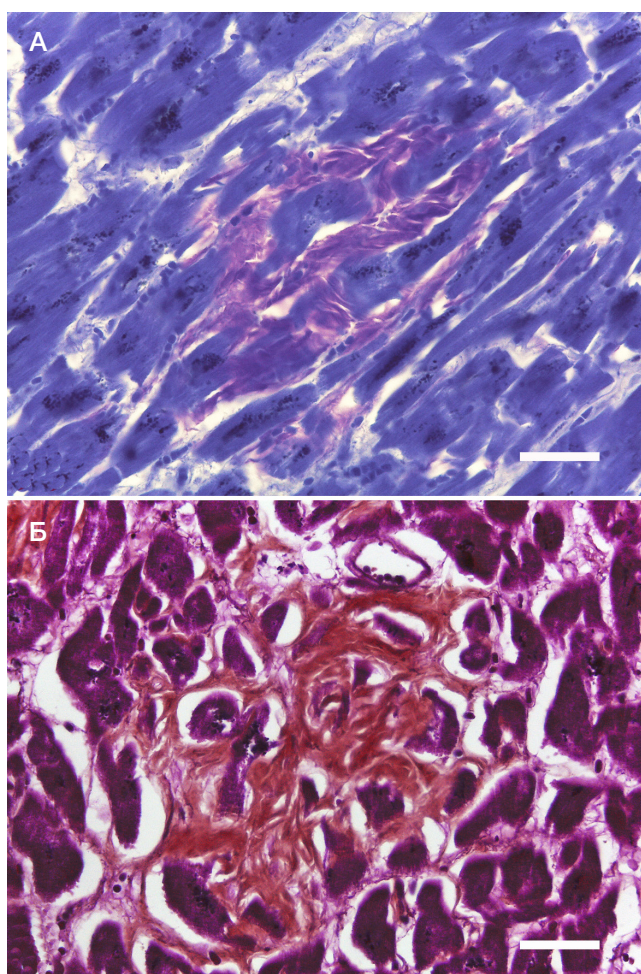


Рис. 2. Метахроматическая окраска транстиретинового амилоида в миокарде человека. А. Окраска метиловым фиолетовым. Б. Окраска основным фуксином. Масштабный отрезок равен 50 мкм

относительно бензотиазольного в молекуле красителя, вследствие чего происходит значительное (в тысячи раз) увеличение квантового выхода его флуоресценции [12]. Согласно литературным данным, при связывании ThT с амилоидными фибриллами имеют место сдвиг максимума его возбуждения с 385 нм до 450 нм и сдвиг максимума эмиссии с 445 нм до 482 нм [13]. В связи с этим флуоресценцию окрашенных ThT амилоидных скоплений принято оценивать в «зеленом» диапазоне спектра (с использованием возбуждающего фильтра «I3» BP=450–490 нм). Наши исследования свидетельствуют о том, что окраска ThT является эффективным методом визуализации β - и транстиретинового амилоидоза у человека. Интересно, что после окраски срезов коры головного мозга и миокарда человека ThT мы наблюдали интенсивную флуоресценцию амилоидных скоплений не только в «зеленой», но и в «синей» части спектра (при использовании возбуждающего фильтра BP=340–380 нм). Причем в этом случае автофлуоресцирующие элементы нервной и мышечной ткани (липофусцин, накапливающийся в нейронах и кардиомиоцитах при старении, NADPH, содержащийся в митохондриях, и др.) имеют цвет, отличный от цвета флуоресценции окрашенных ThT амилоидных фибрилл. Это значительно увеличивает контрастность выявления амилоида.

Несмотря на то что ThT способен избирательно взаимодействовать с белками в состоянии амилоидных фибрилл, образуя при этом интенсивно флуоресцирующий

комплекс, для клинической диагностики его применяют значительно реже, чем другой краситель со сходным механизмом действия, конго красный. В настоящее время именно окраска конго красным является «золотым стандартом» выявления амилоида. Ее широко применяют в научных исследованиях и клинко-диагностической практике [14, 5]. Как и ThT, конго красный обладает свойством встраиваться в β -складчатый слой амилоидных фибрилл, при этом приобретая способность поворачивать плоскость поляризации света. Поэтому для подтверждения природы обнаруженных конгофильных скоплений традиционно применяют метод поляризационной микроскопии [14]. Однако цвет свечения конгофильных скоплений в поляризованном свете может сильно варьировать, что значительно усложняет интерпретацию полученных результатов [15].

Нами было показано, что для верификации скоплений амилоида после окраски конго красным вместо микроскопии в поляризованном свете может быть рекомендовано использование флуоресцентной микроскопии. Способность конго красного флуоресцировать при связывании с фибриллами амилоида была описана еще в 1959 г. [16], однако в то время использование флуоресцентных свойств конго красного не нашло широкого применения. Вероятно, это обусловлено тем фактом, что на момент выхода указанной статьи флуоресцентные микроскопы были доступны лишь немногим диагностическим лабораториям. Использование свойства конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидом может способствовать снижению количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов, связанных с ошибочной интерпретацией результатов из-за непостоянства зеленого оттенка свечения конгофильных скоплений в поляризованном свете. Тем не менее важно подчеркнуть, что, согласно результатам наших исследований, окраска конго красным характеризуется низкой эффективностью в отношении выявления амилоидных бляшек. Об этом свидетельствует тот факт, что при использовании конго красного амилоидные бляшки удается идентифицировать не во всех образцах коры, в которых они присутствуют (согласно данным иммуногистохимического исследования). Кроме того, количество выявленных конгофильных бляшек в образце, взятом для количественного анализа, в четыре раза меньше соответствующего значения, полученного после проведения иммуногистохимического окрашивания.

Первые попытки выявления амилоида с помощью метахроматических красителей, таких как толуидиновый синий, кристаллический фиолетовый и метиловый фиолетовый, относятся к концу прошлого века. Согласно результатам исследований тех лет, эти методики значительно менее эффективны в отношении выявления амилоида по сравнению с окраской конго красным и ThT [17]. Здесь следует отметить, что исследование препаратов, окрашенных с использованием метахроматических красителей, ранее проводили исключительно методом микроскопии в проходящем свете. Нами было отмечено, что окраска метиловым фиолетовым с последующей верификацией амилоида методом флуоресцентной микроскопии является эффективным способом выявления β -амилоидных бляшек. В этом случае идентифицировать амилоидные бляшки в пределах среза значительно легче благодаря полному отсутствию фоновой флуоресценции неамилоидных компонентов ткани. Ранее было показано, что обработка парафиновых

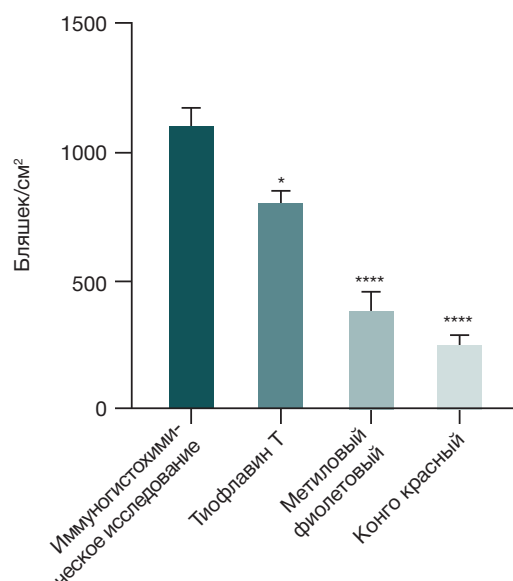


Рис. 3. Количественная оценка амилоидных бляшек, окрашенных разными методами. Различия с группой контроля (иммуногистохимическое исследование) значимы при $p = 0,01$ (*) и $p < 0,0001$ (****)

срезов тканей кристаллическим фиолетовым, который по своей химической структуре близок к метиловому фиолетовому, приводит к значительному уменьшению автофлуоресценции [18]. Вероятно, метиловый фиолетовый обладает сходным свойством. Интересно, что эта методика окраски неэффективна в отношении транстиретинового амилоидоза миокарда. В данном случае амилоид приобретает метахроматическую окраску при наблюдении в проходящем свете, но характеризуется полным отсутствием флуоресценции. Это может указывать на специфику связывания молекул красителя метилового фиолетового с амилоидными фибриллами определенной природы.

Идентификация амилоидных бляшек в коре головного мозга человека является актуальной задачей, так как их наличие служит одним из основных гистопатологических признаков болезни Альцгеймера. В ходе проведенных исследований нами было отмечено, что проанализированные гистохимические красители демонстрируют разную эффективность взаимодействия с амилоидными бляшками с образованием флуоресцирующего комплекса. Наблюдаемые различия в количестве выявляемых разными методами амилоидных бляшек могут быть обусловлены разной специфичностью красителей в отношении связывания β -амилоидных фибрилл. Наличие достоверных различий с результатами, полученными при использовании метода иммунофлуоресценции, указывает на то, что использованные гистохимические красители связываются не со всеми присутствующими на срезе амилоидными бляшками, а лишь с частью амилоидных бляшек. Возможно, это обусловлено существованием структурных различий между разными типами амилоидных бляшек. Так, отмечено, что диффузные (или незрелые) амилоидные бляшки не имеют фибриллярного строения и представляют собой компактные скопления β -амилоидного пептида [19]. Из-за отсутствия в структуре этих бляшек амилоидных фибрилл они не способны взаимодействовать с такими красителями, как Конго красный и ThT, молекулы которых встраиваются в структуру с определенной конформацией. С этой точки зрения, методы гистохимического выявления амилоида не являются полными аналогами методов иммуногистохимии, поскольку применение антител позволяет выявлять

место локализации определенного белка (β -амилоида, транстиретина и т. д.). В данном случае гистохимические методы представляют собой более эффективный способ выявления конформационной патологии.

Несмотря на то что количественные данные свидетельствуют о меньшей эффективности использования любой из гистохимических окрасок для выявления амилоидных бляшек по сравнению с методом иммунофлуоресценции, полученные результаты могут представлять интерес для будущих исследований. Метод иммунофлуоресценции — сложный в реализации и дорогостоящий из-за высокой стоимости необходимых реагентов и расходных материалов. По этой причине его можно применять в качестве рутинного метода далеко не во всех научных, клинико-диагностических и патоморфологических лабораториях. Гистохимические методики, напротив, отличаются простотой и дешевизной, будучи значительно более доступными. Проблему более низкой эффективности этих методик в отношении выявления амилоида отчасти можно решить за счет модификации имеющихся гистохимических красителей и создания их аналогов [12, 20].

ВЫВОДЫ

Применение метода флуоресцентной микроскопии позволяет найти новые подходы для визуализации амилоида в тканях головного мозга человека, что может быть успешно использовано для улучшения эффективности морфологической диагностики амилоидозов. Тиофлавин Т является наиболее эффективным гистохимическим красителем для флуоресцентного выявления β - и транстиретинового амилоидоза в тканях человека. Методика окраски конго красным характеризуется высокой эффективностью в отношении транстиретинового амилоидоза, но плохо подходит для идентификации β -амилоидных бляшек. Способность конго красного флуоресцировать при связывании с амилоидными фибриллами может быть использована для верификации амилоидных скоплений вместо поляризационной микроскопии. Метилловый фиолетовый обладает способностью специфически связываться с β -амилоидными скоплениями с образованием флуоресцирующего комплекса, одновременно подавляя автофлуоресценцию нервной ткани. Это делает методику окраски метилловым фиолетовым перспективной для диагностики патологии альцгеймеровского типа.

Литература

1. Picken MM. The pathology of amyloidosis in classification: A review. *Acta Haematol.* 2020; 143 (4): 322–34. DOI: 10.1159/000506696.
2. Cuddy SAM, Falk RH. Amyloidosis as a systemic disease in context. *Can J Cardiol.* 2020; 36 (3): 396–407. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.12.033.
3. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019; 14 (1): 32. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.
4. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 46 (Suppl 1): S30–S33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.
5. Dapson RW. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech Histochem.* 2018; 93 (8): 543–56. DOI: 10.1080/10520295.2018.1528385.
6. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports.* 2019; 39 (1): BSR20181415. DOI: 10.1042/BSR20181415.
7. De Carvalho HF, Taboga SR. The applicability of hematoxylin-eosin staining plus fluorescence or confocal laser scanning microscopy to the study of collagen fibers in cartilages. *Coll R Acad Sci III.* 1996; 319: 991–6. PMID: 9064122.
8. Hamid A, Safdar A, Maryam M, Amjad A, Azra J, Abid A. Eosin fluorescence: A diagnostic tool for quantification of liver injury. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 19: 37–44. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.016.
9. Jakubovsky J, Guller L, Cerna M et al. Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained histological sections of the human spleen. *Acta Histochem.* 2002; 104 (4): 353–6. DOI: 10.1078/0065-1281-00684.
10. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36 (6): 377–81. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00542.x.
11. Pihlman K, Linder E. Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. *Histochemistry.* 1983; 79 (2):157–65. DOI: 10.1007/BF00489778.
12. Sapozhnikov SP, Karyshev PB, Sheptukhina AI, Nikolayeva OV, Avruyskaya AA, Mitrasov YN, Kozlov VA. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *CTM.* 2017; 9 (2): 91–8. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.11.
13. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804 (7): 1405–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
14. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S-I, Merlini G, Saraiva MJM, Westermark P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid.* 2016; 23 (4): 209–13. DOI: 10.1080/13506129.2016.1257986.
15. Howie AJ, Mared P O-C. 'Apple-green birefringence' of amyloid stained by Congo red. *Kidney Int.* 2012; 82 (1): 114. DOI: 10.1038/ki.2012.89.
16. Cohen AS, Calkins E, Levene CI. Studies on experimental amyloidosis. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol.* 1959; 35: 971–89. PMID: 13810917.
17. Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol.* 1988; 63 (4): 201–12. DOI: 10.3109/10520298809107185.
18. Buchynska L, Kashuba E, Szekely L. Immunofluorescence staining of paraffin sections: creating DAB staining like virtual digital images using CMYK color conversion. *Exp Oncol.* 2008; 30 (4): 327–9. PMID: 19112433.
19. Mott RT, Hulette CM. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am.* 2005; 15: 755–65. DOI: 10.1016/j.nic.2005.09.003.
20. Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48 (9): 1223–32. DOI: 10.1177/002215540004800906.

References

1. Picken MM. The pathology of amyloidosis in classification: A review. *Acta Haematol.* 2020; 143 (4): 322–34. DOI: 10.1159/000506696.
2. Cuddy SAM, Falk RH. Amyloidosis as a systemic disease in context. *Can J Cardiol.* 2020; 36 (3): 396–407. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.12.033.

3. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019; 14 (1): 32. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5.
4. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 46 (Suppl 1): S30–S33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.
5. Dapson RW. Amyloid from a histochemical perspective. A review of the structure, properties and types of amyloid, and a proposed staining mechanism for Congo red staining. *Biotech Histochem.* 2018; 93 (8): 543–56. DOI: 10.1080/10520295.2018.1528385.
6. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience Reports.* 2019; 39 (1): BSR20181415. DOI: 10.1042/BSR20181415.
7. De Carvalho HF, Taboga SR. The applicability of hematoxylin-eosin staining plus fluorescence or confocal laser scanning microscopy to the study of collagen fibers in cartilages. *Coll R Acad Sci Ill.* 1996; 319: 991–6. PMID: 9064122.
8. Hamid A, Safdar A, Maryam M, Amjad A, Azra J, Abid A. Eosin fluorescence: A diagnostic tool for quantification of liver injury. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 19: 37–44. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.016.
9. Jakubovsky J, Guller L, Cerna M et al. Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained histological sections of the human spleen. *Acta Histochem.* 2002; 104 (4): 353–6. DOI: 10.1078/0065-1281-00684.
10. De Rossi A, Rocha LB., Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36 (6): 377–81. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00542.x.
11. Pihlman K, Linder E. Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. *Histochemistry.* 1983; 79 (2): 157–65. DOI: 10.1007/BF00489778.
12. Sapozhnikov SP, Karyshev PB, Sheptukhina AI, Nikolayeva OV, Avruyskaya AA, Mitrasov YN, Kozlov VA. Novel fluorescent probes for amyloid detection. *CTM.* 2017; 9 (2): 91–8. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.11.
13. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1804 (7): 1405–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
14. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN., Ikeda S-I, Merlini G, Saraiva MJM, Westermark P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid.* 2016; 23 (4): 209–13. DOI: 10.1080/13506129.2016.1257986.
15. Howie AJ, Mared P O-C. 'Apple-green birefringence' of amyloid stained by Congo red. *Kidney Int.* 2012; 82 (1): 114. DOI: 10.1038/ki.2012.89.
16. Cohen AS, Calkins E, Levene CI. Studies on experimental amyloidosis. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol.* 1959; 35: 971–89. PMID: 13810917.
17. Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol.* 1988; 63 (4): 201–12. DOI: 10.3109/10520298809107185.
18. Buchynska L, Kashuba E, Szekely L. Immunofluorescence staining of paraffin sections: creating DAB staining like virtual digital images using CMYK color conversion. *Exp Oncol.* 2008; 30 (4): 327–9. PMID: 19112433.
19. Mott RT, Hulette CM. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am.* 2005; 15: 755–65. DOI: 10.1016/j.nic.2005.09.003.
20. Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48 (9): 1223–32. DOI: 10.1177/002215540004800906.

ЖИЗНЕСТОЙКОСТЬ И ПЕРСОНАЛЬНЫЕ РЕСУРСЫ ВРАЧЕЙ «КРАСНЫХ ЗОН» КОВИД-ГОСПИТАЛЕЙ: ПСИХОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Б. А. Ясько^{1,2} ✉, Б. В. Казарин¹, В. Н. Городин¹, Н. А. Чугунова³, Л. В. Покуль^{3,4}, Л. С. Скрипниченко², В. В. Скоробогатов²

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

² Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

³ Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства, Новороссийск, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

В связи с продолжающейся пандемией COVID-19 особенно актуален вопрос о состоянии психологических ресурсов у врачей, продолжительно работающих в условиях «красных зон». Целью работы было проанализировать специфику состояния жизнестойкости и персональных (витальных) ресурсов врачей, продолжительно работающих в «красной зоне», и проверить гипотезу о том, что продолжительная профессиональная деятельность врачей в «красной зоне» оказывает негативное влияние на систему экзистенциальных и витальных ресурсов, сокращая потенциал стрессоустойчивости личности. Группу 1 ($n = 94$) составили врачи, вовлеченные с мая 2020 г. по июнь 2021 г. в «красную зону» ковид-госпиталей; группу 2 ($n = 77$) — врачи, не участвовавшие в клиническом процессе с ковидными пациентами. По результатам диагностики, врачи группы 2 характеризуются высоким уровнем жизнестойкости и ее компонентов «Вовлеченность», «Контроль», «Принятие риска» (59,7%; 67,5%; 61,0%; 20,9% соответственно). В индексе ресурсности (ИР) (1,24) отражено преобладание персональных приобретений над потерями за прошедший год. Отсутствуют различия по полу. У 31,9% врачей «красных зон» (группа 1) значительно сократился потенциал жизнестойкости. Разрушительному воздействию подверглись все компоненты жизнестойкости: соотношение %-долей высоких/низких значений следующее: «Вовлеченность» — 8,5/27,7; «Контроль» — 9,6/34,0; «Принятие риска» — 10,6/35,1. ИР снижен (0,77). Наиболее выражено сокращение ресурсов у врачей женского пола. Установлено значимое взаимовлияние принятия риска и динамики персональных ресурсов у врачей «красной зоны», что может указывать на активизацию проактивного совладания с опорой на принятие нового профессионального опыта.

Ключевые слова: пандемия, COVID-19, пандемическое сознание, психологическое здоровье, жизнестойкость, персональные ресурсы

Благодарности: главному врачу Специализированной клинической инфекционной больницы МЗ Краснодарского края С. В. Зотову — за организационную поддержку процесса исследования; начальнику отдела кадров Краевой клинической больницы № 2 МЗ Краснодарского края М. Г. Остроушко — за организацию процедур психодиагностики групп врачей.

Вклад авторов: Б. А. Ясько — идея и концепция публикации, систематизация эмпирических данных, обсуждение результатов; подготовка статьи; Б. В. Казарин — концепция эмпирического исследования, предоставление базы кафедры для аккумуляции массива данных психодиагностики; В. Н. Городин — подбор испытуемых, организация психодиагностических обследований, обсуждение теоретико-методологических основ исследования; Н. А. Чугунова — предоставление эмпирической базы, сбор материала, анализ данных; Л. В. Покуль — обсуждение дизайна исследования, подготовка черновика статьи; Л. С. Скрипниченко — обоснование актуальности исследования; обсуждение маршрутов психологической поддержки врачей «красных зон»; В. В. Скоробогатов — статистическая обработка данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом КубГМУ (протокол № 12 от 29 июня 2021 г. и протокол № 14 от 25 июня 2021 г.); все респонденты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Бела Аслановна Ясько
ул. Ставропольская, д. 149, 350040, г. Краснодар; shabela@yandex.ru

Статья получена: 12.08.2021 Статья принята к печати: 26.08.2021 Опубликовано онлайн: 30.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.042

HARDINESS AND PERSONAL RESOURCES OF RED ZONE STAFF: PSYCHOLOGICAL ANALYSIS

Yasko BA^{1,2} ✉, Kazarin BV¹, Gorodin VN¹, Chugunova NA³, Pokul LV^{3,4}, Skripnichenko LS², Skorobogatov VV²

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

² Kuban State University, Krasnodar, Russia

³ Novorossiysk Clinical Center of FMBA, Novorossiysk, Russia

⁴ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

In light of the ongoing COVID-19 pandemic, it is becoming increasingly important to address the problem of resourcefulness in the healthcare personnel of COVID-19 red zones. The aim of this study was to assess hardiness and the state of vital resources in physicians continuously working in red zones and to test a hypothesis that that long-term work in a COVID-19 red zone adversely affects the resourcefulness, reducing resistance to stress. Group 1 ($n = 94$) consisted of physicians with a history of employment in a COVID-19 red zone between May 2020 and June 2021; group 2 ($n = 77$) comprised physicians who were not involved in managing COVID-19 patients. The tests showed that hardiness and its components (commitment, control and challenge) were at high levels in group 2 (59.7%; 67.5%; 61.0%; 20.9%, respectively). The index of resourcefulness (RI; 1.24) reflected the prevalence of personal gains over losses in group 1 over the past year. In this group, there were no sex differences in the results. By contrast, hardiness was significantly reduced in 31.9% of the respondents in group 1 (red zone). Working in the red zone had a devastating effect on all hardiness components: the ratio of the percentages of high to low values was 8.5/27.7 for commitment, 9.6/34.0 for control and 10.6/35.1 for challenge. RI was reduced (0.77). The most pronounced loss of resources was observed in female physicians. The study found a significant mutual impact between challenge and the state of personality resources in red zone staff, which may indicate activation of proactive coping strategies and the acceptance of new professional experience.

Keywords: COVID-19, pandemic, pandemic consciousness, mental health, hardiness, personal resources

Acknowledgement: the authors thank Zotov SV, the Chief Medical Officer of the Specialized Clinical Hospital for Infectious Diseases for his assistance in organizing the study and Ostroushko MG, the Head of the HR Department of the Regional Clinical Hospital № 2, for her assistance in organizing psychological assessment.

Author contribution: Yasko BA proposed the idea and concept of the, systematized empirical data, discussed the results, and wrote the manuscript; Kazarin BV proposed the concept of the empirical study, provided tools to accumulate survey data; Gorodin VN recruited study participants, organized psychological assessment, proposed the theoretical and methodological basis of the study; Chugunova NA carried out data acquisition and analyzed the obtained data; Pokul LV participated in the discussion of the study design and wrote the draft version of the manuscript; Skripnichenko LS provided rationale for the study and participated in the discussion about delivering psychological counselling to red zone staff; Skorobogatov VV conducted statistical analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kuban State Medical University (Protocol № 12 dated June 29, 2021 and Protocol № 14 dated June 25, 2021); informed consent was obtained from all study participants.

✉ Correspondence should be addressed: Bella A. Yasko
Stavropolskaya, 149, 350040, Krasnodar; shabela@yandex.ru

Received: 12.08.2021 Accepted: 26.08.2021 Published online: 30.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.042

Второй год биосоциальная среда человечества подвержена массовой агрессии коронавируса, на передовой борьбы с которым находятся медицинские работники. Актуальна и требует научного анализа проблема цены личных потерь и приобретений, получаемых врачами из тяжелого опыта борьбы за жизнь пациентов, страдающих от COVID-19.

Надо отметить, что первые шаги в изучении влияния пандемии COVID-19 на различные популяционные сегменты уже сделаны. Переживание людьми опасности распространения COVID-19 в первые месяцы пандемии рассматривали специалисты в области психиатрии и психотерапии как явление психологического кризиса. Была отмечена необходимость оперативно организованных ответных мер общественного здравоохранения по психологической поддержке населения как часть мероприятий по борьбе с COVID-19 [1, 2]. Исследователи психологии человека рефлексируют данные, полученные по анкетным опросам, наблюдениям, проведенным на первом этапе пандемии. Наиболее активно изучаются ресурсы совладающего поведения, факторы риска переживания посттравматического стресса, изменения в индивидуальном и общественном сознании, происходящие в продолжающейся пандемии коронавирусной инфекции. Так, по результатам онлайн-опроса, проведенного по завершению периода самоизоляции (весна–лето 2020 г.), выделена специфика активизации проактивных ресурсов совладающего поведения в разных возрастных группах [3]. Опираясь на концепцию проактивного совладания [4], авторы установили, что в молодом возрасте, при условии невысокого стрессового напряжения, наиболее ресурсной стратегией совладания выступил поиск информационной поддержки. В зрелом же возрасте реализуются разнообразные проактивные стратегии, независимо от силы стрессового напряжения и уровня стресса, что говорит об устойчивой системе совладания в условиях самоизоляции в этом демографическом сегменте россиян. Анализ психологических факторов посттравматического стресса, вызванного пандемией COVID-19, на выборке китайских студентов, обучающихся в Китае и за рубежом, показал, что лица, предпочитающие активные стратегии совладания со стрессом, имеют менее выраженные симптомы посттравматического стрессового расстройства в связи с пандемией COVID-19, по сравнению со студентами, использующими пассивные копинг-стратегии [5].

В цикле экспертных опросов ведущих отечественных психологов [6] был проанализирован социально-психологический контекст пандемии. В выводах отмечено раздвоение экспертного сознания, характерное и для общества в целом. Выделены сегменты «ковид-диссидентов» и «ковид-ригористов», что, несомненно, является фактором, отягощающим конструктивность противоэпидемических мероприятий. Эти данные созвучны с выводом о недостаточном уровне приверженности прививкам в различных группах населения, что создает коммуникативные барьеры и трудности в их преодолении при общении медицинских работников с пациентами [7].

Обзор научных публикаций, посвященных исследованиям психологии человека в глобальном кризисе пандемии, показал, что еще недостаточно аналитических данных о состоянии персональных ресурсов медицинских работников, деятельность которых длительно проходит в ковид-стационарах. При этом методологию ресурсного подхода, основанную на принципах экзистенциальной

психологии и психотерапии В. Франкла, С. Мадди, С. Хобфолла [8–15], можно рассматривать в качестве теретико-методологической базы эмпирического поиска в данном направлении. В первую очередь, здесь выделяется категория жизнестойкости, рассматриваемая как убежденность личности, которая помогает ей оставаться активной, препятствует проявлению разрушающих последствий стресса [9, 16]. Как писал С. Мадди, жизнестойкость формирует мужество признавать (а не отрицать) стресс и мужество пытаться превратить его в преимущество [16]. В ряде исследований последних лет установлен ресурсный потенциал высоких показателей жизнестойкости у пациентов с сердечно-сосудистой патологией [17]; в коррекции бессонницы [18], депрессии [19]. С точки зрения предмета нашего исследования внимание привлекают публикации, в которых раскрывается ресурс жизнестойкости в противостоянии профессиональным стрессам клинической деятельности. Так, установлена обратная корреляция между низким уровнем жизнестойкости и высокими показателями симптомов профессионального выгорания врачей [20]. Показано, что у медицинских работников с уровнем жизнестойкости связано отношение к работе [21]. Жизнестойкость как интегральная личностная характеристика медицинского работника обусловлена вовлеченностью в процесс деятельности, удовлетворенностью трудом и не связана значимо с их возрастом [22].

Психологический ресурс жизнестойкости медицинских работников в противостоянии профессиональным стрессам рассматривают и в ряде зарубежных исследований. У медсестер жизнестойкость выступает психологическим «буфером» между воспринимаемым стрессом и чувством счастья [23]. Устойчивость и благополучие персонала хосписов, ощущение ими себя социально и психически здоровыми значимо коррелируют с высокой жизнестойкостью [24]. В исследовании, проведенном в Китае на большой выборке, также была выделена устойчивая положительная связь уровня жизнестойкости медсестер с показателями их физического и психического здоровья [25].

Помимо концепции жизнестойкости как экзистенциального ресурса устойчивости к стрессорам, большой круг исследователей в современной психологии объединяют концепции ресурсного обеспечения жизнедеятельности человека [26–28]. По С. Хобфоллу, ресурсная база человека многообразна и является психологической платформой, обеспечивающей устойчивость к стрессу [26]. Автор предлагает три признака классификации ресурсов, один из которых — «Значение для выживания». В этом классе витальных ресурсов выделены первичные (непосредственно необходимые для выживания человека), вторичные (содействующие первичным, в том числе — социальная поддержка) и третичные ресурсы (социальный статус и др.). Согласно такому подходу, была сформирована теоретическая база консультационной практики, позволяющая оказывать психологическую поддержку субъекта в условиях угрозы критической утраты ресурсов или при возникновении препятствий для адекватного восстановления истощенных ресурсов [28].

Опираясь на эвристичность концепций жизнестойкости и психологических ресурсов адаптации к стрессовым ситуациям или их преодолению, на концепцию психологического здоровья, сформулированную в Уставе ВОЗ [29], мы определили цель нашего исследования:

проанализировать специфику состояния жизнестойкости и персональных (витальных) ресурсов врачей, продолжительно работающих в «красной зоне», и проверить гипотезу о том, что продолжительная (в диапазоне календарного года) профессиональная деятельность врачей в «красной зоне» оказывает негативное влияние на систему экзистенциальных и витальных ресурсов, сокращая потенциал стрессоустойчивости личности.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с поставленной целью и для проверки гипотезы была сформирована эмпирическая выборка, включавшая врачей нескольких лечебных учреждений г. Краснодара и Краснодарского края. Исследование охватывало временной диапазон с мая 2020 по июнь 2021 г., отмеченный пандемией COVID-19.

Структура совокупной выборки представлена двумя группами респондентов: основная группа (группа 1) — врачи, вовлеченные в указанный период в «красную зону» ковид-госпиталей или отделений ($n = 94$), и группа сравнения (группа 2) — врачи, не участвовавшие в клиническом процессе с ковидными пациентами ($n = 77$). Состав групп по полу: группа 1 — женщин 60,0% ($n = 62$), мужчин 34,0% ($n = 32$); группа 2 — женщин 66,2% ($n = 51$), мужчин 33,8% ($n = 26$).

Критерии включения: наличие высшего профессионального образования по специальности «Лечебное дело»; возраст до 55 лет; отсутствие во временном периоде «май 2020 – июнь 2021 г.» критических (кризисных) жизненных событий, связанных с острыми эмоциональными переживаниями; наличие опыта работы в «красной зоне» — для группы 1; отсутствие опыта профессиональной деятельности в «красной зоне» — для группы 2.

Критерии исключения: возраст свыше 55 лет; переживание критических (кризисных) жизненных событий во временном диапазоне «май 2020 — июнь 2021 г.».

В качестве теретико-методологической базы эмпирического поиска принимали методологические принципы субъектно-деятельностной и ресурсных концепций в психологии [9, 10, 26, 27, 30]. В психодиагностике применяли методики опросного типа, основанные на теоретических конструктах жизнестойкости [9, 10] и психологии ресурсов человека [26–28]: «Тест жизнестойкости» [31]; опросник «Потери и приобретения персональных ресурсов» [32].

Методика «Тест жизнестойкости» включает анализ трех компонентов, образующих, согласно экзистенциальной концепции, интегральную переменную «Жизнестойкость человека»: «Вовлеченность»; «Контроль»; «Принятие риска». «Вовлеченность» (commitment) определена как убежденность в том, что личностная включенность в происходящее «дает максимальный шанс найти нечто стоящее и интересное для личности» [31]. Отсутствие подобной убежденности порождает чувство отвергнутости, ощущение себя «вне» жизни. «Контроль» (control) показывает, насколько человек убежден в возможности влиять на результаты происходящего. Низкие показатели по данной шкале говорят об ощущении человеком чувства беспомощности в переживаемых жизненных обстоятельствах. «Принятие риска» (challenge) раскрывает убежденность человека: все, что с ним случается, способствует его развитию за счет знаний, извлекаемых из жизненного опыта, и их последующего использования [31]. В целом результаты теста позволяют оценить способность

и готовность человека активно и гибко действовать в ситуации жизненных трудностей или его уязвимость к переживаниям стресса.

В процессе опроса респонденту предлагали бланк, в котором перечислены 45 утверждений, описывающих разные стороны проявления качеств жизнестойкости. Он должен был оценить личное отношение к каждому утверждению, выбрав один из четырех вариантов ответа («нет»; «скорее нет, чем да»; «скорее да, чем нет»; «да»). Для обработки результатов вариантам ответов соответствуют баллы (от 0 до 3). Поскольку число пунктов, относящихся к каждой шкале, различно («Вовлеченность» — 18 пунктов; «Контроль» — 17; «Принятие риска» — 10), для сравнения результатов рассчитывали, помимо параметрических данных, показатель относительной (%) выраженности суммарного значения к максимальному по шкале.

Опросник «Потери и приобретения персональных ресурсов» [32]. позволяет оценить динамическое взаимодействие жизненно значимых ресурсов с точки зрения субъекта за определенный период времени (в нашем исследовании за период «май 2020 – июнь 2021 г.»). Опросник включает два идентичных списка (две части) из 30 видов ресурсов (интраперсональных, социальных, материальных). Каждый ресурс следует оценить по степени выраженности личностных переживаний с двух точек зрения: потери (часть 1) и приобретения (часть 2). Оценка степени переживаний потерь и приобретений проводили по пятибалльной шкале. При обработке и интерпретации результатов рассчитывали индекс ресурсности (ИР), определяемый как частное от деления суммы баллов по второй части опросника («приобретения») к первой части («потери»). Авторы методики предлагают выделять три уровня ресурсности: низкий (ИР < 0,8); средний (ИР от 0,8 до 1,2); высокий (ИР > 1,2) [32].

Математико-статистическая обработка эмпирических данных проводили с применением программного пакета SPSS 26.0 (An IBM Company; США). Использовали методы параметрической, непараметрической статистики (расчет среднего и стандартного отклонения, t -критерий Стьюдента, корреляционный анализ по Пирсону — r -критерий; критерий углового преобразования Фишера — ϕ^* -критерий). Применение параметрической статистики обусловлено предварительной оценкой однородности дисперсии переменных с помощью F -критерия Ливиня. Показатели F -критерия в совокупной выборке и подвыборках соответствуют уровню значимости менее 95,0% ($p > 0,05$), что подтверждает однородность дисперсий и возможность использования параметрических методов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели жизнестойкости врачей «красных зон» (группа 1)

Из 94-х обследованных респондентов высокий уровень интегрального показателя жизнестойкости был выявлен лишь у 9 человек (9,6% от выборки). У более половины опрошенных врачей «красной зоны» обнаружен средний уровень жизнестойкости (58,5%; $n = 55$), у трети врачей (31,9%; $n = 30$) снижена способность выдерживать стрессовую ситуацию, сохраняя внутреннюю сбалансированность (табл. 1).

В средних значениях диагностический показатель жизнестойкости по группе 1 составил 57 баллов ($SD = 15,9$),

Таблица 1. Описательная статистика анализа жизнестойкости в сравниваемых группах врачей

Группы	M ± SD, % от макс.	Уровни (абс./%)		
		высокий	средний	сниженный
ЖИЗНЕСТОЙКОСТЬ				
Группа 1 (n = 94)	57,0 ± 15,9* 42,2%	9/9,6% ^v	55/58,5% ^{vv}	30/31,9% ^{vvv}
Группа 2 (n = 77)	81,6 ± 16,07* 60,5	46/59,7% ^v	27/35,1% ^{vv}	4/5,2% ^{vvv}
ВОВЛЕЧЕННОСТЬ				
Группа 1 (n = 94)	21,1 ± 6,84** 39,1%	8/8,5% ^u	60/63,8% ^{uu}	26/27,7% ^{uuu}
Группа 2 (n = 77)	34,2 ± 7,39** 63,3%	52/67,5% ^u	19/24,7% ^{uu}	6/7,8% ^{uuu}
КОНТРОЛЬ				
Группа 1 (n = 94)	22,0 ± 5,58*** 43,1%	9/9,6% ^z	53/56,4% ^{zz}	32/34,0 ^{zzz}
Группа 2 (n = 77)	31,5 ± 7,61*** 61,9%	47/61,0% ^z	23/29,9% ^{zz}	7/9,1 ^{zzz}
ПРИНЯТИЕ РИСКА				
Группа 1 (n = 94)	13,9 ± 4,65**** 46,4%	10/10,6% ^Δ	51/54,3%	33/35,1%
Группа 2 (n = 77)	15,9 ± 5,25**** 52,9%	16/20,85% ^Δ	42/54,5%	19/24,7%

Примечание: *t*-критерий Стьюдента: * — $t = 9,99$; $p < 0,001$; ** — $t = 11,9$; $p < 0,001$; *** — $t = 9,13$; $p < 0,001$; **** — $t = 2,57$; $p < 0,05$. Критерий углового преобразования Фишера: ^v — $\phi^* = 7,39$; $p \leq 0,001$; ^{vv} — $\phi^* = 3,09$; $p \leq 0,001$; ^{vvv} — $\phi^* = 4,81$; $p \leq 0,001$; ^u — $\phi^* = 15,9$; $p \leq 0,001$; ^{uu} — $\phi^* = 9,65$; $p \leq 0,001$; ^{uuu} — $\phi^* = 6,47$; $p \leq 0,001$; ^z — $\phi^* = 7,56$; $p \leq 0,001$; ^{zz} — $\phi^* = 3,53$; $p \leq 0,001$; ^{zzz} — $\phi^* = 4,14$; $p \leq 0,001$; ^Δ — $\phi^* = 1,84$; $p \leq 0,033$.

что находится на диагностической границе средних-низких показателей (42,2%). Слабее всего выглядит активность компонента «Вовлеченность» (39,1% от максимального значения по данной шкале). Высокий уровень вовлеченности сохраняют только 8,5% врачей ($n = 8$). Остальные 86 респондентов имеют сниженный (27,7%; $n = 26$) или средний (67,8%; $n = 60$) уровни личностной включенности в происходящее. Показатели по двум другим компонентам жизнестойкости («Контроль» и «Принятие риска») находятся в нижнем диапазоне среднего уровня: 43,1 и 46,4% от максимальных значений по данным шкалам. По шкале «Контроль» 85 врачей обнаружили сниженные (34,0%; $n = 32$) и средние (56,4%; $n = 53$) показатели. Высокий уровень субъективного контроля процесса жизнедеятельности сохраняют в условиях рабочего стресса только 9,6% врачей ($n = 9$). Высокую готовность к принятию риска обозначили 10 респондентов (10,6%). Остальные 84 врача этой группы отметили низкими (35,1%; $n = 33$) или средними (54,3%; $n = 51$) оценками субъективную значимость готовности к саморазвитию за счет знаний, извлекаемых из жизненного опыта, принимая жизненные риски.

Имеется определенная гендерная специфика проявления жизнестойкости врачей «красной зоны» (табл. 2).

Среднегрупповые значения ($M \pm SD$) по интегральному показателю жизнестойкости преобладают в мужской подвыборке (при $t = 5,99$; $p < 0,001$). Низкий уровень жизнестойкости преобладает в группе женщин (при $\phi^* = 1,54$; $p \leq 0,06$). Различия по полу установлены также в среднегрупповых данных по компоненту «Вовлеченность» (при $t = 3,1$; $p < 0,01$). У врачей женского пола значимо преобладает доля лиц, имеющих сниженные показатели вовлеченности (при $\phi^* = 2,0$; $p \leq 0,03$) и контроля (при $\phi^* = 1,85$; $p \leq 0,02$) процесса жизни.

Показатели жизнестойкости врачей, не включенных в клинический процесс «красных зон» (группа 2)

Интегральный показатель жизнестойкости по группе 2 составил 81,6 баллов ($SD = 16,07$), т. е. выходит в диапазон высокого уровня (60,5% от макс. значения; см. табл. 1).

В целом результаты согласуются с показателями, полученными на выборке врачей терапевтического профиля [33]. В этом исследовании интегральный показатель жизнестойкости у врачей, имеющих стаж более 5 лет, составил в среднем по выборке 70,4 балла, а показатели «Вовлеченность», «Контроль», «Принятие риска» — 33,2; 24,1; 13,08 соответственно.

В сравнении с показателем жизнестойкости в группе 1 выявлено статистически значимое различие (при $t = 9,99$; $p < 0,001$). Из 77 обследованных респондентов 59,7% ($n = 46$) обнаружили высокий уровень интегрального показателя жизнестойкости, что значительно выше, чем в группе 1 (при $\phi^* = 7,39$; $p \leq 0,001$). Снижены способности выдерживать стрессовую ситуацию, сохраняя внутреннюю сбалансированность и не снижая успешности деятельности, только у 5,2% группы ($n = 4$), что статистически достоверно отличается от аналогичного показателя в группе 1 (при $\phi^* = 4,81$; $p \leq 0,001$). Средний уровень жизнестойкости проявляют 35,1% опрошенных ($n = 27$); это значительно ниже, чем в группе 1 (при $\phi^* = 3,09$; $p \leq 0,001$). Высокий уровень способности выдерживать стрессовую ситуацию имеют 59,7% ($n = 46$), что более выражено, чем в группе 1 (при $\phi^* = 7,39$; $p \leq 0,001$).

В отличие от работающих в «красной зоне», врачи группы 2 имеют достоверно более высокие показатели по компонентам «Вовлеченность» и «Контроль» (см. табл. 1). Более половины респондентов этой группы (67,5%; $n = 52$) демонстрируют высокую вовлеченность в процесс

Таблица 2. Описательная статистика анализа жизнестойкости в среде мужчин и женщин группы 1

ЖИЗНЕСТОЙКОСТЬ						
M ± SD	Мужчины: 71,8 ± 12,10*			Женщины: 54,4 ± 15,5*		
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	4	6,5	35	56,5	23	37,1 ^v
Женщины	5	15,6	20	62,5	7	21,9 ^v
ВОВЛЕЧЕННОСТЬ						
M ± SD	Мужчины: 23,8 ± 5,78**			Женщины: 19,7 ± 6,90**		
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	5	15,6	22	68,8	5	15,6 ^{vv}
Женщины	3	4,8	38	61,3	21	33,9 ^{vv}
КОНТРОЛЬ						
M ± SD	Мужчины: 23,5 ± 5,8			Женщины: 21,2 ± 5,3		
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	4	12,5	21	65,6	7	21,9 ^{vvv}
Женщины	5	8,1	32	51,6	25	40,3 ^{vvv}
ПРИНЯТИЕ РИСКА						
M ± SD	Мужчины: 14,7 ± 5,20			Женщины: 13,5 ± 4,33		
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	5	15,6	16	50	11	34,4
Женщины	5	8,1	35	56,4	22	35,5

Примечание: t-критерий Стьюдента: * — $t = 5,99$; $p < 0,001$; ** — $t = 3,1$; $p < 0,01$. Критерий углового преобразования Фишера: ^v — $\phi^* = 1,54$; $p \leq 0,06$; ^{vv} — $\phi^* = 2,0$; $p \leq 0,02$; ^{vvv} — $\phi^* = 1,85$; $p \leq 0,03$.

жизнедеятельности. Сниженные показатели обнаружены только в 7,8% случаев ($n = 6$). В сравнениях с группой 1 отмечается статистически значимое преобладание долей лиц высокого уровня вовлеченности в группе 2 и низкого — в группе 1 (при $\phi^* = 15,9$ и $\phi^* = 6,47$; $p \leq 0,001$).

Средний показатель убежденности в возможности влиять на результаты происходящего, заложенной в содержание шкалы «Контроль», в группе 2 имеет значение, соответствующее диапазону высокого уровня ($M = 31,5 \pm 7,61$; 61,9% от максимального показателя по данной шкале). Это достоверно выше, чем в группе 1 (при $t = 9,13$; $p < 0,001$). Только 7 респондентов группы 2 (9,1%) имеют сниженный уровень контроля в структуре жизнестойкости, а 61,0% ($n = 47$) считают, что обладают высоко выраженной способностью контролировать события жизни и влиять на них. Сравнение показателей по выраженности уровней контроля в группах 1 и 2 показывает статистически значимое преобладание врачей с высокими показателями в группе 2 (при $\phi^* = 7,56$; $p \leq 0,001$), а с низким и средним уровнями — в группе 1 (при $\phi^* = 3,53$ и $\phi^* = 4,14$; $p \leq 0,001$).

Убежденность в том, что все происходящее в жизни способствует персональному росту, развитию (шкала «Принятие риска») в средних значениях имеет показатель 15,9 баллов ($SD = 5,25$), что также достоверно выше, чем в группе 1 (при $t = 2,57$; $p < 0,05$), хотя оба сравниваемых показателя соответствуют диапазону среднего уровня. Высокий уровень готовности принятия риска обнаружили 20,8% группы ($n = 16$), что значимо превосходит аналогичный показатель в группе 1 (при $\phi^* = 1,84$; $p \leq 0,033$). Однако в долях выраженности среднего и сниженного уровней нет статистически значимых различий.

Особенностью группы 2 является отсутствие различий в анализируемых показателях между врачами мужского и женского пола (табл. 3).

Анализ оценки потерь и приобретений персональных ресурсов врачами «красных зон» (группа 1)

Средний показатель ИП врачей группы 1 составил 0,77 ед., что соответствует низкому уровню и свидетельствует о преобладании персональных потерь над приобретениями за прошедший год (табл. 4). В целом сниженный ИП обнаружен у 53 респондентов (56,4%), средний — у 32 (34,0%) и только у 9 врачей (9,6%) суммарные оценки приобретений несколько превысили оценки потерь, что в значительной степени обусловлено максимальными баллами (4; 5) приобретений по утверждениям: «Ощущение, что я нужен другим людям»; «Признание моих достижений со стороны значимых для меня людей»; «Поддержка от коллег».

В подгруппах по полу отмечено преобладание низкого уровня ИП в среде женщин по сравнению с мужчинами (61,3 и 37,5%; при $\phi^* = 2,21$; $p \leq 0,013$).

Анализ оценки потерь и приобретений персональных ресурсов врачами, не включенными в клинический процесс «красных зон» (группа 2)

Средний показатель ИП врачей группы 2 составил 1,24 ед., что соответствует высокому уровню и свидетельствует в целом о преобладании персональных приобретений над потерями за прошедший год. Низкий уровень выявлен у 26,0% опрошенных ($n = 20$). Более половины

Таблица 3. Описательная статистика анализа жизнестойкости в среде мужчин и женщин группы 2

ЖИЗНЕСТОЙКОСТЬ						
M ± SD	Мужчины: 81,4 ± 17,10				Женщины: 81,7 ± 15,70	
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	14	53,8	10	38,5	2	7,7
Женщины	32	62,7	17	33,4	2	3,9
ВОВЛЕЧЕННОСТЬ						
M ± SD	Мужчины: 33,1 ± 8,29				Женщины: 34,7 ± 7,49	
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	16	61,5	7	26,9	3	11,6
Женщины	36	70,6	12	23,5	3	5,9
КОНТРОЛЬ						
M ± SD	Мужчины: 31,0 ± 7,55				Женщины: 31,8 ± 7,70	
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	13	50	10	38,5	3	11,5
Женщины	34	66,7	13	25,5	4	7,8
ПРИНЯТИЕ РИСКА						
M ± SD	Мужчины: 17,3 ± 5,42				Женщины: 15,2 ± 5,07	
Уровни						
	высокий (всего; %)		средний (всего; %)		сниженный (всего; %)	
Мужчины	7	26,9	13	50	6	23,1
Женщины	9	17,6	29	56,9	13	25,5

врачей группы 2 считают, что увеличили свой ресурсный потенциал за прошедший год (57,1%; $n = 44$). По сути, во всех показателях зафиксированы статистически значимые различия по сравнению с группой 1 (табл. 4).

Результаты корреляционного анализа

Установлены устойчивые взаимосвязи разной направленности (положительные и отрицательные) жизнестойкости и конструирующих ее переменных с оценками, данными опрошенными врачами ресурсным потерям и приобретением за прошедший год (табл. 5).

Значимые ($0,05 < p < 0,1$) отрицательные и положительные значения r -критерия в обеих выборках обнаружены по преобладающему числу анализируемых взаимосвязей. Установленные корреляции не имеют специфики в женской и мужской подгруппах обеих выборок. Вместе с тем в группе 2 отмечено своеобразие взаимовлияния переменной «Принятие риска» и оценки персональных ресурсов врачами. В отличие от показателей в группе 1, ресурсные потери и приобретения у врачей группы 2 не связаны значимо с приобретенным за рассматриваемый период жизненным опытом, возможностью последующего его использования. Как в целом по группе 2, так и в подгруппах по полу полученные показатели коэффициента корреляции ниже критических значений для соответствующих объемов выборок ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ дает основание говорить о психологически негативном следствии продолжительной

работы врачей в «красной зоне». Сравнение с группой врачей, реализующих профессиональную деятельность в рамках актуальных специализаций, показывает достоверно выраженное ухудшение у врачей «красной зоны» всех исследованных показателей. При ежедневных высоких рабочих, эмоциональных перегрузках у врачей значительно утрачивается способность выдерживать профессиональный стресс, сохраняя внутреннюю сбалансированность (общая жизнестойкость). Наиболее выражено это в сниженной вовлеченности в жизненные процессы, появлении чувства отвергнутости, ощущения себя «вне» жизни; в формировании специфического элемента малопродуктивного пандемического сознания — растущей убежденности в невозможности осуществлять контроль жизни, влиять на результаты происходящего, чувстве беспомощности в переживаемых жизненных и профессиональных обстоятельствах.

Прямым следствием снижения жизнестойкости является низкий ИР, осознание врачами нарастающего сокращения персональных ресурсов, преобладание оценок понесенных за прошедший год потерь при пессимистическом оценивании личностных приобретений.

Выявленные в группе 1 различия по полу показывают, что мужчины-врачи несколько успешнее сохраняют ресурс вовлеченности в структуру жизнестойкости. Это находит отражение и в более высоких показателях у них ИР, который соответствует среднему уровню (0,82, против 0,71 у женщин).

Состояние ресурсной базы врачей группы сравнения (группа 2) свидетельствует о высоком потенциале жизнестойкости и витальных ресурсов в обследованном профессиональном сегменте. Данные научных публикаций [33] дают основание рассматривать результаты,

Таблица 4. Описательная статистика анализа персональных потерь и приобретений в сравниваемых группах врачей

	M ± SD			Уровень ИР (абс. / %)		
	Потери	Приобретения	ИР	низкий	средний	высокий
Группа 1	107,1 ± 15,5 ^{*1}	79,9 ± 23,1 ^{*2}	0,77	53/56,4 ^{*1}	32/34,0 ^{*2}	9/9,6 ^{*3}
Мужчины	107,3 ± 16,2 ^{*3}	87,8 ± 22,53	0,82	15/46,91 [°]	13/40,6 ^{Δ1}	4/12,5 ^{Υ1}
Женщины	107,0 ± 15,3 ^{*4}	75,9 ± 22,51 ^{*5}	0,71	38/61,31 ^{°v1}	19/30,6 ^{Δ2}	5/8,1 ^{Υ2}
Группа 2	88,4 ± 18,60 ^{*1}	102,05 ± 23,04 ^{*2}	1,24	20/26,0 ^{*1}	13/16,9 ^{*2}	44/57,1 ^{*3}
Мужчины	90,8 ± 18,7 ^{*3}	98,9 ± 22,7	1,17	8/30,8	4/15,4 ^{Δ1}	14/53,8 ^{Υ1}
Женщины	87,2 ± 18,0 ^{*4}	103,7 ± 23,3 ^{*5}	1,2	12/23,5 ^{v1}	9/17,6 ^{Δ2}	30/58,8 ^{Υ2}

Примечание: *t*-критерий Стьюдента: «потери»: ^{*1} — *t* = 7,03; *p* < 0,001; ^{*3} — *t* = 3,56; *p* < 0,01; ^{*4} — *t* = 6,22; *p* < 0,001; «приобретения»: ^{*2} — *t* = 6,24; *p* < 0,001; ^{*5} — *t* = 6,41; *p* < 0,001. Критерий углового преобразования Фишера. Уровни ИР. «низкий»: ^{1°} — $\varphi^* = 2,21$, *p* ≤ 0,013; ^{*1} — $\varphi^* = 2,41$, *p* ≤ 0,007; ^{v1} — $\varphi^* = 4,16$, *p* ≤ 0,001; «средний»: ^{*2} — $\varphi^* = 2,59$, *p* ≤ 0,004; ^{Δ1} — $\varphi^* = 2,17$, *p* ≤ 0,015; ^{Δ2} — $\varphi^* = 1,61$, *p* ≤ 0,05; «высокий»: ^{*3} — $\varphi^* = 7,04$, *p* ≤ 0,001; ^{Υ1} — $\varphi^* = 3,50$, *p* ≤ 0,001; ^{Υ2} — $\varphi^* = 6,19$, *p* ≤ 0,001.

полученные в группе 2, как элемент психологической характеристики профессиональной популяции российских врачей терапевтического профиля, содержательно дополняющей психологическую модель личности врача [34].

Установленные корреляции позволяют говорить о системной взаимосвязи экзистенциальных и витальных ресурсов в жизнедеятельности врача. Значимая роль принятия риска в оценке врачами «красной зоны» ресурсных потерь и приобретений (в отличие от врачей, не включенных в работу с ковид-пациентами) может отражать стремление найти смысл в выполняемой деятельности. Такое стремление можно рассматривать как активизацию проактивного совладания («трансформационного копинга» по С. Мадди) в сохранении потенциала стрессоустойчивости, что соответствует данным научных публикаций [35].

Высокая оценка врачами «красной зоны» потерь персональных ресурсов связана со слабостью экзистенциальных ресурсов, в то время как достаточная сформированность жизнестойкости и конструирующих ее компонентов у врачей, не занятых в клиническом процессе ковид-отделений, прямо взаимосвязана с

оптимистической оценкой динамики персональных ресурсов, преобладанием приобретений над их утратой.

ВЫВОДЫ

Проблема психосоциальных последствий пандемии COVID-19 является для современной психологии, в частности для психологии медицинского труда и медицинской психологии, высоко актуальной и требует безотлагательного системного научного анализа. В проведенном исследовании получила подтверждение гипотеза о негативном влиянии продолжительной (в диапазоне календарного года) профессиональной деятельности врачей в «красной зоне» на систему экзистенциальных и витальных ресурсов, ведущем к сокращению потенциала стрессоустойчивости личности. Наиболее выраженным проявлением этого процесса становятся значительное истощение персональных ресурсов, снижение жизнестойкости как способности выдерживать стрессовую ситуацию, сокращение адаптационного потенциала вовлеченности

Таблица 5. Корреляционная матрица (*r*) взаимосвязи показателей жизнестойкости и самооценок персональных потерь–приобретений в обследованных группах врачей

Группа 1			Группа 2		
В целом (<i>n</i> = 94)			В целом (<i>n</i> = 77)		
	Потери	Приобретения		Потери	Приобретения
Вовлеченность	–0,491	0,677	Вовлеченность	–0,661	0,74
Контроль	–0,508	0,597	Контроль	–0,624	0,701
Принятие риска	–0,556	0,561	Принятие риска	–0,128*	0,238*
Жизнестойкость	–0,551	0,663	Жизнестойкость	–0,641	0,75
Женщины (<i>n</i> = 62)			Женщины (<i>n</i> = 51)		
Вовлеченность	–0,501	0,623	Вовлеченность	–0,608	0,72
Контроль	–0,484	0,54	Контроль	–0,577	0,717
Принятие риска	–0,453	0,498	Принятие риска	–0,069*	0,258*
Жизнестойкость	–0,516	0,602	Жизнестойкость	–0,573	0,752
Мужчины (<i>n</i> = 32)			Мужчины (<i>n</i> = 26)		
Вовлеченность	–0,561	0,646	Вовлеченность	–0,74	0,777
Контроль	–0,583	0,646	Контроль	–0,711	0,666
Принятие риска	–0,733	0,65	Принятие риска	–0,295*	0,273*
Жизнестойкость	–0,665	0,723	Жизнестойкость	–0,766	0,757

Примечание: * — значение *t*-критерия ниже критического значения (*p* > 0,05).

в процесс жизни и его контроля. Негативное развитие установленных тенденций может привести к формированию экзистенциального вакуума — состояния психологического кризиса личности, не видящей смысла своего существования. Это явление чревато развитием у субъекта ноогенного невроза — нарушения душевного, психологического благополучия, одной из составляющих здоровья человека. Анализ результатов проведенного исследования позволяет говорить о направлениях работы по психологической поддержке врачей в условиях пандемии

COVID-19. В программах консультативной поддержки должны занимать особое место приемы, направленные на активизацию ресурса принятия риска как компонента жизнестойкости личности, осознание смысла труда и значимости приобретенного профессионального опыта; на восстановление расходуемых витальных ресурсов — физического самочувствия после отработанных смен; на овладение элементарными навыками психофизиологической саморегуляции, снятия стресса; на формирование проактивных стратегий совладающего поведения.

Литература

1. Твердохлебова Т. И., Ковалёв Е. В., Карпущенко Г. В., Кулак М. А., Думбадзе О. С., Литовко А. Р. и др. Социально-экономические аспекты COVID-19 на примере Ростовской области. *Инфекционные болезни*. 2020; 18 (4): 27–32. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-27-32.
2. Сорокин М. Ю., Касьянов Е. Д., Рукавишников Г. В., Макаревич О. В., Незнамов Н. Г., Лутова Н. Б., и др. Структура тревожных переживаний, ассоциированных с распространением COVID-19: данные онлайн-опроса. *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета [интернет]*. 2020; 3: 77–84.
3. Куфтык Е. В., Бехтер А. А. Стресс и проактивное совладающее поведение в период пандемии COVID-19: данные онлайн-опроса. *Медицинская психология в России*. 2020; 12; 6 (65) [cited 2021 July 13]. Доступно по ссылке: http://mprj.ru/archiv_global/2020_6_65/nomer05.php.
4. Aspinwall LG, Taylor SE. Modeling cognitive adaptation: A longitudinal investigation of the impact of individual differences and coping on college adjustment and performance. *Journal of Personality and Social Psychology*. 1992; 63; 6: 989–1003. DOI: 10.1037//0022-3514.63.6.989.
5. Цзыхань Л., Сяо Ган В. Психологические факторы посттравматического стресса, вызванного пандемией COVID-19. *Психологический журнал*. 2021; 42; 1: 102–10.
6. Юревич А. В., Ушаков Д. В., Юревич М. А. COVID-19: результаты третьего экспертного опроса. *Психологический журнал*. 2021; 42; 3: 28–136.
7. Платонова Т. А., Голубкова А. А., Смирнова С. С., Дьяченко Е. В. Актуальные вопросы организации иммунопрофилактики населения. Коммуникативные риски — нерешенные проблемы и новые возможности. *Инфекционные болезни*. 2020; 18 (3): 112–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-3-112-118.
8. Франкл В. Человек в поисках смысла. М.: Прогресс, 1990; 368 с.
9. Maddi S. Hardiness: an Operationalization of Existential Courage. *Journal of Humanistic Psychology*. 2007; 44; 3: 279–98.
10. Maddi S. Hardiness: The courage to grow from stressors. *The Journal of Positive Psychology*. 2006; 1 (3): 160–8.
11. Одинцова М. А. Психология жизнестойкости. М.: ФЛИНТА, 2015; 296 с.
12. Ярошук И. В. Психология жизнестойкости: обзор теоретических концепций, эмпирических исследований и методик диагностики. *Ученые записки СПбГИПР*. 2020; 1; 33: 50–60.
13. Hobfoll SE. Stress, culture, and community. N.Y.: London, 1998; 296 p.
14. Водопьянова Н. Е. Противостояние синдрому выгорания в контексте ресурсной концепции человека. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия: Психология*. 2011; 3: 38–50.
15. Kobasa SC. Stressful life events, personality, and health — inquiry into hardiness. *Journal of Personality and Social Psychology*. 2011; 37 (1): 1–11.
16. Maddi S. The Courage and Strategies of Hardiness as Helpful in Coping Despite Major, Destructive Stresses. *American Psychologist*. 2008; 63; 6: 563–4.
17. Bartone PT, Valdes JJ, Sandvik A. Psychological Hardiness Predicts Cardiovascular Health. *Psychology, Health and Medicine*. 2016; 21 (6): 743–9.
18. Nordmo M, Hystad SW, Sanden S, Johnsen BH. The effect of hardiness on symptoms of insomnia during a naval mission. *International Maritime Health*. 2017; 68 (3): 147–52.
19. Maddi SR. The Role of Hardiness and Religiosity in Depression and Anger. *International Journal of Existential Psychology & Psychotherapy*. 2004; 1; 1: 38–49.
20. Стецшин Р. И. Жизнестойкость как акмеологический ресурс личности врача. Психологические проблемы смысла жизни и акме. В сборнике: Материалы XIII симпозиума; 19 апреля 2008 г.; М.: ПИ РАО, 2008; 63–65.
21. Соболева А. Е. Взаимосвязь жизнестойкости и отношения к работе у медицинских работников. *Устойчивое развитие науки и образования*. 2018; 8: 46–50.
22. Фомина Н. Ф., Федосеева Т. Е. Исследование показателей жизнестойкости в аспекте личности профессионала. *Современные проблемы науки и образования [интернет]*. 2016; 6; [cited 2021 August 19]. Доступно по ссылке: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25947>.
23. Abdollahi A, Abu Talib M, Yaacob SN, Ismail Z. Hardiness as a mediator between perceived stress and happiness in nurses. *Journal of Psychiatry and Mental Health Nursing*. 2014; 21; 9: 789–96.
24. Ablett J. Resilience and well-being in palliative care staff: a qualitative study of hospice nurses experience of work. *Psycho-Oncology*. 2007; 16; 8: 733–740.
25. Lambert V, Lambert C, Petrini M, Xiao M, Zhang Y. Workplace and social factors associated with physical and mental health in hospital nurses in China. *Nursing and Health Sciences*. 2007; 9: 120–6.
26. Hobfoll SE. Stress, culture, and community. N.Y.: London, 1998; 296 p.
27. Hobfoll SE, Lilly RS. Resource conservation as a strategy for community psychology. *Journal of Community Psychology*. 1993; 21: 128–48.
28. Водопьянова Н. Е. Противостояние синдрому выгорания в контексте ресурсной концепции человека. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия: Психология*. 2011; 3: 38–50.
29. Устав (Конституция) Всемирной Организации. 2020; [cited 2021 July 13]. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/901977493>.
30. Носкова О. Г. Проблемы психологии деятельности и ее субъекта в творчестве Е. А. Климова (к 90-летию со дня рождения). *Психологический журнал*. 2021; 2; 42: 106–14.
31. Леонтьев Д. А., Рассказова Е. И. Тест жизнестойкости. М.: Смысл, 2006; 63 с.
32. Водопьянова Н. Е. Стресс-менеджмент. М.: Юрайт, 2018; 283 с.
33. Костюченко Е. В., Романчук Л. Н. Связь жизнестойкости и оптимизма медицинских работников. Актуальные проблемы психологии развития личности. Сборник научных статей. Гродно: ГрГУ им. Янки Купалы [интернет]. 2017; 205–16 [cited 2021 August 19]. Доступно по ссылке: <https://elib.grsu.by/doc/23846>.
34. Ясько Б. А., Казарин Б. В. Модель личности специалиста:

методологическое обоснование и практическая востребованность. Организационная психология. 2020; 10; 4: 109–37. [cited 2021 August 19]. Доступно по ссылке: <https://orgpsyjournal.hse.ru/data/2021/01/03/1344689973/>

References

1. Tverdohlebova TI, Kovaljov EV, Karpushhenko GV, Kulak MA, Dumbadze OS, Litovko AR i dr. Social'no-jekonomicheskie aspekty COVID-19 na primere Rostovskoj oblasti. Infekcionnye bolezni. 2020; 18 (4): 27–32. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-27-32. Russian.
2. Sorokin MYu, Kasyanov ED, Rukavishnikov GV, Makarevich OV, Neznanov NG, Lutova NB, et al. Structure of anxiety associated with COVID-19 pandemic: the online survey results. Bulletin of RSMU. 2020; 3: 70–76.
3. Kuftjak EV, Behter AA. Stress i proaktivnoe sovladajushhee povedenie v period pandemii Covid-19: dannye onlajn-oprosa. Medicinskaja psihologija v Rossii. 2020; 12; 6 (65) [cited 2021 July 13]. Dostupno po ssylke: http://mprj.ru/archiv_global/2020_6_65/nomer05.php. Russian.
4. Aspinwall LG, Taylor SE. Modeling cognitive adaptation: A longitudinal investigation of the impact of individual differences and coping on college adjustment and performance. Journal of Personality and Social Psychology. 1992; 63; 6: 989–1003. DOI: 10.1037//0022-3514.63.6.989.
5. Czyhan L, Siao Gan V. Psihologicheskie faktory posttravmaticheskogo stressa, vyzvannogo pandemiej COVID-19. Psihologicheskij zhurnal. 2021; 42; 1: 102–10. Russian.
6. Jurevich AV, Ushakov DV, Jurevich MA. COVID-19: rezul'taty tret'ego jekspertnogo oprosa. Psihologicheskij zhurnal. 2021; 42; 3: 28–136. Russian.
7. Platonova TA, Golubkova AA, Smirnova SS, D'jachenko EV. Aktual'nye voprosy organizacii immunoprofilaktiki naselenija. Kommunikativnye riski — nereshennye problemy i novye vozmozhnosti. Infekcionnye bolezni. 2020; 18 (3): 112–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-3-112-118. Russian.
8. Frankl V. Chelovek v poiskah smysla. M.: Progress, 1990; 368 s. Russian.
9. Maddi S. Hardiness: an Operationalization of Existential Courage. Journal of Humanistic Psychology. 2007; 44; 3: 279–98.
10. Maddi S. Hardiness: The courage to grow from stresses. The Journal of Positive Psychology. 2006; 1 (3): 160–8.
11. Odincova MA. Psihologija zhiznestojkosti. M.: FLINTA, 2015; 296 s. Russian.
12. Jaroshhuk IV. Psihologija zhiznestojkosti: obzor teoreticheskikh koncepcij, jempiricheskikh issledovanij i metodik diagnostiki. Uchenye zapiski SPbGIPSR. 2020; 1; 33: 50–60. Russian.
13. Hobfoll SE. Stress, culture, and community. N.Y.: London, 1998; 296 p.
14. Vodopjanova N. E. Protivodejstvie sindromu vygoranija v kontekste resurnoj koncepcii cheloveka. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Serija: Psihologija. 2011; 3: 38–50. Russian.
15. Kobasa SC. Stressful life events, personality, and health — inquiry into hardiness. Journal of Personality and Social Psychology. 2011; 37 (1): 1–11.
16. Maddi S. The Courage and Strategies of Hardiness as Helpful in Crowding Despite Major, Destructive Stresses. American Psychologist. 2008; 63; 6: 563–4.
17. Bartone PT, Valdes JJ, Sandvik A. Psychological Hardiness Predicts Cardiovascular Health. Psychology, Health and Medicine. 2016; 21 (6): 743–9.
18. Nordmo M, Hystad SW, Sanden S, Johnsen BH. The effect of hardiness on symptoms of insomnia during a naval mission. International Maritime Health. 2017; 68 (3): 147–52.
19. Maddi SR. The Role of Hardiness and Religiosity in Depress and Anger. International Journal of Existential Psychology & Psychotherapy. 2004; 1; 1: 38–49.
20. Stecishin RI. Zhiznestojkost' kak akmeologicheskij resurs lichnosti vracha. Psihologicheskie problemy smysla zhizni i akme. V sbornike: Materialy XIII simpoziuma; 19 aprelya 2008 g.; M.: PIRAO, 2008; 63–65. Russian.
21. Soboleva AE. Vzaimosvjaz' zhiznestojkosti i otnoshenija k rabote u medicinskih rabotnikov. Ustojchivoe razvitie nauki i obrazovanija. 2018; 8: 46–50. Russian.
22. Fomina NF, Fedoseeva TE. Issledovanie pokazatelej zhiznestojkosti v aspekte lichnosti professionala. Sovremennye problemy nauki i obrazovanija [internet]. 2016; 6; [cited 2021 August 19]. Dostupno po ssylke: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25947>. Russian.
23. Abdollahi A, Abu Talib M, Yaacob SN, Ismail Z. Hardiness as a mediator between perceived stress and happiness in nurses. Journal of Psychiatry and Mental Health Nursing. 2014; 21; 9: 789–96.
24. Ablett J. Resilience and well-being in palliative care staff: a qualitative study of hospice nurses experience of work. Psycho-Oncology. 2007; 16; 8: 733–740.
25. Lambert V, Lambert C, Petrini M, Xiao M, Zhang Y. Workplace and social factors associated with physical and mental health in hospital nurses in China. Nursing and Health Sciences. 2007; 9: 120–6.
26. Hobfoll SE. Stress, culture, and community. N.Y.: London, 1998; 296 p.
27. Hobfoll SE, Lilly RS. Resource conservation as a strategy for community psychology. Journal of Community Psychology. 1993; 21: 128–48.
28. Vodopjanova NE. Protivodejstvie sindromu vygoranija v kontekste resurnoj koncepcii cheloveka. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Serija: Psihologija. 2011; 3: 38–50. Russian.
29. Ustav (Konstitucija) Vsemirnoj Organizacii. 2020; [cited 2021 July 13]. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/901977493>.
30. Noskova OG. Problemy psihologii dejatel'nosti i ee sub'ekta v tvorchestve E. A. Klimova (k 90-letiju so dnja rozhdenija). Psihologicheskij zhurnal. 2021; 2; 42: 106–14. Russian.
31. Leontev D. A., Rasskazova E. I. Test zhiznestojkosti. M.: Smysl, 2006; 63 s. Russian.
32. Vodopjanova N. E. Stress-menedzhment. M.: Jurajt, 2018; 283 s. Russian.
33. Kostjuchenko EV, Romanchuk LN. Svjaz' zhiznestojkosti i optimizma medicinskih rabotnikov. Aktual'nye problemy psihologii razvitiya lichnosti. Sbornik nauchnyh statej. Grodno: GrGU im. Janki Kupaly [internet]. 2017; 205–16 [cited 2021 August 19]. Dostupno po ssylke: <https://elib.grsu.by/doc/23846>. Russian.
34. Jasko BA, Kazarin BV. Model' lichnosti specialista: metodologicheskoe obosnovanie i prakticheskaja vostrebovanost'. Organizacionnaja psihologija. 2020; 10; 4: 109–37. [cited 2021 August 19]. Dostupno po ssylke: [https://orgpsyjournal.hse.ru/data/2021/01/03/1344689973/OrgPsy_2020_4_\(6\)_Yasko-Kazarin\(109-137\).pdf](https://orgpsyjournal.hse.ru/data/2021/01/03/1344689973/OrgPsy_2020_4_(6)_Yasko-Kazarin(109-137).pdf). Russian.
35. Rasskazova EI, Gordeeva TO. Koping-strategii v strukture lichnostnogo potenciala. Lichnostnyj potencial: struktura i diagnostika. M.: Smysl, 2011; 267–99. Russian.