

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. Негребетский, 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.2021-05

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

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

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



Подписано в печать 31.10.2021
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.2021-05

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 31.10.2021
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы как средство доставки генов для использования в молекулярной медицине Н. Ю. Усман, Д. В. Ребриков Recombinant adeno-associated viruses as a gene delivery vehicle for the use in molecular medicine Usman NYu, Rebrikov DV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	12
Изменения таницитов и ассоциированных с ними клеточных популяций аркуатного ядра в стрептозоциновой модели болезни Альцгеймера Д. Н. Воронков, А. В. Ставровская, А. С. Гущина, А. С. Ольшанский Alterations in tanycytes and related cell populations of arcuate nucleus in streptozotocin-induced Alzheimer disease model Voronkov DN, Stavrovskaya AV, Gushchina AS, Olshanskiy AS	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	21
Болезнь моямоа как возможная причина ишемического инсульта у взрослых А. Ю. Вишнякова, Т. М. Ростовцева, Е. А. Ковражкина, Д. А. Головин, И. Л. Губский, С. Э. Лелюк, В. Г. Лелюк Moyamoya disease as a possible cause of ischemic stroke in adult patients Vishnyakova AYU, Rostovtseva TM, Kovrazhkina EA, Golovin DA, Gubsky IL, Lelyuk SE, Lelyuk VG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	29
Активация процессов сенсомоторной интеграции с помощью интерфейса «мозг-компьютер» А. А. Рубакова, Г. Е. Иванова, М. А. Булатова Activation of sensorimotor integration processes with a brain-computer interface Rubakova AA, Ivanova GE, Bulatova MA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
Противоопухолевое влияние лучевой терапии на ортотопическую PDX-модель аденокарциномы пищевода человека А. А. Киблицкая, А. С. Гончарова, А. Е. Анисимов, А. В. Снежко, С. Н. Дмитрияди, А. А. Маслов, Ю. А. Геворкян, Е. Н. Колесников Antitumor effect of radiation therapy on orthotopic PDX models of human esophageal adenocarcinoma Kibitskaya AA, Goncharova AS, Anisimov AE, Snezhko AV Dimitriadi SN, Maslov AA, Gevorkyan YA, Kolesnikov EN	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
Сходство и различия люцифераз полихет <i>Chaetopterus variopedatus</i> в зависимости от места их обитания К. В. Пуртов, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, Т. В. Чепурных, В. Б. Кожемяко, Р. И. Загитова, А. С. Щеглов, Р. Х. Зиганшин, А. С. Царькова Similarities and differences between the <i>Chaetopterus variopedatus</i> polychaete luciferases depending on the type of habitat Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, Chepurnykh TV, Kozhemyako VB, Zagitova RI, Shcheglov AS, Ziganshin RH, Tsarkova AS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
Предиктивный потенциал фенотипирования макрофагальной популяции в малигнизации <i>H. pylori</i> -ассоциированного хронического гастрита Е. П. Голубинская, Т. П. Сатаева, И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин, Т. П. Макалиш, Н. А. Школяр, А. А. Галышевская, Д. В. Варгхесе Predictive potential of macrophage population phenotyping in malignization of <i>H. pylori</i> -associated chronic gastritis Golubinskaya EP, Sataeva TP, Fomochkina II, Kubyskhin AV, Makalish TP, Shkolyar NA, Galyshevskaya AA, Varghese DV	

Микробиота эякулята у пациентов с нормозооспермией по результатам исследования методом ПЦР в реальном времени

Е. С. Ворошилина, Д. Л. Зорников, А. В. Иванов, Д. Г. Почерников, Е. А. Паначева

Microbiota of semen samples with normozoospermia: analysis of real-time PCR data

Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernnikov DG, Panacheva EA

Оценка клинического течения COVID-19 у пациентов, вакцинированных «Спутник V», изменчивости RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 и вируснейтрализующих свойств сыворотки

Л. В. Колобухина, О. А. Бургасова, И. С. Крузикова, В. В. Бакалин, Л. В. Генералова, А. В. Шигаев, Д. А. Огаркова, М. А. Никифорова, Д. В. Васина, В. А. Гушчин, С. В. Сметанина

Assessment of COVID-19 clinical course in patients vaccinated with Spitznik V, SARS-CoV-2 S protein RBD domain variation and serum virus neutralizing activity

Kolobukhina LV, Burgasova OA, Kruzhkova IS, Bakalin VV, Generalova LV, Shagaev AV, Ogarkova DA, Nikiforova MA, Vasina DV, Gushchin VA, Smetanina SV

Анализ причин ранней неонатальной смертности в Российской Федерации в 2020 г. (год пандемии COVID-19)

У. Н. Туманова, А. И. Щеголев, А. А. Чаусов, М. П. Шувалова

Analysis of causes of early neonatal mortality during COVID-19 pandemic in 2020 in Russia

Tumanova UN, Shchegolev AI, Chausov AA, Shuvalova MP

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ГЕНОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ

Н. Ю. Усман¹✉, Д. В. Ребриков^{1,2}

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

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Виральные механизмы доставки генетического материала широко используются в молекулярной медицине. Рекombинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV) представляют собой перспективный инструмент для доставки генов *in vivo*. В обзоре представлены нозологический спектр, молекулярные механизмы, выбор способа введения препарата в зависимости от структур-мишеней, выбор серотипа, а также методы производства активных ингредиентов для rAAV-опосредованной генной терапии.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы, AAV, rAAV, генотерапия

Вклад авторов: Н. Ю. Усман — подготовка рукописи; Д. В. Ребриков — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Усман
Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; natalia.usman@yandex.ru

Статья получена: 19.10.2021 **Статья принята к печати:** 29.10.2021 **Опубликована онлайн:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.051

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES AS A GENE DELIVERY VEHICLE FOR THE USE IN MOLECULAR MEDICINE

Usman NYu¹✉, Rebrikov DV^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Viral mechanisms for the delivery of genetic material are widely used in molecular medicine. Recombinant adeno-associated viruses (rAAV) represent a promising tool for *in vivo* gene delivery. The review considers nosological spectrum, molecular mechanisms, the choice of drug administration route depending on target structures, the choice of serotype, and the methods of active ingredient manufacturing for rAAV-mediated gene therapy.

Keywords: adeno-associated viruses, AAV, rAAV, gene therapy

Author contribution: Usman NYu — preparation of the manuscript; Rebrikov DV — editing of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Usman
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; natalia.usman@yandex.ru

Received: 19.10.2021 **Accepted:** 29.10.2021 **Published online:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.051

Биологические основы доставки генов, опосредованной рекомбинантными аденоассоциированными вирусами

Аденоассоциированные вирусы (adeno-associated viruses, AAV, род *Dependoparvovirus*, семейство Parvoviridae) были открыты как примесь в лабораторных препаратах аденовируса. Интерес к AAV, который долгое время был чисто научным, перешел в практическую плоскость в связи с развитием методов генной терапии.

Инфекционные частицы AAV имеют форму икосаэдра. Капсид образован тремя типами белковых субъединиц, варианты которых определяют серотип — специфичность вирусных частиц по отношению к иммунной системе реципиента. В капсид упакована одна копия одноцепочечной геномной ДНК размером около 4700 нуклеотидов, которая может быть смысловой или антисмысловой. Характерной особенностью генома AAV являются инвертированные концевые повторы (inverted terminal repeats, ITR) с Т-образной вторичной структурой, которые затравляют синтез комплементарной цепи ДНК в ядре инфицированной клетки. Помимо этого, ITR функционируют как рекомбиногенные последовательности для образования транскрибируемых конкатемерных молекул ДНК, а также служат ориджином репликации и

сигналом упаковки. Геном AAV содержит два кодирующих гена *rep* и *cap* с несколькими рамками считывания: *rep* — для факторов репликации и сборки частиц, *cap* — для белков капсида. Важно подчеркнуть, что жизненный цикл AAV может поддерживаться только при коинфекции клетки-хозяина другими вирусами.

Виральные механизмы доставки генетического материала широко используются в молекулярной медицине. Для их реализации геном вируса дикого типа (прототип) распределяют по разным несущим (векторным) молекулам ДНК. Структурирующие и регуляторные элементы вируса клонируют в один вектор, в сочетании с терапевтическим модулем (карго) для получения составной (рекомбинантной) единицы, предназначенной для доставки в клетки реципиента. Кодирующие последовательности собственных генов вируса клонируют в другой вектор. Использование векторизованных фрагментов ДНК, которые функционально дополняют друг друга, но разобщены физически, называется *транс-комплементация*. Данный подход решает сразу две проблемы: 1) при удалении собственных кодирующих последовательностей вируса внутри капсида освобождается место для карго; 2) рекомбинантный вирус не опасен для клетки-мишени благодаря отсутствию определенных генов, необходимых для поддержания

его жизненного цикла. Производство вирусных частиц происходит в живой клетке. Получив оба вектора, эта клетка начинает продуцировать инфекционные частицы, содержащие рекомбинантную вирусную ДНК.

Рекомбинантные AAV (recombinant AAV, rAAV) являются перспективной платформой для генной терапии *in vivo*. По сравнению с альтернативными системами, rAAV обладают рядом преимуществ:

1) среди известных штаммов AAV нет ни одного патогенного для человека, поэтому спорадический возврат вируса к дикому типу не представляет угрозы для здоровья пациента;

2) нуклеотидная последовательность rAAV не встраивается в геном клетки-мишени, что является важнейшим фактором безопасности (AAV дикого типа способны к интеграции в геномный локус AAVS1, что переводит вирус в латентное состояние. Процесс интеграции основан на сходстве последовательностей ITR и AAVS1, и происходит при участии вирусных белков Rep. Рекомбинантные AAV не содержат кодирующих последовательностей *rep* и в геном человека не интегрируются);

3) мелкие инфекционные частицы AAV (20–26 нм) лучше проникают в ткани по сравнению с ретро- и лентивирусами (100–200 нм), некоторые серотипы AAV проходят через гематоэнцефалический барьер.

К недостаткам rAAV платформ относятся дорогое сложное производство, необходимость использования генетической информации других вирусов (адено-, герпес симплекс или бакуло-) как потенциального источника биологической контаминации, а также риск избыточного иммунного ответа на препарат и жесткое ограничение по размеру карго [1–3].

Нозологический спектр применения rAAV-опосредованной генной терапии

Среди показаний к применению генной терапии с rAAV-опосредованной доставкой исторически преобладают моногенные аутосомно-рецессивные заболевания [2]. В то же время возможность применения rAAV активно исследуется для многих заболеваний с комплексной этиологией, включающей в себя не только генетические, но и средовые факторы: сердечная недостаточность [4, 5], хронические воспаления суставов [6], неврологические и нейродегенеративные заболевания [7–9], злокачественные опухоли [10, 11], тяжелые вирусные инфекции [12].

Терапевтические задачи rAAV-опосредованной доставки генов

Под терапевтической задачей доставки нуклеиновых кислот в клетки пациента подразумевается молекулярный механизм компенсаторного эффекта. Для моногенных заболеваний по умолчанию рассматривается функциональное замещение мутантных аллелей полноценными транскрипционными единицами (gene replacement). Альтернативами замещению могут быть коррекция сигнальных путей за счет добавления активных копий генов (gene addition), специфическое выключение генов-мишеней продуктами экспрессии трансгена на уровне транскрипции, трансляции или белка (gene silencing), а также доставка ДНК-матриц для геномного редактирования, например, CRISPR/Cas (gene editing) [2].

Выбор способа введения препарата в зависимости от целевых структур

Местное введение rAAV подходит для лечения патологических процессов, локализованных в анатомических структурах с облегченным доступом (глазное яблоко, сустав). При патологиях центральной нервной системы (ЦНС) препарат может быть инъецирован в определенную область мозга или ликвор, однако обе процедуры являются высоко инвазивными. Малоинвазивное системное введение rAAV работает далеко не во всех клинических ситуациях.

При местном введении выбор серотипа rAAV играет второстепенную роль. При системном введении успех терапии, напротив, зависит от выбора серотипа для максимально избирательной трансдукции (таргетирования) целевых органов и тканей. Среди других органов наиболее результативно таргетируются печень и мышцы.

Для таргетирования печени подходит практически любой серотип AAV. Это согласуется с тем, что большинство естественных инфекций AAV у человека и приматов локализовано в печени и селезенке. Гепатоциты служат основной мишенью генотерапевтической коррекции при различных моногенных нарушениях метаболизма, в числе которых наследственная гиперхолестеринемия (*LDLR*), дефицит орнитинтранскарбамилазы (*OTC*), синдром Криглера–Найяра (*UGT1A1*), гемофилия A (*F8*), гемофилия B (*F9*), болезнь накопления гликогена I типа (*G6PC*), мукополисахаридоз I, II, IIIA, VI типа (соответственно, *IDUA*, *IDS*, *SGSH* или *ARSB*) и др.

Для таргетирования мышц подходят серотипы AAV8 и AAV9. К заболеваниям, при которых первичной мишенью является мышечная ткань, относятся болезнь Дюшенна (*DMD*), болезнь Помпе (*GAA*), X-сцепленная миотубулярная миопатия (*MTM1*). Важно отметить, что в случае успешной трансдукции мышечная ткань может служить фабрикой секретируемых полипептидов для лечения немускульных заболеваний.

Трансдукция нейронов и глиальных клеток ЦНС требует применения высокоинвазивных методик введения либо использования серотипов, способных пересекать гематоэнцефалический барьер (например, AAV9 или AAVrh.10). К моногенным патологиям ЦНС, для которых рассматривается использование rAAV-платформ, относятся спинальная мышечная атрофия (*SMN1*), дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (*DDC*), болезнь Канавана (*ASPA*), GM1 ганглиозидоз (*GLB1*), мукополисахаридоз III типа (*GNS*, *HGSNAT*, *NAGLU*, *SGSH*), синдром Ретта (*MECP2*), болезнь Баттена (*CLN2*, *CLN6*) [2].

Выбор серотипа

Разработка серотипов rAAV образует целое направление научно-прикладных исследований, в котором были достигнуты значительные успехи. На системном уровне серотип должен обеспечивать эффективное таргетирование препарата при минимальной иммуногенности (иммунный ответ может быть направлен на продукт экспрессии трансгена, если он чужеродный). На субклеточном уровне серотип должен обеспечивать сохранность частиц во время эндосомного транспорта и устойчивость частиц к протеасомной деградации в цитозоле перед транспортировкой в ядро, где вирусная ДНК выходит из капсида. Дизайн серотипов основан на изменении структуры белков капсида AAV, кодируемых

геном *cap*. Современные подходы, используемые для получения капсидов с улучшенными свойствами, включают в себя направленную эволюцию, рациональный дизайн и заимствование у природы.

Под направленной эволюцией подразумевают искусственный отбор успешных вариантов после внесения случайных изменений в нуклеотидную последовательность гена *cap* при помощи полимеразной цепной реакции с низкой точностью копирования (error-prone PCR) или множественного обмена фрагментами между различными вариантами кодирующей последовательности (capsid shuffling). Рациональный дизайн — это целенаправленная оптимизация серотипа методами белковой инженерии. Изменения в структуру полипептидов вносятся на уровне кодирующих нуклеотидных последовательностей. Сайт-направленный мутагенез (site-directed mutagenesis) позволяет вносить единичные замены по антигенно-значимым аминокислотным положениям в полипептиде. Так, замены тирозиновых остатков, выходящих на поверхность частиц, могут значительно повышать эффективность эндосомного транспорта после интернализации частиц и их устойчивость к протеасомной деградации в цитозоле; соответствующее усиление эффективности трансдукции было продемонстрировано на мышиной модели [13]. Модификация эпителий в уже собранном капсиде возможна химическими методами [14]. Еще одним направлением рационального дизайна капсидов для rAAV является создание химерных генов на основе *cap*. Примерами модификаций, направленных на усиление специфичности связывания частиц с клеточной поверхностью, служат добавление интегрин-связывающих мотивов или иммуноглобулиноподобных доменов ScFv со специфичностью к поверхностным маркерам клеток-мишеней [2].

Наконец, новые полезные с точки зрения медицинского применения серотипы AAV могут быть обнаружены путем анализа данных, полученных с помощью высокопроизводительных методов определения структуры биополимеров. Грамотное заимствование у природы предполагает всестороннее изучение доступных вариантов. Большинство штаммов AAV видоспецифичны: одни живут в организме человека, другие — в организме мыши и т. д. Распространенность антител к AAV в человеческих популяциях достигает 80% [15]. Если мы «оденем» терапевтический конструктор в капсид одного из штаммов AAV, обнаруживаемых у человека, то с высокой вероятностью иммунная система пациента быстро атакует препарат, титр снизится, и трансдукция окажется неэффективной. С другой стороны, если мы выберем серотип, сильно отличающийся от человеческих штаммов (например, мышиный), то рискуем получить избыточный иммунный ответ с самыми тяжелыми последствиями. Кроме того, сродство частиц к рецепторам на поверхности клетки может оказаться недостаточно сильным, поскольку мышиные серотипы AAV заточены эволюцией под мышиные же рецепторы, и трансдукция снова окажется неэффективной. Проблема имеет два решения.

1. При заимствовании серотипов у близкородственных видов (приматов) вероятность избыточных иммунных реакций умеренная. У пациента, скорее всего, соответствующие высокоаффинные антитела будут отсутствовать, в то время как рецепторы на поверхности клеток-мишеней будут удовлетворительно распознавать такие частицы. Серотипы приматов активно исследуются для медицинского применения; так, в обозначении

серотипа AAVrh.10, уже зарекомендовавшего себя в клинических исследованиях, *rh* отображает название таксона (*rhesus monkey*, *Macaca mulatta*).

2. Можно использовать серотипы, некогда присутствовавшие в вирусе человека, но уже утратившие эволюцией. Такие предковые серотипы (ancestral serotypes), к которым у пациента нет антител, находят методами вычислительной эволюционной генетики *in silico*.

С практической точки зрения, важно понимать, что дизайн серотипов является самостоятельной масштабной задачей, решение которой требует исчерпывающего функционального тестирования. Генерировать варианты достаточно просто; оценивать результат методически очень сложно. На сегодня в клинической практике, включая испытания, фигурирует всего лишь около десятка различных серотипов rAAV, наиболее распространенным из которых является AAV2. Тем не менее, в это число входит несколько относительно новых серотипов с продвинутыми возможностями таргетирования, прежде всего, AAV8, AAV9 и AAVrh.10 [2].

Конструирование терапевтических модулей

Создание генетических конструкций для rAAV-опосредованной доставки имеет ряд особенностей. От нуклеотидных последовательностей самого вируса в конструкции оставлены только ITR, остальное пространство отведено под терапевтический модуль. Минимальная кассета состоит из промотора, кодирующей последовательности и 3'-некодирующей области с сигналами полиаденилирования и терминации транскрипции. Предельный размер содержимого частиц (packaging size limit) составляет 4700 нуклеотидов, включая ITR. Экспериментальная попытка упаковки конструкции размером свыше 5200 нуклеотидов привела к упаковке фрагментов переменной длины с транскрипционной (обрубленной) 5'-концевой областью. Такие дефектные частицы были способны обеспечивать доставку репортерных генов *in vitro* лишь при высокой множественности заражения, что совершенно не приемлемо для клинического применения *in vivo* [3]. Принципы и проблематика инженерии терапевтических модулей для rAAV представлены в таблице.

Методы производства rAAV

Производство рекомбинантных вирусов основано на использовании перевиваемых культур эукариотических клеток в качестве пакировщиков. Удобнее всего использовать специализированные клеточные линии, генетически модифицированные под данную задачу: в их собственные хромосомы встроены некоторые (но не все) гены, обслуживающие продукцию инфекционных частиц (packaging cell lines).

Первыми пакировщиками частиц rAAV были клетки HeLa, стабильно трансфицированные (stably transfected, то есть со встроенными в хромосомы) копиями генов *rep-cap* и собственно генома rAAV (терапевтический модуль, фланкированный ITR). Нарботка частиц rAAV в такой системе стартует при заражении клеток аденовирусом (AdV). У системы есть серьезные минусы, прежде всего, присутствие AdV в качестве биологического контаминанта (adventitious agent); AdV может быть инактивирован прогревом образцов при 56 °C в течение 30–60 мин, к которому rAAV устойчив. Еще один минус данной системы заключался в том, что для

Таблица. Дизайн нуклеотидных последовательностей для rAAV-опосредованной генной терапии

Основные требования	Проблемы	Варианты решений	Примеры и пояснения
Терапевтический эффект должен быть максимальным	Уровень экспрессии трансгена может быть недостаточно высоким	Использовать сильные промоторы	Промотор цитомегаловируса (CMV)
		Использовать дополнительные регуляторные элементы, усиливающие экспрессию	Интроны-энхансеры, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, WPRE)
		Добавить консенсус Козак (Kozak)	CCACCATG или CCACCATGG, где ATG — стартовый кодон
		Оптимизировать использование кодонов и GC состав	
	Супра-физиологические уровни экспрессии трансгена в целевых и нецелевых тканях могут быть токсичны	Элиминировать мотивы-ингибиторы	Криптические сайты сплайсинга и терминаторы, а также вторичные структуры, снижающие стабильность транскрипта
Экспрессия трансгена должна быть специфичной	Экспрессия трансгена в нецелевых структурах может существенно усилить иммунный ответ на продукт	Использовать тканеспецифичные промоторы	
		Добавить сайты связывания для микроРНК, высоко представленных в антиген-презентирующих клетках, в 3'-некодирующую область трансгена	Профессиональные антиген-презентирующие клетки экспрессируют микро РНК miR-142-3p. Добавление сайтов связывания miR-142-3p снижает экспрессию трансгена в макрофагах и дендритных клетках, что ослабляет иммунный ответ на продукт [18]
Аккомодация крупных трансгенов	Кодирующие последовательности генов бывают очень длинными	Экономить место, создавая мини- и микрогены, кодирующие неполные полипептиды с (частично) сохранной функцией	Клинический потенциал данного подхода исследуется для болезни Дюшенна (<i>DMD</i>), <i>CEP290</i> -ассоциированной формы врожденного амавроза Лебера и дисферлинопатии (<i>DYSA</i>) [2]
		Доставлять кодирующую последовательность по частям	Стратегия инженерии следующая: разделить открытую рамку считывания по границе между белковыми доменами, клонировать фрагменты в два разных вектора для упаковки в отдельные вирусные частицы, в каждый конструктор добавить рекомбиногенные последовательности, фланкированные сайтами сплайсинга для удаления из пре-мРНК. В качестве альтернативы предложено использовать посттрансляционное воссоединение по механизму интеин-опосредованного белкового транс-сплайсинга; выполнимость доказана для некоторых клинически значимых полипептидов (дистрофин, Cas9). Учитывая низкую эффективность восстановления целостности полипептидов в экспериментальных системах, о клинических применениях таких подходов пока говорить рано. Поскольку успех зависит от вероятности одновременного заражения одной и той же клетки-мишени двумя разными типами частиц, может потребоваться увеличение вирусной нагрузки по сравнению со стандартами [2, 19]
Обеспечение длительного присутствия трансгена в клетках-мишенях	Присутствие трансгена в виде нереплицируемых конкатемерных молекул (эписом), которые в митотически активных клеточных популяциях неизбежно разбавляются	Стимулировать интеграцию с учетом рисков генотоксичности	Использование rAAV является методом выбора для доставки генов <i>in vivo</i> в силу своей безопасности по сравнению с использованием ретро- и лентивирусных векторов, которые встраиваются в геном клетки-хозяина при трансдукции. Крайне редкие случаи спонтанной частичной интеграции материала rAAV в геном человека не имеют клинического значения [20]. Сайт-специфичная интеграция трансгена rAAV может быть осуществлена методами геномного редактирования, однако данный тип вмешательства сопряжен с повышенным риском генотоксичности. Нежелательные побочные эффекты в отношении хромосомного окружения по месту интеграции трансгена могут быть уменьшены за счет добавления элементов-инсуляторов [21]

каждого нового сочетания конструктор-серотип приходилось получать новую линию генетически модифицированных клеток HeLa [22]. В следующем поколении клеточных систем для производства rAAV в качестве хелпера использовался репликационно-дефектный герпес симплекс вирус (replication-deficient HSV) [23].

Наиболее распространенные современные протоколы производства rAAV основаны на использовании клеточной линии HEK293 с двумя встроенными генами AdV — *E1a* и *E1b*. Несколько других необходимых генов AdV встроены в плазмиду-хелпер (helper plasmid) и подаются в систему только в начале производственного цикла. Разделение генов AdV по разным носителям продиктовано соображениями безопасности: длительное пребывание значительной части генетического материала AdV в одной клетке может привести к рекомбинации с восстановлением репликационно-компетентного AdV, контагиозного и потенциально опасного для человека. На другой плазмиде, обозначаемой как *цис*-плазида (*cis*-plasmid), находится матрица для репликации — терапевтический модуль, фланкированный ITR. Еще один молекулярный носитель, так называемая *транс*-плазида (*trans*-plasmid), содержит гены *rep* и *cap*. Это собственные гены AAV, экспрессия которых необходима для репликации геномной ДНК rAAV и упаковки вирусных частиц. Все три плазмиды (хелпер, *цис*- и *транс*-) являются продуктами генной инженерии; их нуклеотидные последовательности тщательно выверены. Плазмиды нарабатывают в бактериях *E. coli* в количествах, необходимых для трансфекции.

Трансфекция является наиболее щадящим невирусным методом доставки генетического материала в эукариотические клетки. При трансфекции генетический материал попадает в клетку посредством фагоцитоза (в отличие от трансдукции, подразумевающей использование вирусных механизмов доставки). Для трансфекции ДНК включают в состав коллоидных частиц какого-нибудь подходящего физиологически нейтрального вещества (фосфат кальция, липофектамин, полиэтиленимин), и эти частицы «скармливают» клеткам. Большинство протоколов трансфекции использует одну и ту же схему: плазмидную ДНК разводят небольшим объемом бессывороточной среды или физраствора, так же разводят наполнитель, объединяют, инкубируют для образования фагоцитируемых комплексов и добавляют к клеткам. Важно отметить, что клеточная линия HEK293^{E1ab} была адаптирована для суспензионного роста в большом объеме с целью повышения выходов рекомбинантного вируса [2, 24].

В процессе репликации rAAV в живых клетках может происходить захват фрагментов генетического материала самих клеток. Учитывая, что и HeLa, и HEK293 — это производные клеток человека, такой захват нельзя считать абсолютно безопасным. Контаминация терапевтических конструкций клеточными последовательностями может способствовать их интеграции в геном пациента, тем самым обуславливая генотоксические эффекты. В обход данной проблемы было предложено использовать клетки насекомых Sf9 в сочетании с совместимыми хелперными последовательностями бакуловирусов; идея оказалась перспективной [25].

Вне зависимости от конкретного протокола производства rAAV, по завершении процесса нужно собрать не только культуральную среду (супернатант),

но и сами клетки, внутри которых остается значительное количество частиц (тогда как при производстве ретро- и лентивирусов, как правило, достаточно собрать супернатант). В лизатах присутствует огромное количество свободной ДНК (вирусной и невирусной), поэтому в протокол очистки вводится обязательный этап обработки ДНКазой. В первичных изолятах rAAV всегда есть значительная примесь пустых и недоукомплектованных частиц, от которых избавляются центрифугированием в градиенте плотности CsCl или йодиксанола, за которым следует несколько этапов хроматографической очистки. Для исследовательских задач возможна очистка частиц ультрацентрифугированием, которая не может быть масштабирована для производства [26].

Закключение

Мировой опыт клинического применения rAAV быстро расширяется, и интерес к исследованиям в данной области остается очень высоким. Первым лекарством на основе rAAV, полностью одобренным для клинического применения, стала Glybera® (*a.k.a.* Alipogene tiparvovec, uniQure; Нидерланды), обеспечивающая компенсацию аутосомно-рецессивного дефицита липопротеинлипазы (LPL). Данный фермент вырабатывается в жировой ткани и мышцах человека, секретируется в кровь и работает на внутренней поверхности эндотелия капилляров в экстрапеченочных тканях. Пациенты с дефицитом LPL испытывают тяжелые нарушения метаболизма триглицеридов. Активным действующим веществом Glybera® являются вирусные частицы с серотипом AAV1, содержащие копию гена LPL с усиливающими экспрессию регуляторными элементами. Glybera® вводится внутримышечно многократным обкалыванием один раз в 10 лет. Препарат был разрешен для использования в Европе в 2012 г., однако уже в 2017 г. исключен из Реестра орфанных лекарственных средств ЕС ввиду коммерческого провала; по состоянию на 2018 г., лечение получил 31 пациент [27, 28].

Другой препарат на основе rAAV, Luxturna® (*a.k.a.* Voretigene neparvovec, Spark Therapeutics; США), получил известность как первая генная терапия на основе rAAV, одобренная Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (the U.S. Food and Drug Administration agency, FDA). Luxturna®, одобренная FDA в 2017 г., применяется при RPE65-зависимой форме врожденного amauroза Лебера — тяжелой аутосомно-рецессивной окулопатии, проявляющейся начиная с рождения. Активным действующим веществом Luxturna® являются инфекционные частицы с серотипом AAV2, содержащие кодирующую последовательность гена RPE65 с усиливающими экспрессию регуляторными элементами. Препарат вводят посредством субретинальной инъекции [29].

В 2019 г. одобрение FDA получило еще одно лекарство на основе rAAV, Zolgensma®, предназначенное для лечения аутосомно-рецессивной спинальной мышечной атрофии [30]. Запрос «adeno-associated virus» на сайте ClinicalTrials.gov выдает список из 159 зарегистрированных исследований [31]. Клинические испытания продолжаются; поскольку в области применения rAAV пока больше вопросов, чем ответов, можно ожидать, что число их будет расти.

Литература

- Chen W, Yao S, Wan J, Tian Y, Huang L, Wang S, et al. BBB-crossing adeno-associated virus vector: An excellent gene delivery tool for CNS disease treatment. *J Control Release*. 2021; 333: 129–38. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.029. PubMed PMID: 33775685.
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18 (5): 358–78. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9. PubMed PMID: 30710128.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*. 2010; 18 (1): 80–6. DOI: 10.1038/mt.2009.255. Epub 2009 Nov 10. PubMed PMID: 19904234.
- Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, Thomas CJ, Weeks KL, McMullen JR. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart Lung Circ*. 2018; 27 (11): 1285–300. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.005. PubMed PMID: 29703647.
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016; 387 (10024): 1178–86. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00082-9. PubMed PMID: 26803443.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (1): 2–14. DOI: 10.1089/hum.2017.181. PubMed PMID: 29160173.
- Huang L, Wan J, Wu Y, Tian Y, Yao Y, Yao S, et al. Challenges in adeno-associated virus-based treatment of central nervous system diseases through systemic injection. *Life Sci*. 2021; 270: 119142. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119142. PubMed PMID: 33524419.
- Mijanović O, Branković A, Borovjagin A, Butnaru DV, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Shpichka A, Timashev P, Ulasov I. Battling Neurodegenerative Diseases with Adeno-Associated Virus-Based Approaches. *Viruses*. 2020; 12 (4): 460. DOI: 10.3390/v12040460. PubMed PMID: 32325732.
- Privolizzi R, Chu WS, Tijani M, Ng J. Viral gene therapy for paediatric neurological diseases: progress to clinical reality. *Dev Med Child Neurol*. 2021; 63 (9): 1019–29. DOI: 10.1111/dmcn.14885. PubMed PMID: 33834479.
- Nawaz W, Huang B, Xu S, Li Y, Zhu L, Yiqiao H, et al. AAV-mediated in vivo CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia. *Blood Cancer J*. 2021; 11 (6): 119. DOI: 10.1038/s41408-021-00508-1. PubMed PMID: 34162832.
- Bower JJ, Song L, Bastola P, Hirsch ML. Harnessing the Natural Biology of Adeno-Associated Virus to Enhance the Efficacy of Cancer Gene Therapy. *Viruses*. 2021; 13 (7): 1205. DOI: 10.3390/v13071205. PubMed PMID: 34201599.
- Colón-Thillet R, Jerome KR, Stone D. Optimization of AAV vectors to target persistent viral reservoirs. *Viro J*. 2021; 18 (1): 85. DOI: 10.1186/s12985-021-01555-7. PubMed PMID: 33892762.
- Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (22): 7827–32. DOI: 10.1073/pnas.0802866105. PubMed PMID: 18511559.
- Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. A Precise Chemical Strategy To Alter the Receptor Specificity of the Adeno-Associated Virus. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55 (36): 10645–9. DOI: 10.1002/anie.201604067. PubMed PMID: 27483453.
- Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18 (9): 1586–8. DOI: 10.1128/CVI.05107-11. PubMed PMID: 21775517.
- Gadalla KKE, Vudhironarit T, Hector RD, Sinnett S, Bahey NG, Bailey MES, et al. Development of a Novel AAV Gene Therapy Cassette with Improved Safety Features and Efficacy in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 5: 180–90. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.04.007. PubMed PMID: 28497075.
- Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon CS, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, et al. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther*. 2017; 28 (6): 510–22. DOI: 10.1089/hum.2016.109. PubMed PMID: 28132521.
- Majowicz A, Maczuga P, Kwikkers KL, van der Marel S, van Logtenstein R, Petry H, et al. Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J Gene Med*. 2013; 15 (6–7): 219–32. DOI: 10.1002/jgm.2712. PubMed PMID: 23658149.
- Chamberlain K, Riyad JM, Weber T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum Gene Ther Methods*. 2016; 27 (1): 1–12. DOI: 10.1089/hgtb.2015.140. PubMed PMID: 26757051.
- Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med*. 2013; 19 (7): 889–91. DOI: 10.1038/nm.3230. PubMed PMID: 23770691.
- Liu M, Maurano MT, Wang H, Qi H, Song CZ, Navas PA, et al. Genomic discovery of potent chromatin insulators for human gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2015; 33 (2): 198–203. DOI: 10.1038/nbt.3062. PubMed PMID: 25580597.
- Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1995; 6 (10): 1329–41. DOI: 10.1089/hum.1995.6.10-1329. PubMed PMID: 8590738.
- Clément N, Knop DR, Byrne BJ. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther*. 2009; 20 (8): 796–806. DOI: 10.1089/hum.2009.094. PubMed PMID: 19569968.
- Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther*. 2016; 24 (2): 287–97. DOI: 10.1038/mt.2015.187. PubMed PMID: 26437810.
- Kondratov O, Marsic D, Crosson SM, Mendez-Gomez HR, Moskalenko O, Mietzsch M, et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. *Mol Ther*. 2017; 25 (12): 2661–75. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. PubMed PMID: 28890324.
- Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardinger JA, Osmond SE, et al. Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 9: 33–46. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.12.004. PubMed PMID: 29349097.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Alipogene_tiparovec.
- Balasubramanian S, Aggarwal P, Sharma S. Lipoprotein Lipase Deficiency. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. PubMed PMID: 32809630.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Voretigene_neparovec.
- Available from: <https://www.askbio.com/newly-approved-spinal-muscular-atrophy-gene-therapy-zolgensma-validates-askbio-gene-therapy-platform/>.
- Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=adeno-associated+virus&cntry=&state=&city=&dist= retrieved on 2021-10-26>.

References

- Chen W, Yao S, Wan J, Tian Y, Huang L, Wang S, et al. BBB-crossing adeno-associated virus vector: An excellent gene delivery tool for CNS disease treatment. *J Control Release*. 2021; 333: 129–38. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.029. PubMed PMID: 33775685.
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18 (5): 358–78. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9. PubMed PMID: 30710128.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther*. 2010; 18 (1): 80–6. DOI: 10.1038/mt.2009.255. Epub 2009 Nov 10. PubMed PMID: 19904234.
- Bass-Stringer S, Bernardo BC, May CN, Thomas CJ, Weeks KL, McMullen JR. Adeno-Associated Virus Gene Therapy: Translational Progress and Future Prospects in the Treatment of Heart Failure. *Heart Lung Circ*. 2018; 27 (11): 1285–300. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.005. PubMed PMID: 29703647.
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016; 387 (10024): 1178–86. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00082-9. PubMed PMID: 26803443.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (1): 2–14. DOI: 10.1089/hum.2017.181. PubMed PMID: 29160173.
- Huang L, Wan J, Wu Y, Tian Y, Yao Y, Yao S, et al. Challenges in adeno-associated virus-based treatment of central nervous system diseases through systemic injection. *Life Sci*. 2021; 270: 119142. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119142. PubMed PMID: 33524419.
- Mijanović O, Branković A, Borovjagin A, Butnaru DV, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Shpichka A, Timashev P, Ulasov I. Battling Neurodegenerative Diseases with Adeno-Associated Virus-Based Approaches. *Viruses*. 2020; 12 (4): 460. DOI: 10.3390/v12040460. PubMed PMID: 32325732.
- Privolizzi R, Chu WS, Tijani M, Ng J. Viral gene therapy for paediatric neurological diseases: progress to clinical reality. *Dev Med Child Neurol*. 2021; 63 (9): 1019–29. DOI: 10.1111/dmcn.14885. PubMed PMID: 33834479.
- Nawaz W, Huang B, Xu S, Li Y, Zhu L, Yiqiao H, et al. AAV-mediated in vivo CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia. *Blood Cancer J*. 2021; 11 (6): 119. DOI: 10.1038/s41408-021-00508-1. PubMed PMID: 34162832.
- Bower JJ, Song L, Bastola P, Hirsch ML. Harnessing the Natural Biology of Adeno-Associated Virus to Enhance the Efficacy of Cancer Gene Therapy. *Viruses*. 2021; 13 (7): 1205. DOI: 10.3390/v13071205. PubMed PMID: 34201599.
- Colón-Thillet R, Jerome KR, Stone D. Optimization of AAV vectors to target persistent viral reservoirs. *Virol J*. 2021; 18 (1): 85. DOI: 10.1186/s12985-021-01555-7. PubMed PMID: 33892762.
- Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (22): 7827–32. DOI: 10.1073/pnas.0802866105. PubMed PMID: 18511559.
- Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. A Precise Chemical Strategy To Alter the Receptor Specificity of the Adeno-Associated Virus. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55 (36): 10645–9. DOI: 10.1002/anie.201604067. PubMed PMID: 27483453.
- Calcedo R, Morizono H, Wang L, McCarter R, He J, Jones D, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18 (9): 1586–8. DOI: 10.1128/CVI.05107-11. PubMed PMID: 21775517.
- Gadalla KKE, Vudhironarit T, Hector RD, Sinnott S, Bahey NG, Bailey MES, et al. Development of a Novel AAV Gene Therapy Cassette with Improved Safety Features and Efficacy in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 5: 180–90. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.04.007. PubMed PMID: 28497075.
- Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon CS, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, et al. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum Gene Ther*. 2017; 28 (6): 510–22. DOI: 10.1089/hum.2016.109. PubMed PMID: 28132521.
- Majowicz A, Maczuga P, Kwikkers KL, van der Marel S, van Logtenstein R, Petry H, et al. Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J Gene Med*. 2013; 15 (6–7): 219–32. DOI: 10.1002/jgm.2712. PubMed PMID: 23658149.
- Chamberlain K, Riyad JM, Weber T. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum Gene Ther Methods*. 2016; 27 (1): 1–12. DOI: 10.1089/hgtb.2015.140. PubMed PMID: 26757051.
- Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med*. 2013; 19 (7): 889–91. DOI: 10.1038/nm.3230. PubMed PMID: 23770691.
- Liu M, Maurano MT, Wang H, Qi H, Song CZ, Navas PA, et al. Genomic discovery of potent chromatin insulators for human gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2015; 33 (2): 198–203. DOI: 10.1038/nbt.3062. PubMed PMID: 25580597.
- Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*. 1995; 6 (10): 1329–41. DOI: 10.1089/hum.1995.6.10-1329. PubMed PMID: 8590738.
- Clément N, Knop DR, Byrne BJ. Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther*. 2009; 20 (8): 796–806. DOI: 10.1089/hum.2009.094. PubMed PMID: 19569968.
- Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther*. 2016; 24 (2): 287–97. DOI: 10.1038/mt.2015.187. PubMed PMID: 26437810.
- Kondratov O, Marsic D, Crosson SM, Mendez-Gomez HR, Moskalenko O, Mietzsch M, et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. *Mol Ther*. 2017; 25 (12): 2661–75. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. PubMed PMID: 28890324.
- Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardinger JA, Osmond SE, et al. Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017; 9: 33–46. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.12.004. PubMed PMID: 29349097.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Alipogene_tiparovec.
- Balasubramanian S, Aggarwal P, Sharma S. Lipoprotein Lipase Deficiency. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. PubMed PMID: 32809630.
- Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Voretigene_neparovec.
- Available from: <https://www.askbio.com/newly-approved-spinal-muscular-atrophy-gene-therapy-zolgensma-validates-askbio-gene-therapy-platform/>.
- Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=adeno-associated+virus&cntry=&state=&city=&dist= retrieved on 2021-10-26>.

ИЗМЕНЕНИЯ ТАНИЦИТОВ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ АРКУАТНОГО ЯДРА В СТРЕПТОЗОЦИНОВОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Д. Н. Воронков ✉, А. В. Ставровская, А. С. Гущина, А. С. Ольшанский

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Предполагается, что дисфункция таницитов может быть одним из звеньев патогенеза как болезни Альцгеймера, так и диабета 2-го типа. Целью работы было охарактеризовать морфологические изменения таницитов при моделировании болезни Альцгеймера. Крысам линии Вистар вводили стрептозоцин в дозе 3 мг/кг в латеральные желудочки мозга для моделирования болезни Альцгеймера. Оценивали изменения таницитов гипоталамуса через 2, 4 недели, 3 и 6 месяцев после введения токсина. Иммуногистохимическим методом выявляли маркерные белки таницитов (виментин, нестин), астроглии (GFAP, глутаминсинтетазы) и нейронов (HuC/D), а также оценивали пролиферацию клеток (по белку Ki67) и митохондриальные изменения (митохондриальный комплекс IV, PGC1a). Введение стрептозоцина привело к накоплению β -амилоидного пептида в гипоталамусе и увеличению размеров желудочков ($p < 0,001$). Стрептозоцин повреждал как $\alpha 1/\alpha 2$, так и $\beta 1$ -танициты. Интенсивность окрашивания на виментин $\alpha 1/\alpha 2$ таницитов снижалась к 4-й неделе ($p = 0,003$), а $\beta 1$ -таницитов — через три месяца ($p < 0,001$). Ту же направленность изменений наблюдали и для нестина. Снижалось число Ki67+ ядер ($p < 0,05$) и менялась экспрессия белков, связанных с митохондриями. К 4-й неделе после введения токсина плотность таницитов гипоталамуса снижалась. Кроме того, выявили активацию астроглии, однако выраженного повреждения как астроцитов, так и нейронов до четырех недель после введения стрептозоцина не наблюдали. Выявленная повышенная уязвимость таницитов к действию стрептозоцина согласуется с предположением о роли повреждения структур гипоталамуса в развитии как локальных, так и системных метаболических нарушений при моделировании болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: гипоталамус, танициты, стрептозоцин, болезнь Альцгеймера

Вклад авторов: Д. Н. Воронков — иммуногистохимическое исследование, морфометрический анализ, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; А. В. Ставровская — планирование исследования, стереотаксические операции, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование рукописи; А. С. Гущина, А. С. Ольшанский — стереотаксические операции, подготовка материала для морфологического исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом (решение № 2-5/19 от 20 февраля 2019 г.). Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS № 170) и директивой Совета европейских сообществ 2010/63/ЕС, Приказом МЗ РФ № 119Н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики», а также «Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами» (ГОСТ 33216-2014).

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Николаевич Воронков
пер. Обуха, д. 5, г. Москва, 105064, Россия; voronkov@neurology.ru

Статья получена: 07.10.2021 **Статья принята к печати:** 21.10.2021 **Опубликована онлайн:** 29.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.050

ALTERATIONS IN TANYCYTES AND RELATED CELL POPULATIONS OF ARCUATE NUCLEUS IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED ALZHEIMER DISEASE MODEL

Voronkov DN ✉, Stavrovskaya AV, Gushchina AS, Olshanskiy AS

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

It is assumed that dysfunction of tanyocytes could be one of the components of pathogenesis of both Alzheimer disease and type 2 diabetes mellitus. The study was aimed to assess alterations in the tanyocyte morphology in the Alzheimer disease model. The 3 mg/kg streptozotocin dose was injected in the lateral ventricles of Wistar rats in order to model the Alzheimer disease. Alterations in hypothalamic tanyocytes were assessed 2 weeks, 4 weeks, 3 months and 6 months after administration of the toxin. Immunohistochemistry was used to identify the protein markers of tanyocytes (vimentin, nestin), astrocytes (GFAP, glutamine synthetase) and neurons (HuC/D), as well as to assess cell proliferation (with the use of Ki67 protein) and mitochondrial alterations (mitochondrial complex IV, PGC1a). Administration of streptozotocin lead to β -amyloid accumulation in hypothalamus and ventricular enlargement ($p < 0.001$). Streptozotocin damaged both $\alpha 1/\alpha 2$ tanyocytes and $\beta 1$ tanyocytes. The intensity of vimentin staining in $\alpha 1/\alpha 2$ tanyocytes decreased by week 4 ($p = 0.003$), and in $\beta 1$ tanyocytes it decreased in three months ($p < 0.001$). The same trend was observed for nestin. The number of Ki67+ nuclei decreased ($p < 0.05$), and the expression of proteins associated with mitochondria changed. The density of hypothalamic tanyocytes decreased by week 4 after administration of the toxin. Moreover, astrocyte activation was revealed. However, no prominent damage to both astrocytes and neurons was observed within four weeks after administration of streptozotocin. The revealed high tanyocyte vulnerability to streptozotocin is in line with the hypothesis of the role of damage to hypothalamic structures in both local and systemic metabolic disorders occurring in the Alzheimer disease models.

Keywords: hypothalamus, tanyocytes, streptozocine, Alzheimer disease

Author contribution: Voronkov DN — immunohistochemical study, morphometric study, data analysis and interpretation, manuscript writing; Stavrovskaya AV — study planning, stereotactic surgery, data analysis and interpretation, manuscript writing and editing; Gushchina AS, Olshanskiy AS — stereotactic surgery, specimens preparation for morphological study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee (protocol № 2-5/19 dated February 20, 2019). The animals were manipulated in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS № 170) and the Council of the European Communities Directive 2010/63/EU, order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 119H "On Approval of Rules of Good Laboratory Practice" dated April 1, and GOST 33216-2014 "Rules for Working with Laboratory Rodents and Rabbits".

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry N. Voronkov
per. Obukha, 5, Moscow, 105064, Russia; voronkov@neurology.ru

Received: 07.10.2021 **Accepted:** 21.10.2021 **Published online:** 29.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.050

Производное глюкозамина и нитромочевин — стрептозоцин (СТЗ) является алкилирующим агентом и вызывает повреждения ДНК, приводя к снижению пролиферативной активности и гибели клеток. Благодаря химическому сходству с глюкозой СТЗ имеет высокое сродство к транспортеру глюкозы (GLUT2), избирательно захватывается β -клетками островков поджелудочной железы, что используют в терапии рака поджелудочной железы и при системном введении — для моделирования диабета у экспериментальных животных [1]. На клетках островков поджелудочной железы показано, что стрептозоцин приводит к разрывам ДНК и активации поли-(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP), что в свою очередь вызывает снижение уровня НАД (выступающего в качестве субстрата для PARP) и гибели клеток [2].

Интрацеребральное однократное введение СТЗ вызывает нейродегенеративные изменения. Предполагается, что СТЗ снижает локальный метаболизм глюкозы и энергетический обмен в мозге [3–5]. При внутрижелудочковом введении СТЗ происходит прогрессирующая гибель нейронов в гиппокампе и неокортексе, повреждение белого вещества мозга, дисфункция холинергической системы, что приводит к когнитивным нарушениям у животных [3]. Нейрохимические изменения, вызываемые СТЗ, включают накопление β -амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка и дисфункцию рецепторов инсулина [6–8]. Эти эффекты интрацеребрального введения СТЗ воспроизводят черты спорадической болезни Альцгеймера (БА), и находятся в соответствии с гипотезой диабета 3-го типа, связывающей нейродегенерацию при БА и локальную инсулинрезистентность [9–11]. Вместе с тем, точный механизм действия СТЗ в мозге не изучен, а гипотезу о прямой необратимой десенситизации инсулиновых рецепторов под действием СТЗ критикуют некоторые авторы [5].

Предполагается, что одной из причин развития БА служит дисрегуляция систем гипоталамуса, вовлеченных в обеспечение энергетического гомеостаза. В нейровизуализационных исследованиях показаны изменения ядер гипоталамуса у пациентов с БА. По некоторым данным, инсулинрезистентность и диабет повышают риск развития БА [12]. Вместе с тем, патоморфологические изменения клеточных популяций гипоталамуса на стрептозоциновой модели БА охарактеризованы недостаточно. В частности, интерес представляют изменения таницитов стенки третьего желудочка. Танициты — хемочувствительные глиозпендимные клетки. Выделяют несколько подтипов таницитов $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ [13], различающихся своим нейрохимическим профилем, локализацией в стенке третьего желудочка и связями с ядрами гипоталамуса. Танициты участвуют в регуляции гомеостаза, являются сенсорами глюкозы и жирных кислот и других нутриентов, а также гормонов лептина, грелина и инсулина, регулирующих метаболические процессы [14, 15]. Описано влияние направленного повреждения таницитов на ожирение, показана их роль в контроле пищевого поведения и связь с орексигенными нейронами аркуатного ядра [16; 17]. Из-за участия таницитов в системной регуляции энергетического обмена предполагается, что их дисфункция может быть одним из звеньев патогенеза как БА, так и диабета 2-го типа [15, 18]. Реакция таницитов на внутрижелудочковое введение СТЗ подробно не описана. Детализация изменений структур гипоталамуса на этой популярной модели БА позволит приблизиться к

пониманию вклада повреждения клеточных популяций гипоталамуса в патогенетические процессы при БА и диабете 2-го типа.

Цель настоящей работы — охарактеризовать динамику морфологических изменений таницитов гипоталамуса при стрептозоцин-индуцированной модели болезни Альцгеймера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В исследовании использовали 20 крыс линии Вистар (самцы, 320–350 г, возраст к началу эксперимента — 3 месяца), содержащихся в условиях вивария, при постоянном доступе к воде и пище. Животным ($n = 16$) делали интрацеребровентрикулярные инъекции СТЗ (Abcam; UK), а контрольной группе ($n = 4$) вводили 0,9%-й раствор NaCl. После введения токсина животных, получавших СТЗ, разделили случайным образом на четыре группы (по четыре особи в группе) и выводили из эксперимента декапитацией с помощью гильотины (OpenScience; Россия) через 2 недели, 4 недели, 3 месяца и 6 месяцев после инъекции.

Стереотаксическая операция

СТЗ растворяли в 0,9%-м NaCl в дозе 3 мг/кг, и при помощи стереотаксического манипулятора (Stoelting; США) вводили по 5 мкл раствора в оба боковых желудочка мозга. Для введения использовали следующие координаты: AP = –0,8; L = 1,5; V = 3,5 (по атласу G. Paxinos и C. Watson “The rat brain in stereotaxic coordinates”). В качестве анестезии применяли комбинированный препарат золазепам и тилетамин в дозе 3 мг/100 г и ксилазин в дозе 3 мг/кг внутримышечно, для премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10–15 мин до введения ксилазина гидрохлорида.

Иммуногистохимический анализ

Для иммуногистохимического исследования образцы мозга фиксировали 24 ч в 4%-м формалине, пропитывали 30%-й сахарозой и готовили замороженные фронтальные срезы толщиной 10 мкм в области гипоталамуса. Для демаскировки антигенов срезы нагревали 20 мин в пароварке в цитратном буфере (antigen retrieval buffer, pH = 6,0; Sigma; Германия). В работе использовали мышиные моноклональные антитела (Abcam; Великобритания) к маркерам таницитов — нестину (Nes) и виментину (Vim), кроличьи поликлональные антитела (Sigma; Германия) к белкам астроглии — кислому глиофибрилярному белку (GFAP) и глутаминсинтетазе (GS). Для выявления нейронов применяли мышиные антитела (Invitrogen; США) к PNH-связывающему белку HuC/D. Для оценки митохондриальных изменений использовали кроличьи антитела (Invitrogen; США) к PGC1 α (коактиватор транскрипции, регулятор биогенеза митохондрий) и MT-CO1 (субъединица I цитохром-С-оксидазы, комплекс IV дыхательной цепи митохондрий). Пролиферацию клеток оценивали с помощью кроличьих антител к Ki67 (Dako; Дания), а накопление β -амилоида выявляли с помощью кроличьих антител к β -амилоидному пептиду 1–42 (Sigma; Германия). Срезы инкубировали с первичными антителами 24 ч при комнатной температуре, разведение

антител выбирали в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации связывания использовали соответствующие пары вторичных антител к иммуноглобулинам мыши или кролика, конъюгированных с флуорохромами Alexa 488 или Alexa 555 (Invitrogen; США). Срезы заключали под покровные стекла в среду FluoroShield (Abcam; Великобритания), содержащую диамидинофенилиндол для мечения ядер клеток (DAPI).

Морфометрия и статистическая обработка данных

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse NiU (Nikon; Япония), оснащенного камерой Nikon DS-Qi (Nikon; Япония) и программным обеспечением NIS Elements (Nikon; Япония). Измерения проводили на 12-битных изображениях, полученных при одинаковых настройках осветительной системы микроскопа, при увеличении объектива $\times 20$ или $\times 40$. На изображениях вручную при помощи графического планшета (Wacom; Япония) выделяли области интереса (просвет желудочка, ядра или сомu клеток). Плотность клеток и интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания в областях интереса (результаты выражали в % от максимальной яркости — 4096 градаций серого) оценивали не менее чем в 25 полях зрения, на серии 6–8 фронтальных срезов, на разных уровнях гипоталамуса. Для оценки интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на MT- CO1 и PGC1 α на изображениях выделяли по 150–300 клеток для каждого животного. Данные по каждому животному усредняли. Данные по группе представляли в виде медианы и интерквартильного

размаха — Me [LQ; HQ]. Для статистического анализа использовали программы Statistica 12.0 (StatSoft; США) и GraphPad Prism (GraphPad software; США). Различия между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Краскелла–Уоллиса и последующего теста Данна для парных межгрупповых сравнений. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутрижелудочковое введение СТЗ вызвало нарастающее со временем повреждение стенки третьего желудочка и структур гипоталамуса. Макроанатомически обнаружили увеличение просвета третьего желудочка (рис. 1А, Г), уже на второй неделе после введения СТЗ его площадь на срезе была статистически значимо ($p < 0,001$) выше, по сравнению с контрольными животными — более чем в два раза, а на более поздних сроках продолжала увеличиваться. К шестому месяцу после введения площадь третьего желудочка на срезе увеличилась более чем в 20 раз, а в прилежащих ядрах гипоталамуса были выявлены некротические изменения. Воспроизведение характерных для болезни Альцгеймера патоморфологических признаков под введением СТЗ было подтверждено накоплением β -амилоидного пептида 1–42 в структурах гипоталамуса (рис. 1Б).

При выявлении виментина обнаружили повреждение глиоэпендимных элементов стенки третьего желудочка (рис. 1А). К четвертой неделе после введения СТЗ интенсивность окрашивания статистически значимо снижалась ($p = 0,003$) в области локализации $\alpha 1$ - и

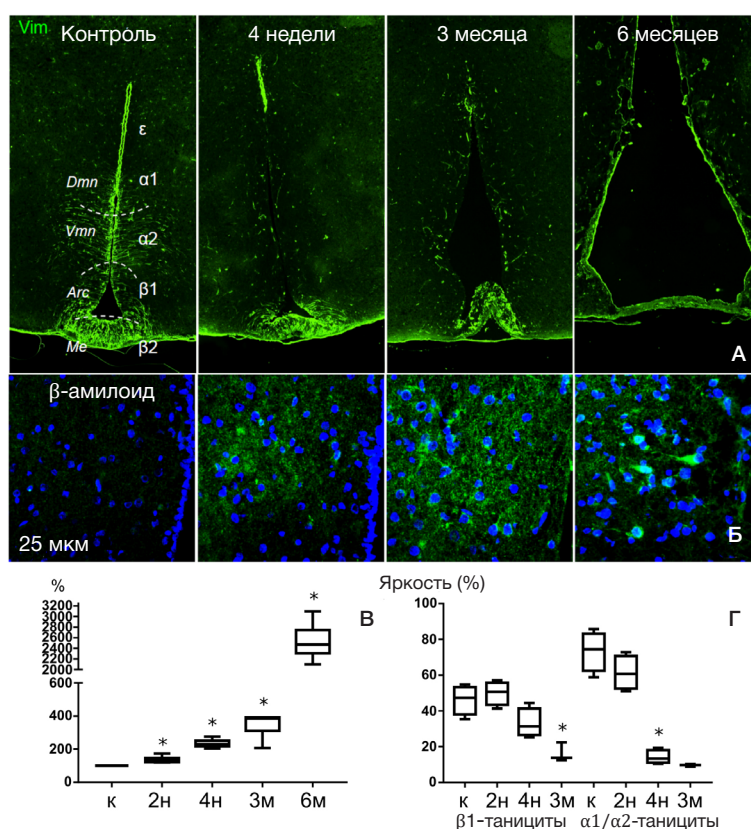


Рис. 1. Изменения третьего желудочка и прилежащих структур под действием стрептозоцина. **А.** Выявление виментина (Vim). **Б.** Выявление β -амилоида в аркуатном ядре гипоталамуса. **В.** Изменение площади третьего желудочка в процентах от контроля (к). **Г.** Изменение интенсивности окрашивания (яркость, в % от максимальной) на виментин в области локализации $\beta 1$ -таницитов и $\alpha 1/\alpha 2$ -таницитов. к — контроль; 2н, 4н, 3м, 6м — группы 2 и 4 недели, 3 и 6 месяцев после введения стрептозоцина; * — $p < 0,05$; греческими буквами обозначены популяции таницитов ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$) и эпэндиомитов (е); Dmn — дорсомедиальное ядро гипоталамуса; Vmn — вентромедиальное ядро гипоталамуса; Arc — аркуатное ядро гипоталамуса; Me — срединное возвышение гипоталамуса

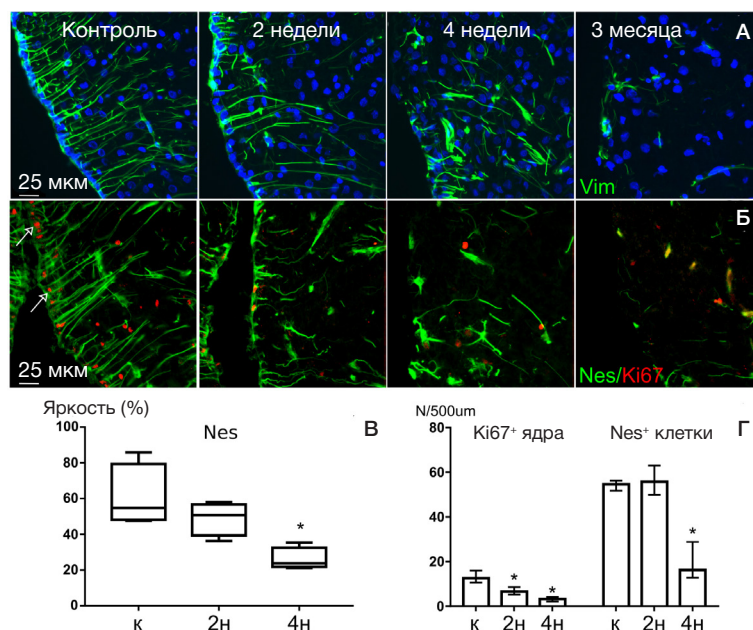


Рис. 2. Морфологические изменения таницитов под действием стрептозоцина. **А.** Выявление виментина (показано зеленым), ядра докрашены DAPI (синий). **Б.** Выявление нестина (зеленый) и Ki67 (красный); стрелки указывают на Ki67-позитивные ядра. **В.** Изменение интенсивности окрашивания на нестин (яркость, в % от максимальной). **Г.** Изменение числа Nes⁺ и Ki67⁺ глиоэпендимных клеток (число на ед. длины стенки желудочка). Обозначения см. на рис. 1

$\alpha 2$ -таницитов (формирующих связи, соответственно с дорсо-медиальным и вентро-медиальным ядрами гипоталамуса), по сравнению с контролем. В области локализации $\beta 1$ -таницитов (проецирующихся в аркуатное ядро) снижение окрашивания на виментин было менее выраженным, и статистически значимые изменения ($p < 0,001$) выявили только через три месяца после введения СТЗ. Эпендимоциты дорсальных отделов стенки третьего желудочка оставались сохранными до четвертой недели

после введения СТЗ. Отдельные Vim⁺-танициты срединного возвышения гипоталамуса сохранялись и после трех месяцев, тогда как в других зонах стенки третьего желудочка к шестому месяцу Vim⁺ глиоэпендимных клеток уже не выявляли. В связи с быстро нарастающим повреждением таницитов в настоящем исследовании мы сосредоточились преимущественно на оценке изменений стенки третьего желудочка на сроках 2 и 4 недели после введения СТЗ.

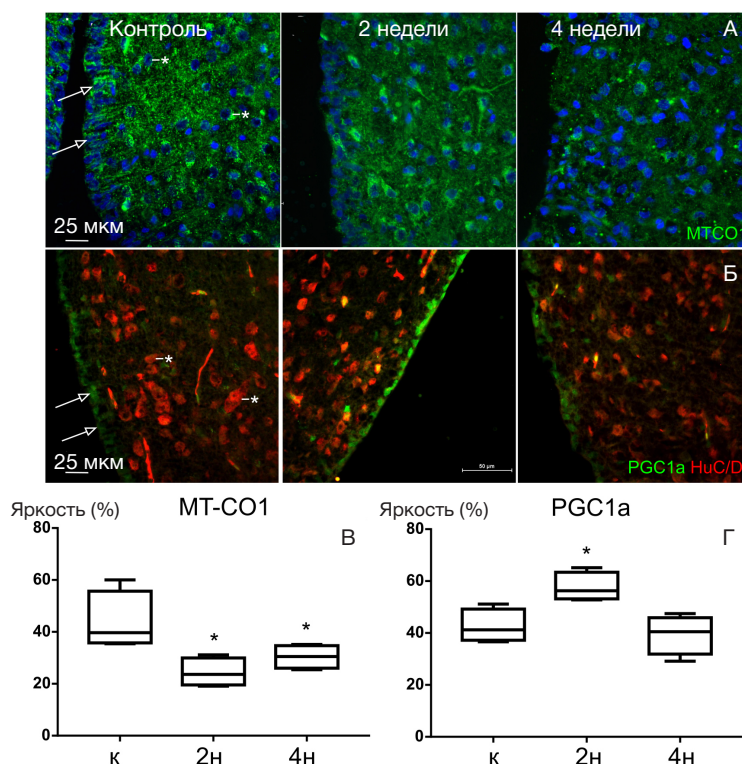


Рис. 3. Выявление ассоциированных с митохондриальными функциями белков таницитов. **А.** Выявление MT-CO1 (комплекс IV дыхательной цепи митохондрий); ядра докрашены DAPI (показано синим). **Б.** Выявление PGC1a (зеленый); нейроны (красный) выявляли при помощи антител к Hu C/D. **В.** Изменение интенсивности окрашивания тел таницитов на MT-CO1 (яркость, в % от максимальной). **Г.** Изменение интенсивности окрашивания ядер таницитов на PGC1a (яркость, в % от максимальной). Стрелки указывают на танициты, звездочки — на нейроны. Обозначения см. на рис. 1

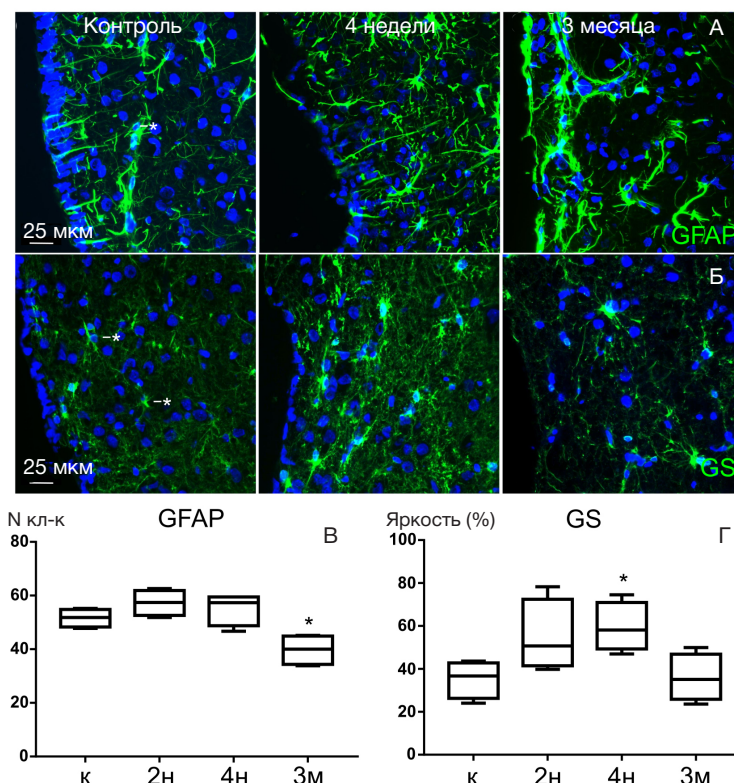


Рис. 4. Изменения астроглии в области аркуатного ядра (вблизи стенки третьего желудочка) гипоталамуса под действием стрептозоцина. **А.** Выявление GFAP (показано зеленым); ядра докрасены DAPI (синий). **Б.** Выявление глутаминсинтетазы (GS, зеленый); ядра докрасены DAPI (синий). **В.** Изменение числа GFAP-позитивных клеток в поле зрения. **Г.** Изменение интенсивности окрашивания на глутаминсинтетазу (яркость, в % от максимальной). Звездочками показаны астроциты. Обозначения как на рис.1.

Выявление как нестина, так и виментина позволило продемонстрировать морфологические изменения таницитов. Визуально, в области локализации $\beta 1/\alpha 2$ -таницитов и переходной зоне ($\beta 1/\alpha 2$ -танициты) на 2-й неделе после введения СТЗ отмечали утолщение Vim+ отростков и деформацию эпендимального слоя стенки желудочка (рис. 2А). Аналогичные изменения обнаруживали и при выявлении нестина (рис. 2А). Интенсивность окрашивания на нестин снижалась к 4-й неделе после введения СТЗ, по сравнению с контролем ($p = 0,024$), как и плотность Nes+ $\beta 1$ -таницитов ($p < 0,001$) (рис. 2В, Г). При этом число Ki-67 позитивных ядер таницитов статистически значимо снизилось ($p = 0,049$; рис. 2Г) уже ко 2-й неделе, что подтверждает влияние СТЗ на пролиферативную активность клеток.

Повреждению таницитов предшествовали изменения экспрессии белков, ассоциированных с митохондриальными функциями. Снижение по сравнению с контролем ($p = 0,013$) интенсивности окрашивания цитоплазмы таницитов в реакции с антителами к MT-CO1 (комплекс IV дыхательной цепи) выявляли со 2-й недели после введения СТЗ, до снижения плотности таницитов и уменьшения экспрессии нестина (рис. 3А, Б). При этом окрашивание на MT-CO1 в телах нейронов прилежащего аркуатного ядра сохранялось, а подсчет нейронов аркуатного ядра на 2-й и 4-й неделях после введения СТЗ не выявил значимого снижения их плотности по сравнению с контролем. Выявление коактиватора транскрипции PGC1 α (регулятора ряда митохондриальных функций) показало ко 2-й неделе статистически значимое ($p = 0,048$) повышение интенсивности окрашивания ядер таницитов (рис. 3Б, В), тогда как на 4-й неделе после введения СТЗ интенсивность окрашивания на PGC1 α снизилась до контрольных значений.

Для оценки изменений астроглии использовали иммуногистохимическое выявление GFAP и глутаминсинтетазы (GS). У интактных животных GFAP выявляли в значительной части глиоэпендимных клеток, тогда как уровень экспрессии GS в таницитах, по сравнению с астроглией, по-видимому, незначителен. Морфологические изменения GFAP-позитивных астроцитов в аркуатном ядре свидетельствовали о развитии реактивного глиоза под действием СТЗ уже ко 2-й неделе: наблюдали утолщение, деформацию отростков, усиление окрашивания на глиальные маркеры (рис. 4А, Б). Интенсивность окрашивания на GS возросла к 4-й неделе ($p = 0,03$), что, по-видимому, связано с увеличением площади астроцитов на срезе (рис. 4Б, Г). Вместе с тем, число (плотность) астроцитов не увеличивалось на ранних сроках после введения СТЗ, а к третьему месяцу — статистически значимо снизилось относительно контроля ($p = 0,019$; рис. 4В). В целом, изменения астроглии свидетельствовали о нарастающей нейровоспалительной реакции в прилежащих к третьему желудочку структурах гипоталамуса. Хотя СТЗ и вызвал повреждение астроцитов, они оказались более устойчивыми к действию токсина, по сравнению с таницитами.

Обобщая полученные результаты, можно отметить, что введение СТЗ привело к накоплению β -амилоида в структурах гипоталамуса, в том числе нейронах аркуатного ядра, вызвало увеличение размеров желудочков, что, очевидно, связано с повреждением глиоэпендимных элементов. Танициты разных типов отличались чувствительностью к СТЗ, однако как $\alpha 1/\alpha 2$, так и $\beta 1$ -танициты, повреждались на ранних сроках после введения СТЗ, что проявилось снижением их пролиферативной активности и изменением экспрессии белков, ассоциированных с митохондриями. Эти

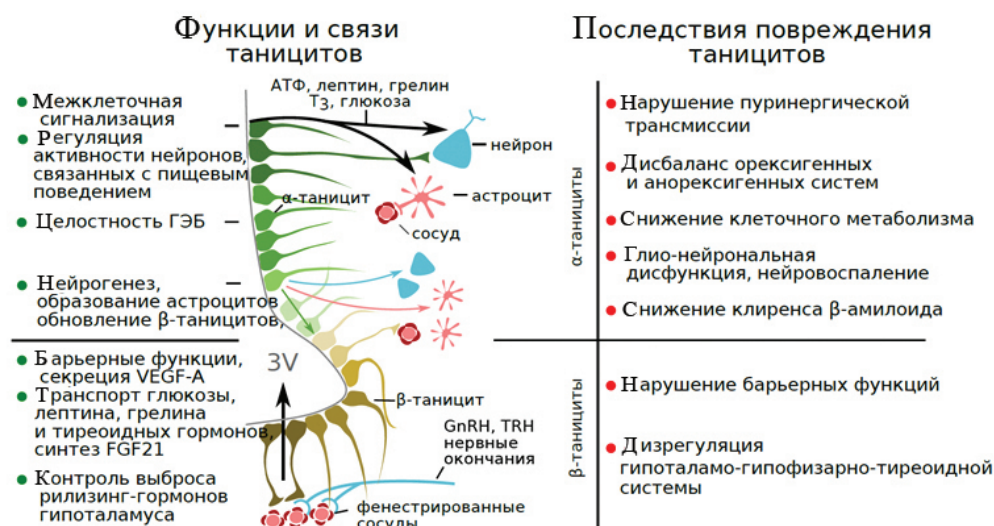


Рис. 5. Схема взаимодействия таницитов со структурами гипоталамуса и возможные последствия их повреждения. ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; VEGF-A — фактор роста эндотелия сосудов A; FGF21 — ростовой фактор фибробластов 21; T3 — трийодтиронин; GnRH — гонадолиберин; TRH — тиреолиберин

изменения возникли до выявления выраженных нарушений морфологии таницитов. К 4-й неделе после введения СТЗ плотность β1-таницитов третьего желудочка снизилась. Кроме того, СТЗ вызвал реактивные изменения и повреждение астроглии, однако плотность как астроцитов, так и нейронов аркуатного ядра до 4-х недель после введения токсина осталась неизменной, что указывает на большую уязвимость таницитов к СТЗ, по сравнению с другими клеточными популяциями гипоталамуса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большая часть работ по оценке морфологических и нейрохимических изменений на стрептозоциновой модели посвящена исследованиям гиппокампа в связи с его ролью в когнитивных нарушениях при БА. Эти данные согласуются с наблюдавшимися в нашей работе изменениями. Так, в экспериментах с внутрижелудочковым или интрацистернальным введением СТЗ показаны накопление β-амилоида в гиппокампе через три месяца после введения токсина, нарушение экспрессии синаптических белков, а также гибель нейронов и снижение объема гиппокампа [3, 19]. Выявлено влияние СТЗ и на астроциты гиппокампа: показано снижение количества и изменение структуры их отростков [20]. При введении СТЗ обнаружено снижение экспрессии рецепторов инсулина в гиппокампе [21]. Поскольку астроциты, предположительно, являются мишенью инсулина и нокаут инсулиновых рецепторов астроцитов вызывает когнитивные нарушения у животных [22], можно предположить, что дисфункция глиальных элементов имеет ведущую роль в вызываемых СТЗ локальных метаболических нарушениях.

Данные по изменениям таницитов у человека при БА в литературе не представлены. Охарактеризованы лишь возраст-зависимые нарушения организации отростков таницитов [23]. Вместе с тем, в патоморфологических исследованиях обнаруживают дегенеративные изменения, накопление β-амилоида и митохондриальные нарушения в ядрах гипоталамуса [24].

Механизмы, лежащие в основе дисфункции гипоталамуса при БА у человека, не выяснены. Многие исследователи помимо нейродегенерации отводят значительную роль изменениям синтеза, секреции и

транспорта гипоталамических гормонов и факторов [18, 24], участвующих в гомеостатической регуляции гипоталамо-гипофизарной системы, что может быть опосредовано нарушением функции таницитов. Например, танициты вовлечены в регуляцию высвобождения тиреолиберина и служат основным источником трийодтиронина в мозге. Причем, как для тиреолиберина, так и для трийодтиронина, показано нейропротекторное действие на моделях БА [25, 26].

Танициты экспрессируют GLUT2-транспортер [13, 27] и, соответственно, являются одной из клеточных мишеней СТЗ, и их повреждение, выявленное в нашей работе, — ожидаемый эффект введения токсина. Причины более выраженного повреждения α-таницитов в нашей работе могут быть связаны с неодинаковым уровнем экспрессии глюкозного транспортера и частотой обновления разных популяций таницитов, а также их метаболическими особенностями, для уточнения которых необходимы дальнейшие исследования. Наблюдавшиеся различия динамики изменений нестина и виментина могут быть объяснены тем, что хотя танициты всех типов экспрессируют эти белки, содержание виментина отличается для α и β-таницитов [18]. Кроме того, имеются данные о разнонаправленных изменениях регуляции белков цитоскелета в таницитах [28].

Важно, что изменения таницитов под действием СТЗ предшествовали другим нейродегенеративным и нейровоспалительным изменениям в гипоталамусе. В целом, учитывая, что танициты модулируют функции нейронов вентро-медиального, дорсо-медиального и аркуатного ядер гипоталамуса и вовлечены в механизмы регуляции как локального, так и системного энергетического обмена и в контроль пищевого поведения [15, 18, 29], их повреждение, вероятно, приводит к наблюдающимся на данной модели БА нарушениям углеводного обмена [30, 31]. Вместе с тем, дисфункцию структур гипоталамуса при введении СТЗ и показанные ранее нейродегенеративные изменения в гипоталамусе на поздних сроках [31] может провоцировать и нейровоспалительная реакция, затрагивающая помимо таницитов прочие клеточные популяции.

Выявленное нами снижение интенсивности окрашивания таницитов на MT-CO1 (субъединица 1 цитохром-С-оксидазы) согласуется со снижением активности цитохром-С-оксидазы на стрептозоциновой

модели диабета [32]. При исследовании коры и гиппокампа животных, которым вводили СТЗ, было показано снижение активности пируватдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, и цитохром-С-оксидазы в митохондриях как неокортекса, так и гиппокампа [33]. При внутрижелудочковом введении СТЗ помимо этого было показано снижение активности комплексов I–III митохондрий [34]. Эти данные подчеркивают ранее охарактеризованную *in vitro* чувствительность митохондрий к СТЗ [35]. Наблюдавшееся увеличение экспрессии PGC1 α (регулятора митохондриального биогенеза) на раннем сроке после введения СТЗ, по-видимому, можно рассматривать как компенсаторную реакцию в ответ на развивающиеся нарушения. Возвращение к исходному уровню PGC1 α , возможно, свидетельствует о частичной нормализации функций сохранных таницитов. В свою очередь, дисрегуляция PGC1 α связана с нейровоспалительными процессами и может быть одним из факторов, вносящих вклад в повреждение нейронов при БА [36,37]. Динамику выявляемых митохондриальных нарушений в разных структурах под действием СТЗ еще предстоит оценить.

Обнаруженное снижение пролиферации таницитов под действием СТЗ интересно сопоставить с ранее выявленным влиянием этого токсина на нейральные стволовые клетки в гиппокампе [38], а также его высокой токсичностью по отношению к незрелым нейронам [39]. Поскольку танициты, по-видимому, имеют нейрогенный потенциал [40], нарушение пролиферации и гибель нейральных стволовых клеток гипоталамуса под действием

СТЗ может иметь отсроченные эффекты, связанные с нарушением пластичности нейронных сетей гипоталамуса, контролирующими гомеостатические процессы.

На рис. 5 (по данным [14, 15, 17, 18]) обобщены некоторые функции α - и β - таницитов, предположительно вовлекаемые в патологические изменения на стрептозоцин-индуцированной модели БА. Вероятное вовлечение таницитов в патогенез БА предполагает возможность разработки фармакологических методов коррекции их функции. Ряд авторов считает возможной регуляцию пролиферации таницитов путем воздействия ростовых факторов [18].

ВЫВОДЫ

Полученные данные демонстрируют повышенную уязвимость таницитов гипоталамуса к СТЗ, снижение их пролиферативной активности и сопутствующие митохондриальные изменения. Изменения таницитов предшествовали активации астроглии и повреждению нейронов. Выявленные изменения в медио-базальном гипоталамусе позволяют предположить существенную роль повреждения таницитов в развитии локальных и системных метаболических нарушений при моделировании болезни Альцгеймера. Среди возможных функциональных последствий повреждения таницитов можно выделить: нарушение барьерных функций и снижение клеточного метаболизма в структурах гипоталамуса, дисбаланс оксигенных и аноксигенных эффектов, дисрегуляцию гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы.

Литература

1. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000; 43 (12): 1528–33.
2. Guzyk MM, Dyakun KO, Yanytska LV, Pryvrotska IB, Krynytska IY, Pishel IM, et al. Inhibitors of Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 as Agents Providing Correction of Brain Dysfunctions Induced by Experimental Diabetes. *Neurophysiology*. 2017; 49 (3): 183–93.
3. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2015; 122 (4): 577–92.
4. Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Grünblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic, M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2015; 122 (4): 565–76.
5. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53 (3): 1741–52.
6. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 101 (3): 757–70.
7. Rajasekar N, Dwivedi S, Nath C, Hanif K, Shukla R. Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. *Neuropharmacology*. 2014; 86: 337–52.
8. Ravelli KG, Rosário B dos A, Camarini R, Hernandez MS, Britto LR. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. *Neurotoxicity Research*. 2017; 31 (3): 327–33.
9. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017; 1863 (5): 1078–89.
10. Gupta S, Yadav K, Mantri SS, Singhal NK, Ganesh S, Sandhir R. Evidence for Compromised Insulin Signaling and Neuronal Vulnerability in Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55 (12): 8916–35.
11. Горина Я. В., Комлева Ю. К., Лопатина О. Л., Черных А. И., Салмина А. Б. Экспрессия молекул — компонентов инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2019; 13 (4): 28–37. DOI: 10.25692/ACEN.2019.4.5.
12. Vercruysse P, Vieau D, Blum D, Petersen A, Dupuis L. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 2. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00002.
13. Rizzotti K, Lovell-Badge R. Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 445: 7–13.
14. Geller S, Arribat Y, Netzhualcoyotzi C, Lagarrigue S, Carneiro L, Zhang L, et al. Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism*. 2019; 30 (4): 833–44.
15. Bolborea M, Langlet F. What is the physiological role of hypothalamic tanycytes in metabolism? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2021; 320 (6): R994–R1003.
16. Yoo S, Cha D, Kim S, Jiang L, Cooke P, Adebisin M, et al. Tanycyte ablation in the arcuate nucleus and median eminence increases obesity susceptibility by increasing body fat content in male mice. *Glia*. 2020; 68 (10): 1987–2000.
17. Bolborea M, Pollatzek E, Benford H, Sotelo-Hitschfeld T, Dale N. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through

- activation of the arcuate neuronal network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020; 117 (25): 14473–81.
18. Raikwar SP, Bhagavan SM, Ramaswamy SB, Thangavel R, Dubova I, Selvakumar GP, et al. Are Tanycytes the Missing Link Between Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease? *Molecular Neurobiology*. 2019; 56 (2): 833–43.
 19. Ahn Y, Seo J, Park J, Won J, Yeo HG, Kim K, et al. Synaptic loss and amyloid beta alterations in the rodent hippocampus induced by streptozotocin injection into the cisterna magna. *Lab Anim Res*. 2020; 36: 17.
 20. Zappa Villar MF, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodí LS, Morel GR, Reggiani PC. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018; 125 (12): 1787–803. DOI: 10.1007/s00702-018-1928-7.
 21. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21 (3): 261–73. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2010.11.009.
 22. González-García I, Gruber T, García-Cáceres, C. Insulin action on astrocytes: From energy homeostasis to behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2021; 33 (4): e12953. DOI: 10.1111/jne.12953.
 23. Koopman ACM, Taziaux M, Bakker J. Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence. *J Neuroendocrinol*. 2017; 29 (5). DOI: 10.1111/jne.12467.
 24. Ishii M, Iadecola C. Metabolic and Non-Cognitive Manifestations of Alzheimer's Disease: The Hypothalamus as Both Culprit and Target of Pathology. *Cell Metab*. 2015; 22 (5): 761–76. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.08.016
 25. Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimers Dis (Columbia)*. 2013; 1 (1). DOI: 10.7726/ajad.2013.1003
 26. Rodríguez-Rodríguez A, Lazcano I, Sánchez-Jaramillo E, Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, et al. Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 401. DOI: 10.3389/fendo.2019.00401.
 27. García M de los A, Millán C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, et al. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 86 (3): 709–24.
 28. Lewis JE, Ebling FJ. Tanycytes As Regulators of Seasonal Cycles in Neuroendocrine Function. *Front Neurol*. 2017; 8: 79. DOI: 10.3389/fneur.2017.00079. PMID: 28344570; PMCID: PMC5344904.
 29. Uranga RM, Millán C, Barahona MJ, Recabal A, Salgado M, Martínez F, et al. Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 3697.
 30. Bloch K, Gil-Ad I, Vanichkin A, Hornfeld SH, Koroukhov N, Taler M, et al. Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Obesity and Dementia in Lewis Rats. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 60 (1): 121–36.
 31. Ставровская А. В., Воронков Д. Н., Шестакова Е. А., Гущина А. С., Ольшанский А. С., Ямщикова Н. Г. Стрептозоцин-индуцированная болезнь Альцгеймера как самостоятельный фактор риска развития гипергликемии у крыс линии Вистар. *Проблемы эндокринологии*. 2019; 65 (5): 351–61.
 32. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired Mitochondrial Respiratory Functions and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12 (5): 3133–47.
 33. Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, LaManna JC, Perry G, et al. Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 2013; 10 (4). Available from: <https://DOI.org/10.2174/1567205011310040006>
 34. Poddar J, Singh S, Kumar P, Bali S, Gupta S, Chakrabarti S. Inhibition of complex I-III activity of brain mitochondria after intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats is possibly related to loss of body weight. *Heliyon*. 2020; 6 (7): e04490.24.
 35. Genrikhs EE, Stelmashook EV, Golyshev SA, Aleksandrova OP, Isaev NK. Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research Bulletin*. 2017; 130: 90–94. ht
 36. Sweeney G, Song J. The association between PGC-1 α and Alzheimer's disease. *Anatomy and Cell Biology*. 2016; 49 (1): 1.
 37. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020; 1–20.
 38. Sun P, Ortega G, Tan Y, Hua Q, Riederer PF, Deckert J, et al. Streptozotocin Impairs Proliferation and Differentiation of Adult Hippocampal Neural Stem Cells in Vitro-Correlation With Alterations in the Expression of Proteins Associated With the Insulin System. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018; 10. Available from: <https://DOI.org/10.3389/fnagi.2018.00145>.
 39. Isaev NK, Genrikhs EE, Voronkov DN, Kapkaeva MR, Stelmashook EV. Streptozotocin toxicity in vitro depends on maturity of neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018; 348: 99–104.
 40. Yoo S, Kim J, Lyu P, Hoang TV, Ma A, Trinh V, et al. Control of neurogenic competence in mammalian hypothalamic tanycytes. *Science Advances*. 2021; 7 (22): eabg3777. Available from: <https://DOI.org/10.1126/sciadv.abg3777>.

References

1. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000; 43 (12): 1528–33.
2. Guzyk MM, Dyakun KO, Yanytska LV, Pryvotska IB, Krynytska IY, Pishel IM, et al. Inhibitors of Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 as Agents Providing Correction of Brain Dysfunctions Induced by Experimental Diabetes. *Neurophysiology*. 2017; 49 (3): 183–93.
3. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2015; 122 (4): 577–92.
4. Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Grünblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic, M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2015; 122 (4): 565–76.
5. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53 (3): 1741–52.
6. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 101 (3): 757–70.
7. Rajasekar N, Dwivedi S, Nath C, Hanif K, Shukla R. Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. *Neuropharmacology*. 2014; 86: 337–52.
8. Ravelli KG, Rosário B dos A, Camarini R, Hernandez MS, Britto LR. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. *Neurotoxicity Research*. 2017; 31 (3): 327–33.
9. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017; 1863 (5): 1078–89.
10. Gupta S, Yadav K, Mantri SS, Singhal NK, Ganesh S, Sandhir R. Evidence for Compromised Insulin Signaling and Neuronal Vulnerability in Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2018; 55 (12): 8916–35.

11. Gorina YaV, Komleva YuK, Lopatina OL, Chernyh AI, Salmina AB. Jekspressija molekul — komponentov insulin-oposredovannoj signal'noj transdukcii v kletkah golovnogo mozga pri jeksperimental'noj bolezni Al'cgejmara. *Annaly klinicheskoy i jeksperimental'noj nevrologii*. 2019; 13 (4): 28–37. DOI: 10.25692/ACEN.2019.4.5. Russian.
12. Vercruysse P, Vieau D, Blum D, Petersen A, Dupuis L. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 2. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00002.
13. Rizzoti K, Lovell-Badge R. Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 445: 7–13.
14. Geller S, Arribat Y, Netzahualcoyotzi C, Lagarrigue S, Carneiro L, Zhang L, et al. Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism*. 2019; 30 (4): 833–44.
15. Bolborea M, Langlet F. What is the physiological role of hypothalamic tanycytes in metabolism? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2021; 320 (6): R994–R1003.
16. Yoo S, Cha D, Kim S, Jiang L, Cooke P, Adebisin M, et al. Tanycyte ablation in the arcuate nucleus and median eminence increases obesity susceptibility by increasing body fat content in male mice. *Glia*. 2020; 68 (10): 1987–2000.
17. Bolborea M, Pollatzek E, Benford H, Sotelo-Hitschfeld T, Dale N. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020; 117 (25): 14473–81.
18. Raikwar SP, Bhagavan SM, Ramaswamy SB, Thangavel R, Dubova I, Selvakumar GP, et al. Are Tanycytes the Missing Link Between Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease? *Molecular Neurobiology*. 2019; 56 (2): 833–43.
19. Ahn Y, Seo J, Park J, Won J, Yeo HG, Kim K, et al. Synaptic loss and amyloid beta alterations in the rodent hippocampus induced by streptozotocin injection into the cisterna magna. *Lab Anim Res*. 2020; 36: 17.
20. Zappa Villar MF, López Hanotte J, Falomir Lockhart E, Trípodí LS, Morel GR, Reggiani PC. Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018; 125 (12): 1787–803. DOI: 10.1007/s00702-018-1928-7.
21. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21 (3): 261–73. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2010.11.009.
22. González-García I, Gruber T, García-Cáceres, C. Insulin action on astrocytes: From energy homeostasis to behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2021; 33 (4): e12953. DOI: 10.1111/jne.12953.
23. Koopman ACM, Taziaux M, Bakker J. Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence. *J Neuroendocrinol*. 2017; 29 (5). DOI: 10.1111/jne.12467.
24. Ishii M, Iadecola C. Metabolic and Non-Cognitive Manifestations of Alzheimer's Disease: The Hypothalamus as Both Culprit and Target of Pathology. *Cell Metab*. 2015; 22 (5): 761–76. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.08.016.
25. Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimers Dis (Columbia)*. 2013; 1 (1). DOI: 10.7726/ajad.2013.1003.
26. Rodríguez-Rodríguez A, Lazcano I, Sánchez-Jaramillo E, Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, et al. Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 401. DOI: 10.3389/fendo.2019.00401.
27. García M de los A, Millán C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, et al. Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 86 (3): 709–24.
28. Lewis JE, Ebling FJ. Tanycytes As Regulators of Seasonal Cycles in Neuroendocrine Function. *Front Neurol*. 2017; 8: 79. DOI: 10.3389/fneur.2017.00079. PMID: 28344570; PMCID: PMC5344904.
29. Uranga RM, Millán C, Barahona MJ, Recabal A, Salgado M, Martínez F, et al. Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 3697.
30. Bloch K, Gil-Ad I, Vanichkin A, Hornfeld SH, Koroukhov N, Taler M, et al. Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Obesity and Dementia in Lewis Rats. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 60 (1): 121–36.
31. Stavrovskaya AV, Voronkov DN, Shestakova EA, Gushchina AS, Olshansky AS, Yamshikova NG. Streptozotocin-inducirovannaja bolezni' Al'cgejmara kak samostojatel'nyj faktor riska razvitiya giperglikemii u krysi linii Vistar. *Problemy jendokrinologii*. 2019; 65 (5): 351–61. Russian.
32. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired Mitochondrial Respiratory Functions and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12 (5): 3133–47.
33. Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, LaManna JC, Perry G, et al. Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 2013; 10 (4). Available from: <https://DOI.org/10.2174/1567205011310040006>
34. Poddar J, Singh S, Kumar P, Bali S, Gupta S, Chakrabarti S. Inhibition of complex I-III activity of brain mitochondria after intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats is possibly related to loss of body weight. *Heliyon*. 2020; 6 (7): e04490.24.
35. Genrikhs EE, Stelmashook EV, Golyshev SA, Aleksandrova OP, Isaev NK. Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research Bulletin*. 2017; 130: 90–94. ht
36. Sweeney G, Song J. The association between PGC-1 α and Alzheimer's disease. *Anatomy and Cell Biology*. 2016; 49 (1): 1.
37. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020; 1–20.
38. Sun P, Ortega G, Tan Y, Hua Q, Riederer PF, Deckert J, et al. Streptozotocin Impairs Proliferation and Differentiation of Adult Hippocampal Neural Stem Cells in Vitro-Correlation With Alterations in the Expression of Proteins Associated With the Insulin System. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018; 10. Available from: <https://DOI.org/10.3389/fnagi.2018.00145>.
39. Isaev NK, Genrikhs EE, Voronkov DN, Kapkaeva MR, Stelmashook EV. Streptozotocin toxicity in vitro depends on maturity of neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018; 348: 99–104.
40. Yoo S, Kim J, Lyu P, Hoang TV, Ma A, Trinh V, et al. Control of neurogenic competence in mammalian hypothalamic tanycytes. *Science Advances*. 2021; 7 (22): eabg3777. Available from: <https://DOI.org/10.1126/sciadv.abg3777>.

БОЛЕЗНЬ МОЯМОЯ КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У ВЗРОСЛЫХ

А. Ю. Вишнякова¹✉, Т. М. Ростовцева¹, Е. А. Ковражкина¹, Д. А. Головин¹, И. Л. Губский¹, С. Э. Лелюк², В. Г. Лелюк¹¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Болезнь моямоя (БММ) — редкая прогрессирующая идиопатическая артериопатия, являющаяся, как правило, причиной ишемического инсульта (ИИ) у детей младшего возраста, особенно в странах Восточной Азии. В редких случаях БММ может вызвать ИИ у взрослых лиц европеоидной расы, однако зачастую остается неverified. Для диагностики данной патологии применяют разные лучевые методы. В Японии отдается предпочтение магнитно-резонансной томографии (МРТ), где ввиду широкой распространенности БММ МРТ применяют для скрининга асимптомных лиц с наследственной предрасположенностью. Официальная статистика по БММ в России отсутствует. В случае развития острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) пациенты поступают в стационар инсультной сети, где им проводят рентгеновскую мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) головного мозга. Представлены клинические случаи применения комплексного лучевого исследования, а именно магнитно-резонансной томографии (МРТ) (T2, FLAIR, SWI, 3D-TOF), перфузионной компьютерной томографии (КТ) головного мозга, КТ-ангиографии интракраниальных артерий, ультразвукового дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий (ДС БЦА) четырех взрослых пациентов (трех мужчин и женщины в возрасте 38, 39, 51 и 57 лет) европеоидной расы с БММ, ставшей причиной развития ИИ. Описание результатов применения разных лучевых методов может помочь в своевременной верификации данной патологии и оптимизации дальнейшей тактики лечения.

Ключевые слова: болезнь моямоя, ишемический инсульт, МРТ головного мозга, МР-ангиография, КТ-ангиография, ультразвуковое дуплексное сканирование, транскраниальное дуплексное сканирование.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00171-19-01. Регистрационный номер темы АААА-А19-119042590018-0 от 29 марта 2019 г.

Вклад авторов: А. Ю. Вишнякова — анализ литературы, лучевое исследование пациентов, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; Т. М. Ростовцева — лучевое исследование пациентов, анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков; Е. А. Ковражкина — клиническое обследование пациентов; Д. А. Головин — лучевое исследование пациентов; И. Л. Губский — анализ и интерпретация полученных данных; С. Э. Лелюк — редактирование статьи; В. Г. Лелюк — концепция, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФЦМН (протокол от 4 октября 2021 г.), Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Юрьевна Вишнякова
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, г. Москва, 117997, Россия; vishau@yandex.ru

Статья получена: 29.09.2021 **Статья принята к печати:** 13.10.2021 **Опубликована онлайн:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.052

MOYAMOYA DISEASE AS A POSSIBLE CAUSE OF ISCHEMIC STROKE IN ADULT PATIENTS

Vishnyakova AY¹✉, Rostovtseva TM¹, Kovrazhkina EA¹, Golovin DA¹, Gubsky IL¹, Lelyuk SE², Lelyuk VG¹¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

Moyamoya disease (MMD) is a rare progressive idiopathic arteriopathy that usually leads to ischemic stroke (IS) in young children, especially of East Asian origin. MMD can cause IS in the Caucasian race, too, but often remains unverified. The diagnosis of MMD relies on diagnostic radiology findings. Magnetic resonance imaging (MRI) is widely used in Japan to identify asymptomatic individuals with hereditary predisposition to MMD. There are no official statistics on MMD in Russia. A patient experiencing an acute cerebrovascular accident (CVA) is hospitalized to a stroke unit, where they undergo a multislice computed tomography (MSCT) scan of the brain. Below, we report the results of a complex radiological examination, which included MRI (T2, FLAIR, SWI, 3D-TOF), cerebral MSCT perfusion imaging, CT angiography of intracranial arteries, duplex ultrasonography of brachiocephalic arteries and was conducted in 4 adult Caucasian patients (3 men and 1 woman aged 38, 39, 51, and 57 years, respectively) with a past IS caused by MMD. We hope that the findings of different imaging techniques may be helpful in establishing the timely diagnosis of MMD and optimizing the treatment strategies.

Keywords: moyamoya disease, ischemic stroke, brain MRI, MR-angiography, CT-angiography, duplex ultrasonography, transcranial duplex ultrasonography

Funding: the study was part of the State Assignment 056-00171-19-01. Topic ID: АААА-А19-119042590018-0 (March 29, 2019).

Author contribution: Vishnyakova AY — literature analysis, imaging, data analysis and interpretation, manuscript preparation; Rostovtseva TM — imaging, data analysis and interpretation, figures; Kovrazhkina EA — clinical examination; Golovin DA — imaging; Gubsky IL — data analysis and interpretation; Lelyuk SE — manuscript editing; Lelyuk VG — study concept, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of FSBI Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency (Protocol dated October 4, 2021). All patients gave informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia Yu. Vishnyakova
Ostrovityanova 1, str. 10, Moscow, 117997, Russia; vishau@yandex.ru

Received: 29.09.2021 **Accepted:** 13.10.2021 **Published online:** 31.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.052

Болезнь моямоя (БММ) — редкое цереброваскулярное заболевание (идиопатическая артериопатия), проявляющаяся прогрессирующим сужением терминальных отделов внутренних сонных артерий (ВСА) и/или проксимальных отделов артерий виллизиева круга (средних и передних мозговых артерий, СМА и ПМА) с формированием

аномальной сосудистой сети на основании головного мозга [1]. Официальная статистика по данному заболеванию в России отсутствует, однако о нем известно как о возможной причине развития инсульта у детей младшего возраста [2, 3]. БММ впервые описана в 1957 г. японскими врачами Takeuchi и Shimizu, в 1967 г. получила свое название от

японского слова «тоуатоуа», что в переводе означает «клубы сигаретного дыма в воздухе», именно такую картину напоминают изображения аномальной сосудистой сети на основании головного мозга при селективной ангиографии [4, 5]. Данная болезнь имеет наибольшую распространенность в странах Восточной Азии (Японии и Корее) — около 3,16 случаев на 100 000 человек, что в 7–10 раз превышает этот показатель в других странах мира [6, 7].

Патогенетические механизмы БММ остаются до конца не изученными. При микроскопическом исследовании пораженных артериальных стволов выявляются такие изменения сосудистой стенки, как фиброцеллюлярное утолщение интимы со складчатостью и сокращением внутренней эластической мембраны, пролиферация гладкомышечных клеток, истончение меди. При этом отсутствуют воспалительные и атеросклеротические изменения [8, 9]. Аномальная сосудистая сеть на основании головного мозга, которую принято называть сосудами маямоя, может быть сформирована расширенными лентикулостриарными, таламоперфорирующими либо хороидальными анастомозами [9, 10]. Степень выраженности поражений магистральных артериальных стволов, а также вовлеченность тех или иных коллатеральных сетей легли в основу ранжирования БММ на 6 стадий [11].

При поиске причины данной патологии с использованием полногеномного сцепления и анализа экзона был выявлен ген *RNF213* на хромосоме 17q25, признанный основным геном предрасположенности к БММ у жителей Восточной Азии [12] и демонстрировавший в последующих исследованиях сильное и очевидное этническое разнообразие [13]. По данным корейских ученых, полиморфизм 4950G>A гена *RNF213* причастен к возникновению БММ у взрослых, поэтому считается, что он может служить у них потенциальным биомаркером БММ [14].

Для БММ характерны бимодальные возрастные пики: первый пик приходится на возраст 5–10 лет, второй — на четвертое десятилетие жизни [1, 7, 9]. Женщины страдают этой болезнью почти в 2 раза чаще, чем мужчины. Основные клинические проявления — ишемические и геморрагические [7, 9, 15]. По данным европейских исследователей, на немногочисленных когортах взрослых пациентов с идиопатической БММ показано, что для них более характерны признаки церебральной ишемии [16].

Важность диагностики БММ как причины ИИ связана с высоким риском повторных сосудистых событий (пятилетний риск повторного инсульта по Каплану–Мейеру достигает 80,95% после первого ишемического события для всех пациентов) [17]. Основным методом лечения пациентов с БММ хирургический (операции реваскуляризации головного мозга, позволяющие снизить этот риск) [2, 6, 18].

В этой работе мы хотим обратить внимание на БММ как возможную причину развития ИИ у взрослых, которую необходимо своевременно диагностировать.

Описание клинических случаев

В Федеральном центре мозга и нейротехнологий (Москва, Россия) в 2020 г. обследовали 426 пациентов, перенесших ОНМК. Среди них выявили три пациента с БММ после перенесенного ИИ. Одна пациентка с БММ была обследована амбулаторно. Только в одном случае

БММ диагностировали ранее, в остальных трех — после проведенного нами обследования.

Пациенты

Пациент Б, 38 лет. Перенес лакунарный инсульт в 2016 г.: внезапный приступ головокружения, который самостоятельно купировался через короткий промежуток времени. Пациент был обследован в Научно-исследовательском институте им. Н. В. Склифосовского, где выявили БММ 3-й стадии. Дважды был оперирован по этому поводу в 2017 г. и 2018 г. — наложены экстра-интракраниальные микрососудистые анастомозы (ЭИКМА) слева и справа.

Пациент Г, 39 лет. Перенес ИИ в бассейне правой СМА в феврале 2020 г. После проведенного лечения в стационаре и реабилитации постепенно смог передвигаться с опорой на трость в пределах квартиры, частично обслуживать себя в быту. Диагноз при поступлении в центр: поздний восстановительный период ИИ в бассейне правой СМА от января 2020 г., неуточненный патогенетический подтип.

Пациент Ю, 51 год. Клинические проявления манифестировали в сентябре 2017 г., когда остро развился парез лицевого нерва, появилось поперхивание при глотании, нечеткость речи. Был госпитализирован в стационар по месту жительства, где при МРТ головного мозга в белом веществе больших полушарий выявили множественные очаги, расцененные как демиелинизирующие. Соответствующее лечение проводили вплоть до сентября 2019 г. В 2019 г. по результатам дообследования диагноз рассеянного склероза был снят. Диагноз при поступлении: энцефалопатия смешанной этиологии. Последствия ОНМК неясного генеза от сентября 2017 г. и марта 2018 г.

Пациентка В, 57 лет. Перенесла лакунарный ИИ в системе левой СМА в возрасте 36 лет с легким парезом в правой кисти, который был тогда расценен как периферическая нейропатия; двигательная активность в руке восстановилась в течение недели. Жалобы на периодические потери сознания, частые головные боли и головокружение. В настоящее время в неврологическом статусе выявлены негрубые координаторные нарушения в усложненных пробах. Пациентка была обследована 10 лет назад. Данные МРТ интерпретированы как вариант строения артерий головного мозга.

Всех пациентов обследовали в соответствии с внутренним протоколом, который включал проведение МРТ и мультиспиральную компьютерную томографию МСКТ головного мозга и интракраниальных артерий, МСКТ-перфузию головного мозга, ультразвуковое дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий (ДС БЦА) на экстра- и интракраниальном уровнях. МРТ головного мозга выполняли на томографе Discovery 370 MR, 3Тл (GE; США). Протокол сканирования включал T1- и T2-ВИ, ИП FLAIR (с изотропным вокселем, толщиной среза 1 мм), диффузионно-взвешенные изображения (DWI); изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости (SWAN); времяпролетную ангиографию интракраниальных артерий (3D-TOF). МСКТ головного мозга с МСКТ-ангиографией и перфузией выполняли на 128-срезовом компьютерном томографе Optima (GE; США). Для контрастного усиления использовали йопромид (370 мг йода/мл). Высокоразрешающее ультразвуковое ДС БЦА выполняли на сканере Philips Epiq 7G (Philips; США).

*Данные магнитно-резонансной томографии
головного мозга*

У всех пациентов выявлены признаки исхода инфарктов и очаги глиоза в белом веществе больших полушарий, в зонах смежного кровоснабжения между СМА и ПМА. У одного из четырех пациентов (пациент Г) были также выявлены признаки исхода инфаркта в бассейне глубоких перфорирующих ветвей правой СМА (рис. 1). У третьего пациента (пациент Ю) обнаружены участки геморрагической трансформации инфарктов по типу петехий. Внутрочерепных кровоизлияний ни у одного пациента выявлено не было. На Т2-взвешенных изображениях головного мозга в области проксимальных отделов СМА с обеих сторон визуализировалась сеть мелких сосудов, сами стволы СМА на этом уровне не определялись (рис. 2).

По данным бесконтрастной МР-ангиографии у всех пациентов выявили билатеральное значительное сужение терминальных отделов ВСА (вплоть до полной окклюзии) и проксимальных отрезков СМА. ПМА были сохранены у пациентов Б и Г, у одного из них они были малого диаметра. У двух других пациентов (Ю и В) проксимальные отделы ПМА также были поражены (рис. 3). У всех обследованных обращали на себя внимание широкие задние мозговые артерии (ЗМА) и задние соединительные артерии (ЗСоА).

*Данные мультиспиральной рентгеновской
КТ головного мозга*

При КТ-ангиографии интракраниальных артерий выявлена патологическая сосудистая сеть (рис. 4; *стрелки*) вместо стволов М1-сегментов СМА, а также усиление сосудистого

рисунка (лентикулостриарные артерии) в области базальных ганглиев разной степени выраженности, что отражало разные стадии БММ у обследованных. Патологическая сосудистая сеть была хорошо выражена у пациентов Б и В — расценено как 3 стадия болезни, и менее выражена у пациентов Ю и Г (с более выраженным неврологическим дефицитом, большим количеством и протяженностью зон инфаркта), что вероятно, соответствовало более поздним стадиям, на которых имеет место регресс анастомотической сосудистой сети на основании головного мозга. Дистальные отделы основных стволов СМА и ПМА прослеживались, и в ряде случаев их диаметр достигал нормальных размеров.

У троих из четырех обследованных отмечены признаки гипоперфузии в бассейнах СМА и ПМА на фоне повышения перфузии в заднем бассейне (рис. 5). У четвертого (пациент Б) было осуществлено наложение ЭИКМА с обеих сторон и имело место значительно менее выраженное снижение перфузии в зонах смежного кровоснабжения СМА с ПМА и СМА с ЗМА.

*Данные ультразвукового дуплексного
сканирования брахиоцефальных артерий*

На экстракраниальном уровне при ультразвуковом ДС БЦА не было выявлено значимых изменений ВСА, диаметры артерий и скоростные характеристики кровотока в них соответствовали нормативным значениям (у большинства пациентов соответствовали нижней границе нормы). Диаметры позвоночных артерий (ПА) значительно варьировали, кровоток в ПА был нормальным либо несколько усиленным. В целом данные

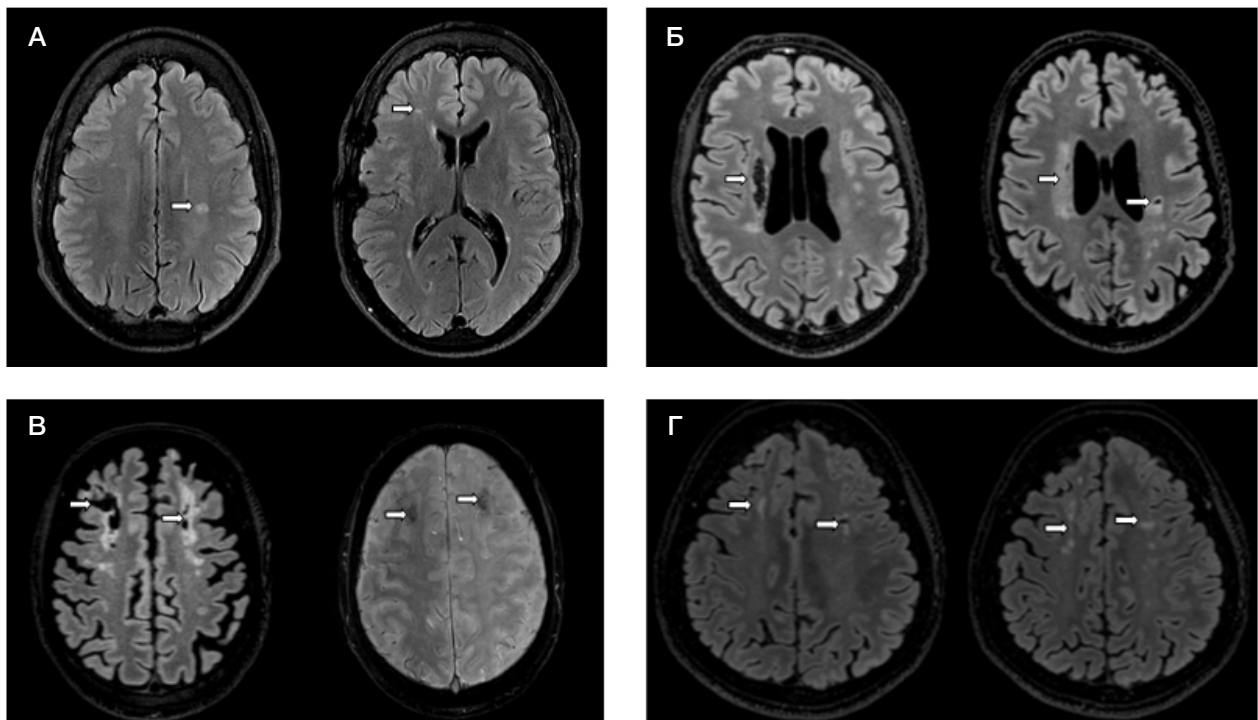


Рис. 1. Постинфарктные изменения головного мозга у взрослых пациентов с болезнью моямой на МРТ. **А.** Пациент Б (ИП FLAIR в аксиальной плоскости): в белом веществе задних отделов лобной доли левой гемисферы обнаружена небольшая зона постинфарктных изменений; в белом веществе правой лобной доли (в зоне смежного кровоснабжения СМА/ПМА) — немногочисленные мелкие очаги глиоза; показаны *стрелками*. **Б.** Пациент Г (ИП FLAIR в аксиальной плоскости): зоны постинфарктных кистозно-глиозных изменений выявлены справа в области скорлупы и семиовального центра (бассейн латеральных лентикулостриарных артерий), слева в области семиовального центра (внутренняя зона водораздела); показаны *стрелками*. **В.** Пациент Ю (слева ИП FLAIR в аксиальной плоскости, справа ИП SWI в аксиальной плоскости): в белом веществе лобных долей (зоны смежного кровоснабжения СМА/ПМА) определены зоны постинфарктных изменений с признаками геморрагической трансформации по типу петехий (1-й тип по ECASS II); показаны *стрелками*. **Г.** Пациентка В (ИП FLAIR в аксиальной плоскости): в белом веществе лобных долей (зоны смежного кровоснабжения СМА/ПМА) определены зона исхода мелкоочагового инфаркта, множественные очаги глиоза; показаны *стрелками*

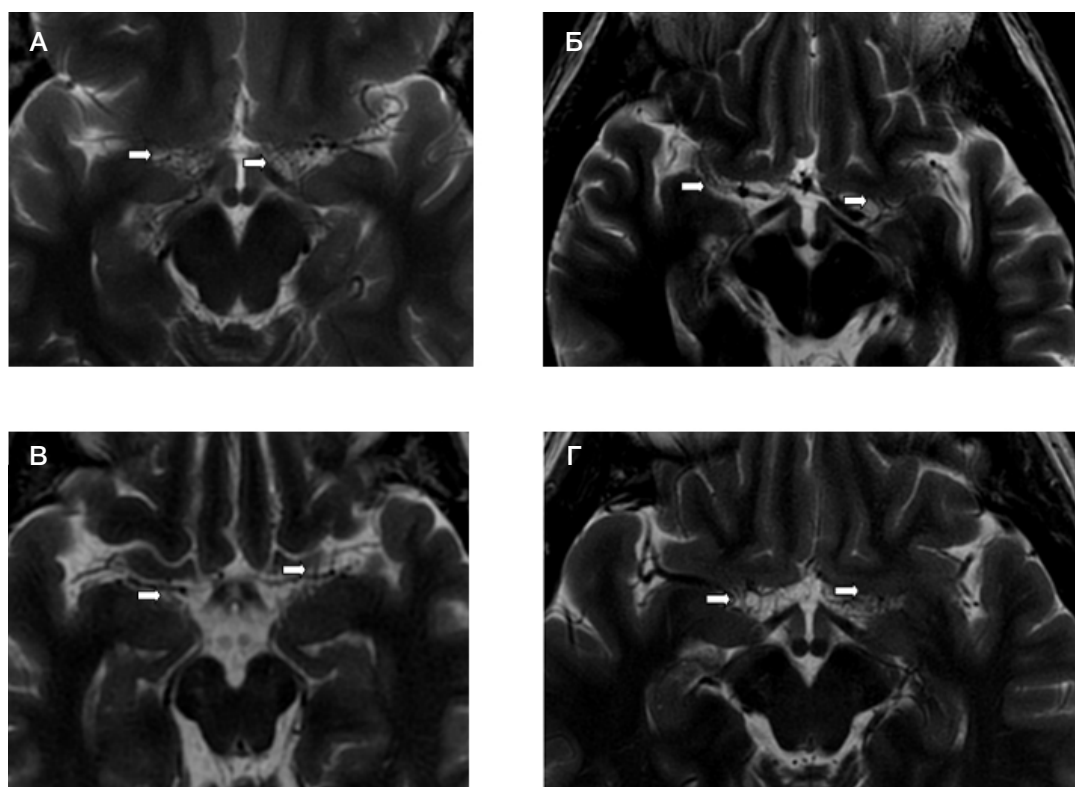


Рис. 2. Патологическая сосудистая сеть на основании головного мозга у взрослых пациентов с болезнью moyama на МРТ (T2 В1 в аксиальной плоскости). Проксимальные отделы СМА отчетливо не визуализируются, в их проекции заметна сеть мелких сосудов (стрелки). **А.** Пациент Б. **Б.** Пациент Г. **В.** Пациент Ю. **Г.** Пациентка В.

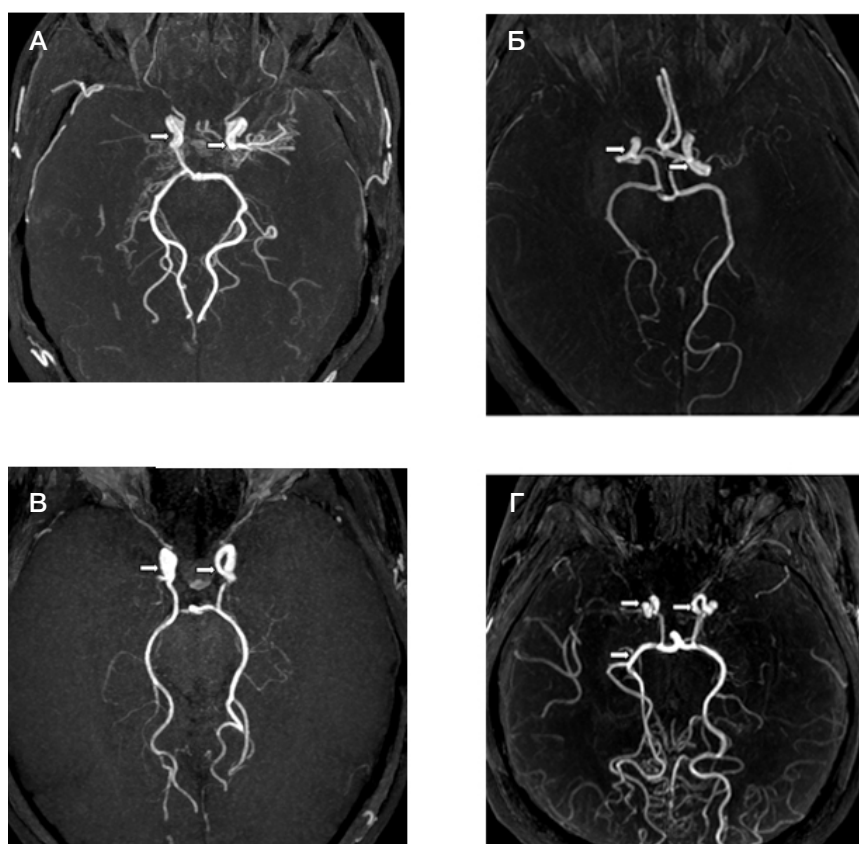


Рис. 3. Сосудистые изменения у взрослых пациентов с болезнью moyama при 3D-TOF МР-ангиографии. **А.** Пациент Б: отсутствие МР-сигнала от кровотока по дистальным отделам ВСА, проксимальным отделам СМА (стрелки). Проксимальные отделы ПМА прослеживаются, сужены. ЗМА не изменены. **Б.** Пациент Г: значительное сужение просвета по кровотоку в дистальных отделах ВСА, отсутствие МР-сигнала от кровотока по проксимальным отделам СМА (стрелки). ПМА не изменены. ЗСоА, ЗМА несколько расширены. **В.** Пациент Ю: отсутствие МР-сигнала от кровотока по дистальным отделам ВСА, проксимальным отделам СМА и ПМА (стрелки). ЗСоА, ЗМА не изменены. **Г.** Пациентка В: отсутствие МР-сигнала от кровотока по дистальным отделам ВСА, проксимальным отделам СМА и ПМА. ЗСоА, ЗМА расширены (стрелки)

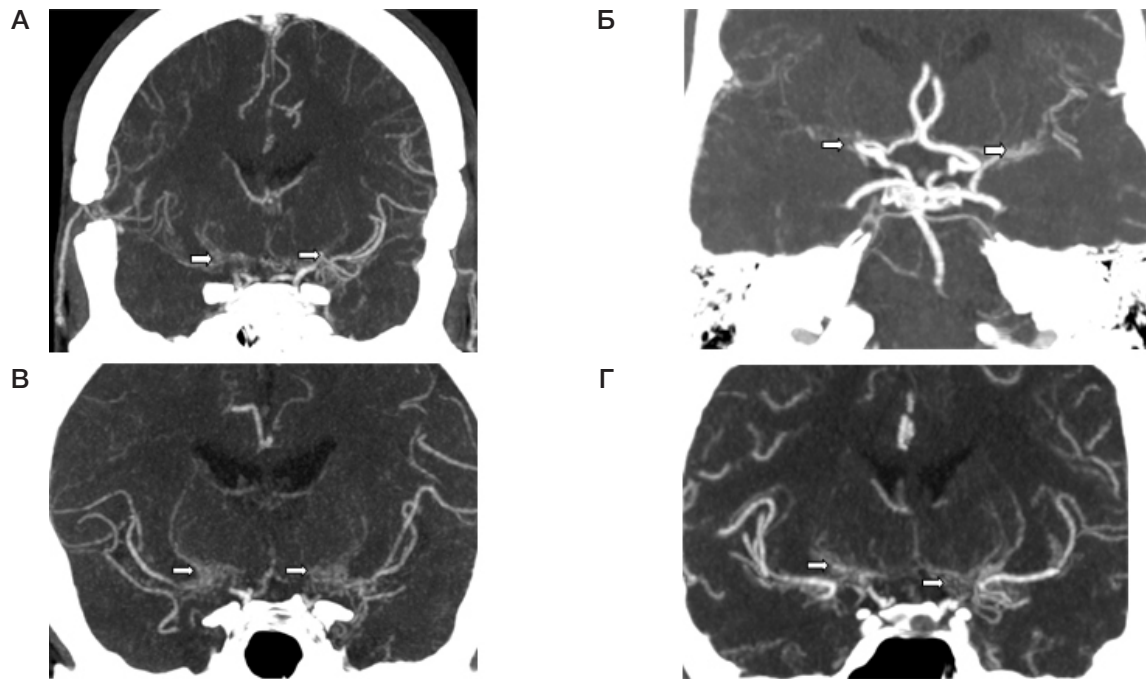


Рис. 4. Сосудистые изменения у взрослых пациентов с болезнью моямая при КТ-ангиографии интракраниальных артерий (косокорональные реконструкции). **А.** Пациент Б: дистальные отделы обеих ВСА, проксимальные отделы обеих СМА не удалось визуализировать (окклюзированы); в их проекции определена сеть мелких сосудистых анастомозов. Усилен сосудистый рисунок (лентикулостриарные артерии) в области базальных ганглиев. В височных костях с обеих сторон обнаружены трепанационные дефекты, визуализирован кровоток по экстра-интракраниальным анастомозам. **Б.** Пациент Г: сужение дистальных отделов обеих ВСА, окклюзия проксимальных отделов обеих СМА, в их проекции выявлена сеть мелких сосудистых анастомозов. ПМА прослеживаются, имеют нормальный диаметр. **В.** Пациент Ю: дистальные отделы обеих ВСА, проксимальные отделы обеих СМА окклюзированы, в их проекции определена сеть мелких сосудистых анастомозов. **Г.** Пациентка В: дистальные отделы обеих ВСА, проксимальные отделы обеих СМА окклюзированы, в их проекции определена сеть мелких сосудистых анастомозов. Усилен сосудистый рисунок (лентикулостриарные артерии) в области базальных ганглиев

ДС экстракраниальных отделов БЦА не имели значимых изменений.

При транскраниальном ДС у двух (Ю и В) из четырех пациентов диагностировали стенозы терминальных отделов обеих ВСА по наличию локального

гемодинамического перепада в их проекциях (рис. 63, И). В проекциях М1-сегментов СМА в режиме цветового доплеровского кодирования (ЦДК) были визуализированы множественные или единичные разнонаправленные потоки, переплетающиеся между собой. В спектральном

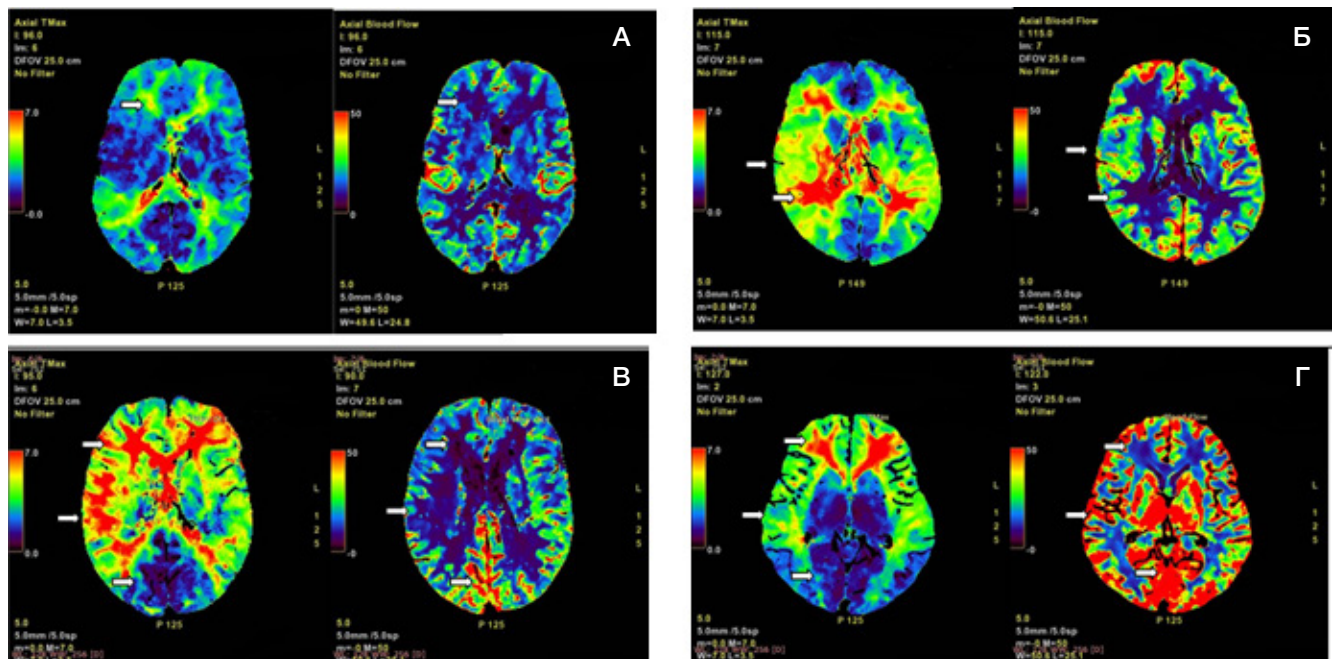


Рис. 5. КТ-перфузия головного мозга (Axial). Карты показателей КТ-перфузии головного мозга (T_{max} и CBF). **А.** Пациент Б: в зонах смежного кровоснабжения СМА/ПМА, СМА/ЗМА выявлено пролонгированное контрастирование (умеренное повышение T_{max} до 4–5 с) с умеренным снижением перфузии (стрелки). **Б.** Пациент Г: критическая гипоперфузия в зонах смежного кровоснабжения СМА/ПМА, СМА/ЗМА ($T_{max} > 6$ с), умеренная гипоперфузия в бассейнах СМА ($T_{max} \sim 5$ с) (стрелки). **В.** Пациент Ю: критическая гипоперфузия в зонах смежного кровоснабжения СМА/ПМА, СМА/ЗМА ($T_{max} > 6$ с), гипоперфузия в бассейнах СМА и ПМА (изменения более выражены справа) на фоне гиперперфузии в бассейнах ЗМА (стрелки). **Г.** Пациентка В: критическая гипоперфузия ($T_{max} > 6$ с) в зонах смежного кровоснабжения СМА/ПМА, умеренная гипоперфузия в бассейнах корковых ветвей СМА и ПМА на фоне гиперперфузии в бассейнах ЗМА (стрелки)

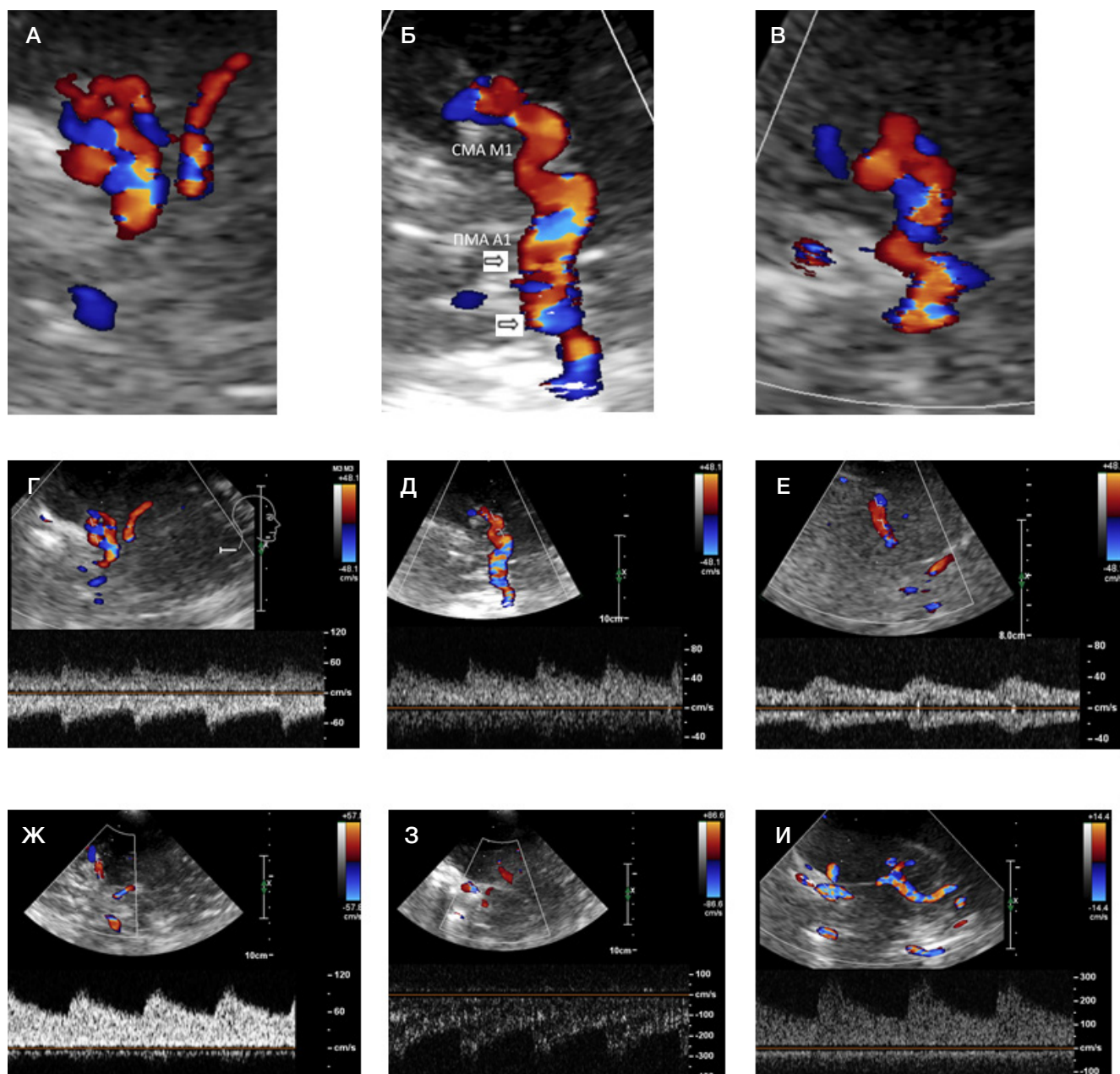


Рис. 6. Транскраниальное дуплексное сканирование (каротидный бассейн), режим ЦДК (А–В), режим ЦДК и спектральный доплер (Г–Ж). **А, Г.** Пациент Б: в проекции М1-сегмента СМА лоцируются разнонаправленные многочисленые потоки. ПМА не лоцируются. **Б, Д.** Пациент Г: в проекции проксимального отрезка М1-сегмента СМА (до места сужения) лоцируются единичные потоки. Определяются потоки обычного направления в А1-сегментах ПМА (стрелки). **В, Е.** Пациентка В: в проекции М1-сегмента СМА лоцируются разнонаправленные переплетающиеся между собой потоки; доплеровский спектр потока в М2-сегменте СМА выше места сужения артерии (коллатеральный тип). ПМА не лоцируются. **Ж.** Пациент Ю: при ультразвуковом исследовании не удалось лоцировать ни М1-сегменты СМА, ни А1-сегменты ПМА. Представлен доплеровский спектр потока в М2-сегменте СМА выше места сужения (коллатеральный тип). **З.** Пациент Ю: доплеровский спектр потока в терминальном отделе левой ВСА — локальное повышение линейной скорости кровотока, что соответствует стенозу артерии. Аналогичная картина имела место и с правой стороны. **И.** Пациентка В: доплеровский спектр потока в терминальном отделе левой ВСА — локальное повышение линейной скорости кровотока, что соответствует стенозу артерии. Аналогичная картина имела место и с правой стороны

доплеровском режиме потоки в этих сосудах имели умеренно или значительно сниженный уровень периферического сопротивления, характерный для коллатерального типа кровотока, и умеренное снижение скоростных характеристик потоков (рис. 6А–Ж). Помимо этого, у всех обследованных лоцировались ЗСоА с высокоскоростным кровотоком, направленным в сторону вертебрально-базиллярного бассейна (ВББ), отмечено усиление кровотока в ЗМА и их ветвях. ЗМА можно было визуализировать вплоть до 3–4 сегментов (рис. 7). При локализации дистальных сегментов ПА (V4) и основной артерии (ОА) в двух случаях (пациенты Б и В) выявлено

компенсаторное повышение кровотока, в двух других случаях (Г и Ю) оно отсутствовало.

Обсуждение клинических случаев

Характерные для БММ сосудистые изменения можно было диагностировать с помощью разных сосудистых методик. У описываемых нами пациентов на Т2-ВИ на основании головного мозга вместо крупных стволов М1-сегментов СМА была визуализирована патологическая сосудистая сеть. При бесконтрастной МР-ангиографии отмечены окклюзии дистальных (супраклиноидных) отделов ВСА и

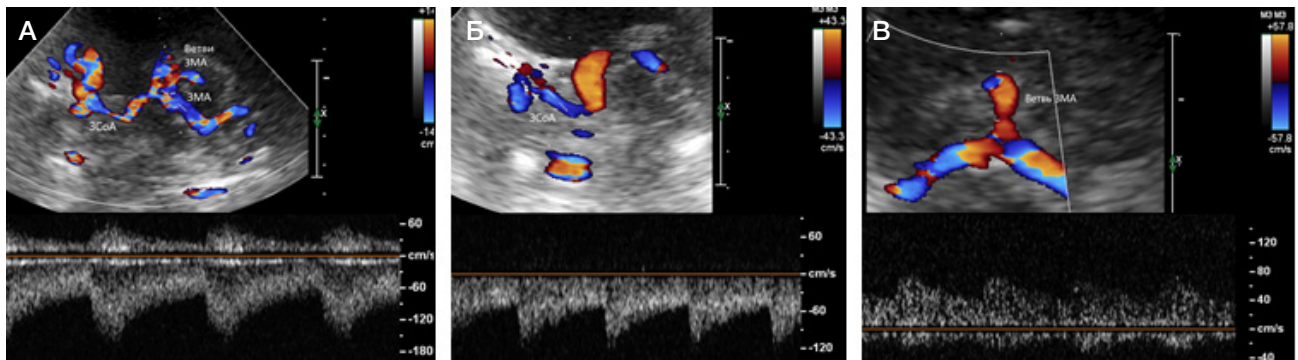


Рис. 7. Транскраниальное дуплексное сканирование ЗСоА и ЗМА (ЦДК, спектральный доплер). **А.** Пациентка В: в режиме ЦДК визуализируется цветовая картограмма ЗСоА, ЗМА (Р2-Р3 сегменты) и ее ветвей. Такое изображение возможно в связи с усиленным кровотоком в этих артериях. **Б.** Пациент Г: лоцируется ЗСоА с высокоскоростным потоком. **В.** Пациент Ю: лоцируется височная ветвь ЗМА с высокоскоростным потоком

проксимальных участков СМА, а в двух случаях — и ПМА. Однако только у одного пациента (Б) при МРА была хорошо заметна сеть мелких сосудов по типу «клубов дыма». МСКТ-ангиография позволила более детально визуализировать лентикулостриарные артерии в базальных ганглиях и anomalous сетевидные сосуды на основании головного мозга во всех без исключения случаях, подтвердив, таким образом, диагноз БММ.

При ультразвуковом исследовании БЦА на экстракраниальном уровне явных и специфических изменений ВСА и ПА выявлено не было. Такой диагностический критерий, как уменьшение диаметров ВСА [1], у описываемых лиц зафиксирован не был, что можно объяснить нетипичным для других вариантов поражений ВСА уровнем окклюзии. При БММ окклюдировались супраклиноидные отделы ВСА, причем выше отхождения ЗСоА, они представляли коммуникативными сегментами ВСА и их бифуркациями. Этот ключевой момент играет роль в перераспределении мозгового кровотока из систем ВСА через ЗСоА в ВББ и далее по ЗМА и их ветвям через корковые и лептоменингеальные анастомозы обратно в системы СМА и ПМА. Таким образом, признаки дистальной окклюзии ВСА у больных с БММ [1] при ультразвуковом исследовании могут быть выявлены в случаях отсутствия ЗСоА.

На интракраниальном уровне при хорошо выраженной патологической сосудистой сети на основании головного мозга ее можно было визуализировать, при слабо выраженной сети — сигнал от проксимального отрезка СМА отсутствовал. При этом лоцировался М2-сегмент СМА с относительно «нормальным» кровотоком, что могло привести к ошибочному суждению. Скоростные характеристики потоков в ветвях СМА и дистальных отрезках их стволов значительно варьировали, однако во всех случаях было отмечено снижение уровня периферического сосудистого сопротивления, что свидетельствовало о их коллатеральном заполнении.

Двусторонние окклюзии ВСА сочетались с небольшими по размеру исходами инфарктов головного мозга и очагами глиоза, расположенными у всех пациентов в зонах смежного кровоснабжения СМА/ПМА. Подобное несоответствие окклюзий крупных артериальных стволов и размеров инфарктов свидетельствовало в пользу длительно существующего процесса, в результате которого эти окклюзии сформировались, а также с развитием достаточной коллатеральной компенсации. Инфаркты при БММ, скорее всего, должны быть отнесены к гемодинамическим, связанным со снижением кровотока, в частности, на фоне падения артериального давления. Другим вариантом развития инфаркта мозга, вероятно, могла служить редукция коллатерального русла, также приводящая к декомпенсации кровообращения. Перфузионный дефицит (CBF) с пролонгированным временем контрастирования (T_{max}) диагностировали по данным КТ-перфузии в зонах смежного кровообращения СМА и ПМА — глубоком и субкортикальном белом веществе преимущественно лобных долей. В свою очередь, в ВББ у всех обследованных, кроме пациента с ЭИКМА, отмечен повышенный уровень перфузии. У пациентки В сосудистая сеть ВББ была развита особенно сильно.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что БММ может быть диагностирована в соответствии с известными диагностическими критериями разными визуализирующими методами — МРТ, МСКТ и ультразвуковым ДС БЦА. Ошибки в диагностике БММ, вероятно, могут быть связаны либо с недоступностью ангиографических методик при нейровизуализации, либо с неинформированностью диагностов о такой причине ИИ у взрослых, как БММ.

Литература


- Осборн А. Г., Зальцман К. Л., Завери М. Д. Лучевая диагностика. Головной мозг. М.: Издательство Панфилова, 2018; 1216 с.
- Коршунов А. Е., Пронин И. Н., Головтеев А. Л. Болезнь моямая — излечимая причина повторных ишемических инсультов у детей. Русский журнал детской неврологии. 2010; V (1): 27–34.
- Шульгина А. А., Лукшин В. А., Коршунов А. Е., Усачев Д. Ю., Пронин И. Н. Сочетание комбинированной двустольной прямой и непрямой реваскуляризации головного мозга с двух сторон в лечении болезни моямая. Вопросы нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко, 2020; 84 (2): 93–102.
- Takeuchi K, Shimizu K. Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries. Brain Nerve. 1957; 9: 37–43.
- Nishimoto A, Takeuchi S. Abnormal cerebrovascular network related to the internal carotid arteries. J Neurosurg. 1967; 29: 255–60.
- Guidelines for Diagnosis and Treatment of Moyamoya Disease

- (Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis). Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous occlusion of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis; Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Intractable Diseases. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012; 52: 245–66.
7. Wanebo JE, Khan N, Zabramski JM Spetzler RF, ed. Moyamoya disease: diagnosis and treatment. New York Stuttgart: Thieme, 2013; 224 p.
 8. Yamashita M, Oka K, Tanaka K. Histopathology of the brain vascular network in moyamoya disease. *Stroke*. 1983; 14: 50–58.
 9. Newell DW, Abdu E. Moyamoya Disease: Current Concepts. *Cureus*. 2012; 4 (6): e47. DOI: 10.7759/cureus.47.
 10. Ge P, Zhang Q, Ye X, Liu X, Deng X, Wang J, et al. Different subtypes of collateral vessels in hemorrhagic moyamoya disease with p.R4810K variant. *BMC Neurology*. 2020; 20: 308. DOI: 10.1186/s12883-020-01884-0.
 11. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular “moyamoya” disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*. 1969; 20: 288–99.
 12. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*. 2011; 56 (1): 34–40. DOI: 10.1038/jhg.2010.132.
 13. Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Youssefian S. A new horizon of moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. *Environ Health Prev Med*. 2016; 21: 55–70. DOI: 10.1007/s12199-015-0498-7.
 14. Park YS, An HJ, Kim JO, Kim WS, Han IB, Kim OJ, et al. The Role of RNF213 4810G>A and 4950G>A Variants in Patients with Moyamoya Disease in Korea. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (11): 2477. DOI: 10.3390/ijms18112477.
 15. Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of moyamoya disease: international standard and regional differences. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015; 55 (3): 189–93. DOI: 10.2176/nmc.ra.2014-0307.
 16. Kraemer M, Heinenbrock W, Berlitz P. Moyamoya disease in Europeans. *Stroke*. 2008; 39 (12): 3193–200. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.513408.
 17. Savolainen M, Mustanoja S, Pekkola J, Tyni T, Uusitalo AM, Ruotsalainen S, et al. Moyamoya angiopathy: long-term follow-up study in a Finnish population. *J Neurol*. 2019; 266 (3): 574–81. DOI: 10.1007/s00415-018-9154-7.
 18. Acker G, Fekonja L, Vajkoczy P. Surgical Management of Moyamoya Disease. *Stroke*. 2018; 49 (2): 476–82. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.018563.

References

1. Osborn AG, Zalcmann KL, Zaveri MD. Luchevaja diagnostika. Golovnoj mozg. M.: Izdatel'stvo Panfilova, 2018; 1216 s. Russian.
2. Korshunov AE, Pronin IN, Golovteev AL. Bolezn' moyamoja — izlechimaja prichina povtornyh ishemicheskikh insultov u detej. *Russkij zhurnal detskoj nevrologii*. 2010; V (1): 27–34. Russian.
3. Shulgina AA, Lukshin VA, Korshunov AE, Usachev DYU, Pronin IN. Sochetanie kombinirovannoj dvustvol'noj prjamoj i neprjamoj revaskularizacii golovnogogo mozga s dvuh storon v lechenii bolezn' moyamoja. *Voprosy nejrohirurgii imeni N. N. Burdenko*, 2020; 84 (2): 93–102. Russian.
4. Takeuchi K, Shimizu K. Hypoplasia of the bilateral internal carotid arteries. *Brain Nerve*. 1957; 9: 37–43.
5. Nishimoto A, Takeuchi S. Abnormal cerebrovascular network related to the internal carotid arteries. *J Neurosurg*. 1967; 29: 255–60.
6. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Moyamoya Disease (Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis). Research Committee on the Pathology and Treatment of Spontaneous occlusion of Spontaneous Occlusion of the Circle of Willis; Health Labour Sciences Research Grant for Research on Measures for Intractable Diseases. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012; 52: 245–66.
7. Wanebo JE, Khan N, Zabramski JM Spetzler RF, ed. Moyamoya disease: diagnosis and treatment. New York Stuttgart: Thieme, 2013; 224 p.
8. Yamashita M, Oka K, Tanaka K. Histopathology of the brain vascular network in moyamoya disease. *Stroke*. 1983; 14: 50–58.
9. Newell DW, Abdu E. Moyamoya Disease: Current Concepts. *Cureus*. 2012; 4 (6): e47. DOI: 10.7759/cureus.47.
10. Ge P, Zhang Q, Ye X, Liu X, Deng X, Wang J, et al. Different subtypes of collateral vessels in hemorrhagic moyamoya disease with p.R4810K variant. *BMC Neurology*. 2020; 20: 308. DOI: 10.1186/s12883-020-01884-0.
11. Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular “moyamoya” disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*. 1969; 20: 288–99.
12. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*. 2011; 56 (1): 34–40. DOI: 10.1038/jhg.2010.132.
13. Koizumi A, Kobayashi H, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Youssefian S. A new horizon of moyamoya disease and associated health risks explored through RNF213. *Environ Health Prev Med*. 2016; 21: 55–70. DOI: 10.1007/s12199-015-0498-7.
14. Park YS, An HJ, Kim JO, Kim WS, Han IB, Kim OJ, et al. The Role of RNF213 4810G>A and 4950G>A Variants in Patients with Moyamoya Disease in Korea. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (11): 2477. DOI: 10.3390/ijms18112477.
15. Fujimura M, Tominaga T. Diagnosis of moyamoya disease: international standard and regional differences. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2015; 55 (3): 189–93. DOI: 10.2176/nmc.ra.2014-0307.
16. Kraemer M, Heinenbrock W, Berlitz P. Moyamoya disease in Europeans. *Stroke*. 2008; 39 (12): 3193–200. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.513408.
17. Savolainen M, Mustanoja S, Pekkola J, Tyni T, Uusitalo AM, Ruotsalainen S, et al. Moyamoya angiopathy: long-term follow-up study in a Finnish population. *J Neurol*. 2019; 266 (3): 574–81. DOI: 10.1007/s00415-018-9154-7.
18. Acker G, Fekonja L, Vajkoczy P. Surgical Management of Moyamoya Disease. *Stroke*. 2018; 49 (2): 476–82. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.018563.

АКТИВАЦИЯ ПРОЦЕССОВ СЕНСОМОТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕРФЕЙСА «МОЗГ–КОМПЬЮТЕР»

А. А. Рубакова , Г. Е. Иванова, М. А. Булатова


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

Интерфейс «мозг–компьютер» (ИМК) с экзоскелетом кисти руки активирует механизмы нейропластичности, в результате чего происходит моторное научение, однако вклад перцепции в этот процесс на данный момент изучен недостаточно. Целью исследования было изучить влияние сенсомоторной интеграции на эффективность реабилитационного процесса по обучению парадигме движения раскрытия кисти у пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, с помощью ИМК и оценить влияние идеомоторного тренинга на снижение спастичности в паретичной руке. Был проведен анализ данных 58 пациентов (медиана возраста 63 года (22; 83)), с перенесенной черепно-мозговой травмой или инсультом давностью 2 месяца (1,0; 12,0), ишемического (76%) и геморрагического характера (24%), получивших 15 (12; 21) идеомоторных тренировок с использованием ИМК и экзоскелета. Функциональную активность руки оценивали до и после прохождения курса процедур по шкалам Fugl-Meyer, ARAT, Frenchay, FIM, Rivermead, Ashworth. Отмечено увеличение мышечной силы в лучезапястном суставе у 40% пациентов при сгибании-разгибании, у 29% — при отведении-приведении. Увеличение мышечной силы при отведении и приведении лучезапястного сустава происходит одновременно ($p < 0,004$). Назначение идеомоторных тренировок для снижения мышечного тонуса неэффективно, так как достоверно значимого снижения спастичности в кисти выявлено не было. Улучшение в воспроизведении движений кистью паретичной руки положительно коррелировало с улучшением повседневных навыков жизненных активностей. Развитие моторной функции паретичной кисти с помощью экзоскелета ведет к активации кинестетических рецепторов, улучшая чувствительность и мелкую моторику за счет сенсомоторной интеграции.

Ключевые слова: инсульт, идеомоторный тренинг, экзоскелет, интерфейс «мозг–компьютер», нейрореабилитация, сенсомоторная интеграция

Вклад авторов: А. А. Рубакова — сбор, анализ, интерпретация данных, анализ литературы; Г. Е. Иванова — планирование исследования, редактирование рукописи; М. А. Булатова — сбор и анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФЦМН ФМБА России (протокол № 33 от 21 июня 2021 г.). Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Александра Алексеевна Рубакова
ул. Островитянова, д. 1, стр. 10, г. Москва, 117997, Россия; sandrabiolog@inbox.ru

Статья получена: 26.07.2021 **Статья принята к печати:** 15.08.2021 **Опубликована онлайн:** 01.09.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.039

ACTIVATION OF SENSORIMOTOR INTEGRATION PROCESSES WITH A BRAIN-COMPUTER INTERFACE

Rubakova AA , Ivanova GE, Bulatova MA

Federal Center for Brain Research and Neurotechnologies of FMBA, Moscow, Russia

A BCI-controlled hand exoskeleton activates neuroplasticity mechanisms, promoting motor learning. The contribution of perception to this phenomenon is understudied. The aim of this study was to assess the impact of sensorimotor integration on the effectiveness of neurorehabilitation based on the learning of a hand opening movement by stroke patients using BCI and to investigate the effect of ideomotor training on spasticity in the paretic hand. The study was conducted in 58 patients (median age: 63 (22; 83) years) with traumatic brain injury, ischemic (76%) or hemorrhagic (24%) stroke in the preceding 2 (1.0; 12.0) months. The patients received 15 (12; 21) ideomotor training sessions with a BMI-controlled hand exoskeleton. Hand function was assessed before and after rehabilitation on the Fugl-Meyer, ARAT, Frenchay, FIM, Rivermead, and Ashworth scales. An increase in muscle strength was observed in 40% of patients during flexion and extension of the radiocarpal joint and in 29% of patients during the abduction and adduction of the joint. Muscle strength simultaneously increased during the abduction and adduction of the radiocarpal joint ($p < 0.004$). Ideomotor training is ineffective for reducing spasticity because no statistically significant reduction in muscle tone was detected. Improved motor performance of the paretic hand was positively correlated with improvements in daily activities. Motor training of the paretic hand with a robotic orthosis activates kinesthetic receptors, restores sensation and improves fine motor skills through better sensorimotor integration.

Keywords: stroke, ideomotor training, exoskeleton, brain-computer interface, neurorehabilitation, sensorimotor integration

Author contribution: Rubakova AA — data acquisition, analysis, interpretation; literature analysis; Ivanova GE — study design; manuscript editing; Bulatova MA — data acquisition and analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Center for Brain Research and Neurotechnologies (Protocol № 33 dated June 21, 2021.). Informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Alexandra Rubakova
Ostrovityanova, 1, str. 10, Moscow, 117997, Russia; sandrabiolog@inbox.ru

Received: 26.07.2021 **Accepted:** 15.08.2021 **Published online:** 01.09.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.039

Интеграция сенсорной и моторной информации лежит в основе успешной целенаправленной деятельности и воспроизведения движений, необходимых для взаимодействия с окружающей средой. Нарушение сенсомоторной интеграции превалирует при многих неврологических расстройствах, включая инсульт, развивающийся вследствие широкого ряда причин, в том числе после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [1].

При моторном контроле обратная сенсорная связь во время выполнения движения основана на эффекте копий моторных команд, производимых в мозге. Когда прогноз движения в корковом представителе совпадает с сенсорной обратной связью, посредством сенсомоторного сравнения у человека создается устойчивый паттерн движения и связанных с ним ощущений [2]. Чувствительность человека к взаимосвязи между

совершенным действием и мгновенными последствиями этого действия, представляемыми в виде перцептивной информации, называют сенсомоторной интеграцией.

Инсульт — одно из наиболее частых заболеваний, ведущих к нарушению сенсомоторной интеграции в результате развития нарушения чувствительности, гемипарезов, спастичности в конечностях, а также гемианопсии, атаксии и апраксии [2]. У большинства пациентов, перенесших инсульт, стойкий парез кисти снижает функциональность движений и общее качество жизни. Современные методы реабилитации основаны на принципах нейропластичности, способствующих моторному научению, которое сосредоточено на восстановлении моторной функции, утраченной из-за пареза, однако вклад перцепции в моторный контроль и обучение часто упускают из виду, и в настоящее время он недостаточно изучен [1]. В психологии развития предполагается, что сенсомоторная интеграция в коре головного мозга является важным фактором обучения [3]. Предполагается, что восстановление навыков движения после инсульта зависит от обучения парадигмам движений [4].

Механизмы нейропластичности, как полагают, основаны на феноменах долговременной потенциации и долговременной депрессии в нейронах головного мозга [5]. В контексте двигательного научения ключевую роль играет первичная моторная кора, в нейронах которой в процессе обучения, причем как в активной фазе научения, так и в периоды отдыха, происходит стимуляция экспрессии специфических генов IEG [5] и синтез нейротрофических факторов, обеспечивающих изменение структур нейрональных сетей и консолидацию полученной информации.

Генерация сенсомоторного μ -ритма, характерного для процессов воображения движения и непосредственного совершения двигательного акта, не только связана с эфферентными процессами и непосредственным движением, но и может происходить и при афферентных влияниях, например, при пассивном разгибании конечности с помощью роботизированного ортеза. Ряд исследований показывает, что тренировка генерации премоторного сенсомоторного ритма является эффективным вмешательством при реабилитации пациентов после инсульта. По результатам клинических испытаний было показано, что тренировка генерации сенсомоторного ритма с замером его амплитуды для контроля роботизированного ортеза с биологической обратной связью (на основании непосредственно движения или его представления) позволяет эффективно восстанавливать двигательную функцию конечностей. Имеются данные, что сочетанная активность сенсорной, моторной коры и коры височной области ассоциирована с проприоцептивной и тактильной афферентацией от двигающейся конечности, что позволяет судить об эффективности тренировки моторных функций пораженной конечности [6].

Двигательное научение на основе принципов нейропластичности также происходит за счет физиологической стимуляции периферических проприоцепторов в результате физических упражнений и сенсомоторной интеграции афферентных и эфферентных сигналов в коре головного мозга. В последнее десятилетие ведутся обширные разработки роботизированных ортезов и реабилитационных комплексов для восстановления пациентов с сенсомоторным дефицитом после повреждения центральной нервной системы [7]. В

инновационных роботизированных реабилитационных модулях использован принцип биологической обратной связи, позволяющий повышать эффективность моторного обучения пациента, однако способности к двигательному научению и факторам, влияющим на него после инсульта, уделено мало внимания [4].

Роботизированные методы реабилитации функции конечностей в клинической практике применяют все чаще. В частности, для верхней конечности изучают эффективность применения роботизированных ортезов, направленных на пассивную и активную тренировку мышц кисти руки, функция которых нарушается при поражении в результате острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) сенсомоторной коры и/или пирамидных трактов [8]. Только при использовании роботизированных методов реабилитации становится возможной активация механизмов нейропластичности, так как двигательное научение, которое ставится основной целью реабилитационного процесса, требует не менее 400 повторений стереотипного двигательного акта для закрепления паттерна движения в памяти. И долговременную двигательную адаптацию с одновременной коррекцией ошибок по методу биологической обратной связи адекватно обеспечивает лишь использование в реабилитационном процессе интерфейса «мозг-компьютер» [9–12].

Однако для достижения клинически значимых результатов недостаточно одного стереотипного повторения движений. Необходимо сочетание стимулирования зрительного, вестибулярного, проприоцептивного анализаторов, т. е. мультисенсорная стимуляция, а также тренировка когнитивных функций [13]. Известно, что при применении интерфейса «мозг-компьютер» помимо собственно тренировки моторных функций происходит стимуляция интрапсихических процессов [14]. Таким образом, можно предположить, что применение в реабилитационном процессе тренировок с использованием роботизированных ортезов у пациентов с гемипарезами после ОНМК является эффективным инструментом для активации процессов сенсомоторной интеграции, играющих ведущую роль.

В наши задачи входила проверка гипотезы, высказанной Bertani с соавторами, о том, что хотя работа постинсультных пациентов на экзоскелете для верхней конечности потенцирует активацию механизмов нейропластичности в пораженном полушарии, на снижение мышечного тонуса в паретичных конечностях данный метод не оказывает никакого значимого влияния [13]. Проверка данной гипотезы была необходима в связи с тем, что в клинической практике врачи-реабилитологи часто назначают пациентам идеомоторные тренировки с БОС с целью снижения спастичности, таким образом, существует необходимость проверить целесообразность таких назначений для повышения эффективности реабилитационных вмешательств.

Целью исследования было оценить с помощью ИМК влияние процессов сенсомоторной интеграции на эффективность обучения парадигме движения раскрытия кисти у пациентов, перенесших ОНМК, и изучить влияние идеомоторного тренинга на снижение спастичности в паретичной руке.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Федерального центра мозга и нейротехнологий в период с 19.12.2019 по 08.10.2020. В исследовании принимали участие 58

Таблица 1. Оценка изменения мышечной силы до и после идеомоторного тренинга «Экзокисть-2» по парному *t*-критерию Стьюдента

	Значение парного <i>t</i> -критерия Стьюдента	Значимость изменения признака	Среднее значение признака до эксперимента	Среднее значение признака после эксперимента
Сгибание лучезапястного сустава	4,752	Изменения значимы	2,556 ± 1,513	2,963 ± 1,601
Разгибание лучезапястного сустава	5,442	Изменения значимы	2,286 ± 1,581	2,786 ± 1,615
Отведение лучезапястного сустава	4,828	Изменения значимы	2,143 ± 1,689	2,5 ± 1,809
Приведение лучезапястного сустава	4,828	Изменения значимы	2,143 ± 1,689	2,5 ± 1,809
Сгибание в пястно-фаланговых суставах	4,529	Изменения значимы	2,714 ± 1,398	3,018 ± 1,433
Разгибание в пястно-фаланговых суставах	4,56	Изменения значимы	2,054 ± 1,71	2,518 ± 1,748
Оппозиция 1-го пальца	4,511	Изменения значимы	1,893 ± 1,734	2,286 ± 1,806
Оппозиция 5-го пальца	4,328	Изменения значимы	1,768 ± 1,789	2,143 ± 1,873

Примечание: данные представлены как среднее значение (М) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$).

пациентов. В исследуемой группе преобладали пациенты мужского пола (42 мужчины, 16 женщин), средний возраст в исследуемой группе составил $62,5 \pm 5$ лет (самому молодому участнику исследования было 22 года, самому пожилому — 83 года). Средняя давность инсульта в исследуемой группе составила 2 месяца, таким образом, 80% пациентов находились в раннем восстановительном периоде (от 1 до 6 месяцев после перенесенного ОНМК), 20% — в позднем восстановительном периоде. Все испытуемые, по данным Эдинбургского опросника, оценки мануальной симметрии в качестве ведущей руки использовали правую.

Реабилитацию после ишемического инсульта проходили 76% пациентов (44 человека), после геморрагического инсульта — 15,5% (9 человек), после ишемического инсульта с геморрагическим пропитыванием — 5% (3 человека) и после черепно-мозговой травмы — 3,5% пациентов (2 человека).

В исследуемой группе преобладали больные с подкорковыми поражениями. По локализации поражения сосудов головного мозга преобладали пациенты с расположением очага поражения в бассейне правой (20 человек; 35,7%) или левой (17 человек; 30,3%) средней мозговой артерии.

По данным первичного осмотра невролога у 93% испытуемых была сохранна глубокая чувствительность, поверхностная чувствительность же была сохранна у 48% пациентов (у 52% исследуемых наблюдалась поверхностная гемипестезия, контралатеральная стороне поражения головного мозга), причем у 98% пациентов поверхностная гемипестезия была тотальной, т. е. нарушения затрагивали и болевую, и температурную, и тактильную чувствительность. Глубокая чувствительность была нарушена у 11 пациентов (19%).

Критерии включения пациентов в исследование: сохранность когнитивных функций (не менее 12 баллов по Монреальской шкале оценки когнитивных функций); отсутствие афазии грубой степени, исключающей понимание пациентом инструкций к выполнению идеомоторной тренировки; отсутствие грубых нарушений зрения; спастичность в паретичной кисти не более 4 баллов по модифицированной шкале Ashworth; степень инвалидизации не более 3 баллов по шкале Рэнкина; отсутствие контрактур в мышцах руки; отсутствие выраженного болевого синдрома, препятствующего

выполнению идеомоторной тренировки; наличие информированного согласия пациента или его законного представителя на участие в исследовании.

Критерии исключения пациентов из исследования: неспособность выполнять необходимые процедуры, отказ пациента или его законного представителя от участия в исследовании; афазия в степени, исключающей понимание инструкций пациентом; грубое нарушение зрения, не позволяющее следовать визуальным инструкциям на экране компьютера; спастичность в кисти 5 баллов по модифицированной шкале Ashworth; степень инвалидизации более 3 баллов по шкале Рэнкина; наличие контрактур в мышцах кисти, выраженный болевой синдром.

По результатам осмотра нейропсихолога в исследуемой группе пациентов средний коэффициент по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA) составил 25,4 балла, причем у 75% пациентов коэффициент MoCA находился в пределах 23–26 баллов.

Реабилитационные вмешательства проводили при помощи комплекса с биологической обратной связью «Экзокисть-2». Используемый метод имеет в основе две теории подхода к роботизированной реабилитации функций верхней конечности после инсульта: 1) нейрофизиологический подход, основанный на теории о нейропластичности и компенсаторных возможностях головного мозга; 2) подход обучения пациента движению, осуществляемый при помощи ориентированной на цель активной тренировки паретичной руки, а также за счет представления движения с мультисенсорной биологической обратной связью. В реабилитационном комплексе «Экзокисть-2» используется мультимодальная (преимущественно зрительная и проприоцептивная) биологическая обратная связь на регистрируемое намерение произвести движение.

Для проведения процедур использовали стандартизированный на 2020 г. протокол и интерфейс «мозг-компьютер» с экзоскелетами обеих кистей рук «Экзокисть-2» («Андроидная техника»; Россия). Взаимодействие между пациентом и реабилитационным модулем было основано на принципах биологической обратной связи.

Пациент садился в медицинское кресло. Его руки помещали в экзоскелеты кистей, закрепленные на подлокотниках кресла. На расстоянии 1 м перед

Таблица 2. Оценка улучшения сенсомоторной активности кисти и функциональной независимости у пациентов, прошедших курс идеомоторных тренировок на комплексе «Экзокисть-2»

	Число пациентов с улучшениями, %	Значение парного <i>t</i> -критерия Стьюдента	<i>p</i> -уровень значимости
Шкала Фугл-Мейера	62%	5,719	$p = 0,0$
Шкала ARAT	38%	3,236	$p = 0,002$
Модифицированный тест для руки Frenchay	26%	3,454	$p = 0,001$
Модифицированная шкала Рэнкина	21%	3,667	$p = 0,001$
Шкала повседневных жизненных активностей Ривермид	58,60%	4,691	$p = 0,0$
Шкала функциональной независимости FIM	60,30%	5,028	$p = 0,0$
Модифицированная шкала Ashworth	14%	-2,634	$p = 0,011$

пациентом располагали монитор, на котором находилось изображение-инструкция для фиксации взгляда, а затем подавали устные инструкции по выполнению следующих заданий: кинестетически воображать раскрытие левой или правой кисти (в соответствии с направлением стрелки, изображенной на экране) либо сидеть расслабленно, отвлекшись от кинестетического воображения [13].

В процессе выполнения заданий регистрировали электроэнцефалограмму (ЭЭГ) при помощи прибора NVX52 («Медицинские компьютерные системы»; Россия), входящего в состав комплекса «Экзокисть-2», что позволяло определять, какую задачу пациент выполняет в данный момент. Для регистрации ЭЭГ использовали 32 отведения, расположенные на позициях F3, Fz, F4, Fc5, Fc3, Fc1, Fcz, Fc2, Fc4, Fc6, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, Cp5, Cp3, Cp1, Cpz, Cp2, Cp4, Cp6, P3, Pz, P4, Po3, Poz, Po4, O1, O2. Для распознавания выполняемой задачи использовали Байесовский классификатор, основанный на анализе ковариационных матриц ЭЭГ. Результат классификации предъявляли пациенту в виде зрительной и проприоцептивной обратной связи: если система распознавала верное выполнение предложенной задачи, то цвет изображения на экране монитора изменялся с белого на зеленый, одновременно с этим происходило раскрытие экзоскелета кисти [15].

Тренировки на воображение движения проводили в течение 7–9 дней по 2–3 процедуры ежедневно. Длительность каждой процедуры в соответствии с протоколом для взрослых пациентов составляла 9 мин [16]. В среднем каждый пациент получал 15 (12; 21) процедур на реабилитационном комплексе «Экзокисть-2».

Оценку эффективности идеомоторного тренинга на ИМК «Экзоскелет-2» проводили при помощи шкал для оценки функционально значимых в повседневной жизни движений. Кроме того, сравнивали результаты первичного и выписного осмотров врача-невролога. Среди применяемых инструментов оценки были модифицированная шкала Ashworth, шкала Фугл-Мейера, шкала ARAT, шкала Frenchay, шкала Рэнкина, а также шкалы активностей повседневной жизни Ривермид и FIM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам анализа клинических данных выявлена прямая корреляция между возрастом пациентов и нарушениями проприоцептивной чувствительности, что было продемонстрировано ранее [17]. При факторном анализе была выявлена статистически значимая корреляция с умеренной теснотой связи по шкале Чеддока между нарушениями глубокой чувствительности

и улучшениями функций кисти по шкалам Фугл-Мейера ($p = 0,32$; $p < 0,02$) и ARAT ($p = 0,454$; $p = 0,0006$).

Идеомоторные тренировки ведут к увеличению мышечной силы в кисти при движениях в лучезапястном и пястно-фаланговых суставах. При сравнении оценки мышечной силы по пятибалльной шкале до прохождения реабилитационных процедур с применением экзоскелета и после прохождения 15 процедур у 23 пациентов (40%) отмечены улучшения при сгибании и разгибании лучезапястного сустава, у 17 пациентов (29%) — улучшения в отведении и приведении лучезапястного сустава. Кроме того, было выявлено, что увеличение мышечной силы при отведении и при приведении лучезапястного сустава происходит одновременно, это может быть связано с нормализацией сенсомоторной интеграции за счет нейропластичности и активации рецепторов мышц кисти. Статистический анализ увеличения мышечной силы до и после идеомоторного тренинга представлен в табл. 1.

При оценке функционального статуса исследуемых пациентов на момент выписки из стационара после прохождения реабилитационных процедур на комплексе «Экзокисть-2» по шкале Фугл-Мейера улучшение функции кисти отмечено у 63% пациентов, однако клинически значимые улучшения (на 5 и более баллов) были выявлены лишь у 26% исследуемых.

Улучшения функциональной активности кисти по данным теста для руки Frenchay произошли у 26% пациентов (15 человек).

Улучшение в произведении функционально значимых движений кистью по шкале ARAT в группе исследуемых было статистически значимым и наступило у 38% пациентов, однако значения показателей улучшения были распределены неравномерно: у 13 пациентов были отмечены улучшения в диапазоне 2–7 баллов, у 9 пациентов — в диапазоне 17–55 баллов. Следует заметить, что улучшения произошли преимущественно у тех пациентов, которые при госпитализации имели более 0 баллов по вышеназванной шкале.

Улучшение в воспроизведении движений кистью паретичной руки привело к статистически значимым результатам при исследовании повседневных навыков жизненных активностей по шкалам FIM и Ривермид. Вероятно, это может быть связано с тем, что развитие моторной функции паретичной кисти с помощью экзоскелета ведет к активации кинестетических рецепторов, улучшая мелкую моторику и чувствительность верхней конечности за счет сенсомоторной интеграции. Результаты оценки сенсомоторной активности кисти и функциональной независимости пациентов представлены в табл. 2.

Проверка гипотезы Bertani и соавторов [13] показала, что степень снижения спастичности в паретичной руке при оценке по модифицированной шкале Ashworth была статистически незначимой ($p = 0,001$) и снижение мышечного тонуса наблюдалось лишь у 8 пациентов (14%) из исследуемой группы. Таким образом, механизмы нейропластичности не оказывают значимого влияния на снижение спастичности в паретичной руке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдение группы пациентов с гемипарезами и неврологическим дефицитом после перенесенного ОНМК, проходивших реабилитацию на роботизированном комплексе «Экзокисть-2», показало статистически значимое улучшение как моторной активности и чувствительности кисти, так и функциональной повседневной активности пациентов. Большинство пациентов после прохождения 15 процедур сообщали об улучшении функций верхней конечности.

Вероятнее всего, у пациентов пожилого возраста не только в связи с перенесенным инсультом, но и по причине возрастной инволюции серого вещества головного мозга была нарушена интеграция между первичной моторной корой и дополнительной моторной корой (шестое поле Бродмана). В результате у пациентов с премоторной апраксией процедуры с использованием ИМК «Экзокисть-2» показали низкую эффективность при оценке по всем использованным шкалам, так как основной задачей идеомоторного тренинга является именно воображение движения, за что отвечает шестое цитоархитектоническое поле Бродмана [17, 18].

Кроме того, на основании литературных данных можно полагать, что у тех пациентов, чьи функции кисти по результатам прохождения идеомоторной тренировки значительно улучшились, на основании механизмов нейропластичности происходит восстановление интеграции между задней парietальной корой, отвечающей за намерение совершить движение, дополнительной моторной корой и первичной моторной корой, отвечающей за непосредственное совершение движения [19]. Таким образом, можно увидеть, как по мере улучшений моторных функций происходит также нормализация сенсомоторной интеграции между зрительной корой, воспринимающей стимулы с инструкциями, предъявляемыми пациенту, теменной долей, играющей ключевую роль в восприятии схемы тела и кинестетической чувствительности, а также парietальной, дорсальной премоторной и моторной корой. В связи с этим все вышеобозначенные области коры головного мозга, а не только пре- и постцентральная извилина, можно назвать в совокупности «сенсомоторной корой», хотя они и разделены пространственно. Именно

сенсомоторная кора генерирует μ -ритм частотой 8–12 Гц, который и является мишенью для регистрации ЭЭГ при работе пациента на комплексе «Экзокисть-2» с целью дальнейшей классификации результата по выполняемой пациентом задаче. Спонтанная десинхронизация (снижение μ -ритма) происходит до и во время непосредственного движения, а спонтанная синхронизация (усиление) — после движения. Механизм генерации этого импульса до сих пор недостаточно изучен, однако имеются данные, что он продуцируется в результате совместной работы премоторной, моторной коры, а также подкорковых и спинальных центров [7, 20].

По результатам анализа полученных данных можно судить о том, что реабилитационные процедуры с применением ИМК приводят к снижению степени инвалидизации больных, оцениваемой по шкале Рэнкин.

Процессы сенсомоторной интеграции, на активацию которых в конечном счете и направлен идеомоторный тренинг, значительно улучшались после курса процедур. Об этом можно судить по полученным клиническим данным, так как функциональная независимость и повседневная активность пациентов напрямую зависят не только от их двигательной активности, но и от точности и скорости поступающей по афферентным волокнам информации от периферических рецепторов. Тренировки на комплексе «Экзокисть-2» не только позволяют развивать моторные функции кисти руки, но и активируют различные системы восприятия: зрительную, кинестетическую, слуховую, — в связи с этим, можно говорить о том, что регулярные мультимодальные тренировки с БОС не только активируют механизмы нейропластичности, но и приводят к консолидации сенсорной информации, полученной при выполнении процедур. Таким образом, происходит взаимодействие слухового, зрительного, кинестетического анализаторов, системы восприятия схемы тела, моторных функций, а также интрапсихических процессов, таких как мотивация и память, что прямо указывает на стимуляцию процессов сенсомоторной интеграции.

ВЫВОДЫ

Снижение неврологического дефицита, выявляемое при анализе клинических данных, а также данные, указывающие на активацию процессов сенсомоторной интеграции после курса идеомоторных тренировок, позволяют судить о том, что реабилитационные процедуры с применением комплекса «Экзокисть-2» эффективны при восстановлении постинсультных больных. В связи с этим можно рекомендовать неинвазивный ИМК с роботизированным ортезом для включения в активную клиническую практику в составе комплексной программы нейрореабилитации после ОНМК.

Литература

1. Edwards LL, King EM, Buetefisch CM, Borich MR. Putting the "Sensory" Into Sensorimotor Control: The Role of Sensorimotor Integration in Goal-Directed Hand Movements After Stroke. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2019; 13: 16. DOI: 10.3389/fnint.2019.00016.
2. Espenhahn S, Rossiter HE, van Wijk BCM, Redman N, Rondina JM, Diedrichsen J, et al. Sensorimotor cortex beta oscillations reflect motor skill learning ability after stroke. *Brain Communications*. 2020; 2 (2): fcaa161. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa161.
3. Mahoney JR, Verghese J. Does Cognitive Impairment Influence Visual-Somatosensory Integration and Mobility in Older Adults? *The Journals of Gerontology, Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2020; 75 (3): 581–8. DOI: 10.1093/gerona/glz117.
4. Jacquey L, Baldassarre G, Santucci VG, O'Regan JK. Sensorimotor Contingencies as a Key Drive of Development: From Babies to Robots. *Frontiers in neurorobotics*. 2019; 13: 98. DOI: 10.3389/fnbot.2019.00098.
5. Luft AR, Buitrago MM, Ringer T, Dichgans J, Schulz JB. Motor

- skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004; 24 (29): 6515–20. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1034-04.2004.
6. Hosp JA, Mann S, Wegenast-Braun BM, Calhoun ME, Luft AR. Region and task-specific activation of arc in primary motor cortex of rats following motor skill learning. *Neuroscience*. 2013; 250: 557–64. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.060.
 7. Norman SL, McFarland DJ, Miner A, Cramer SC, Wolbrecht ET, Wolpaw JR, Reinkensmeyer DJ. Controlling pre-movement sensorimotor rhythm can improve finger extension after stroke. *Journal of neural engineering*. 2018; 15 (5): 056026. DOI: 10.1088/1741-2552/aad724.
 8. Friedrich J, Verrel J, Kleimaker M, Münchau A, Beste C, Bäumer T. Neurophysiological correlates of perception-action binding in the somatosensory system. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 14794. DOI: 10.1038/s41598-020-71779-0.
 9. Котов С. В., Турбина Л. Г., Бобров П. Д., Фролов А. А., Павлова О. Г., Курганская М. Е., Бирюкова Е. В. Применение комплекса «интерфейс «мозг-компьютер» и экзоскелет» и техники воображения движения для реабилитации после инсульта. *Альманах клинической медицины*. 2015; (39): 15–21. DOI: 10.18786/2072-0505-2015-39-15-21.
 10. Королева Е. С., Алифорова В. М., Латыпова А. В., Чебан С. В., Отт В. А., Бразовский К. С., и др. Принципы и опыт применения роботизированных реабилитационных технологий у пациентов после инсульта. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 223–33. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-223-233.
 11. Di Pino G, Pellegrino G, Assenza G, Capone F, Ferreri F, Formica D, et al. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. *Nat Rev Neurol*. 2014; 10 (10): 597–608. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.162.
 12. Nahmani M, Turrigiano GG. Adult cortical plasticity following injury: recapitulation of critical period mechanisms? *Neuroscience*. 2014; 283: 4–16. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.029.
 13. Bertani R, Melegari C, De Cola MC, Bramanti A, Bramanti P, Calabrò RS. Effects of robot-assisted upper limb rehabilitation in stroke patients: a systematic review with meta-analysis. *Neurol Sci*. 2017; 38 (9): 1561–9. DOI: 0.1007/s10072-017-2995-5.
 14. Chivukula S, Jafari M, Aflalo T, Yong NA, Pouratian N. Cognition in Sensorimotor Control: Interfacing With the Posterior Parietal Cortex. *Front Neurosci*. 2019; 13: 140. DOI: 10.3389/fnins.2019.00140.
 15. Frolov A, Husek D, Bobrov PD, Korshakov A, Chernikova L, Konovalov R, Mokienko O. Sources of EEG activity most relevant to performance of brain-computer interface based on motor imagery. *Neural Network World*. 2012; 22 (1): 21–37. DOI: 10.14311/Nnw.2012.22.002.
 16. Frolov AA, Mokienko O, Lyukmanov R, Biryukova E, Kotov S, Turbina L, et al. Post-stroke Rehabilitation Training with a Motor-Imagery-Based Brain-Computer Interface (BCI)-Controlled Hand Exoskeleton: A Randomized Controlled Multicenter Trial. *Front Neurosci*. 2017; 11: 400. DOI: 10.3389/fnins.2017.00400.
 17. Yoshimura N, Tsuda H, Aquino D, Takagi A, Ogata Y, Koike Y, et al. Age-Related Decline of Sensorimotor Integration Influences Resting-State Functional Brain Connectivity. *Brain sciences*. 2020; 10 (12): 966.
 18. Tanji J, Shima K. Role for supplementary motor area cells in planning several movements ahead. *Nature*. 1994; 371 (6496): 413–6. DOI: 0.1038/371413a0.
 19. Mazurek KA, Richardson D, Abraham N, Foxe JJ, Freedman EG. Utilizing High-Density Electroencephalography and Motion Capture Technology to Characterize Sensorimotor Integration While Performing Complex Actions. *IEEE transactions on neural systems and rehabilitation engineering: a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 2020; 28 (1): 287–96. DOI: 10.1109/TNSRE.2019.2941574.
 20. Gassert R, Dietz V. Rehabilitation robots for the treatment of sensorimotor deficits: a neurophysiological perspective. *Neuroeng Rehabil*. 2018; 15 (1): 46. DOI: 10.1186/s12984-018-0383-x.

References

1. Edwards LL, King EM, Buettelisch CM, Borich MR. Putting the "Sensory" Into Sensorimotor Control: The Role of Sensorimotor Integration in Goal-Directed Hand Movements After Stroke. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2019; 13: 16. DOI: 10.3389/fnint.2019.00016.
2. Espenhahn S, Rossiter HE, van Wijk BCM, Redman N, Rondina JM, Diedrichsen J, et al. Sensorimotor cortex beta oscillations reflect motor skill learning ability after stroke. *Brain Communications*. 2020; 2 (2): fcaa161. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa161.
3. Mahoney JR, Verghese J. Does Cognitive Impairment Influence Visual-Somatosensory Integration and Mobility in Older Adults? *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2020; 75 (3): 581–8. DOI: 10.1093/gerona/glz117.
4. Jacquy L, Baldassarre G, Santucci VG, O'Regan JK. Sensorimotor Contingencies as a Key Drive of Development: From Babies to Robots. *Frontiers in neurobotics*. 2019; 13: 98. DOI: 10.3389/fnbot.2019.00098.
5. Luft AR, Buitrago MM, Ringer T, Dichgans J, Schulz JB. Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004; 24 (29): 6515–20. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1034-04.2004.
6. Hosp JA, Mann S, Wegenast-Braun BM, Calhoun ME, Luft AR. Region and task-specific activation of arc in primary motor cortex of rats following motor skill learning. *Neuroscience*. 2013; 250: 557–64. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.060.
7. Norman SL, McFarland DJ, Miner A, Cramer SC, Wolbrecht ET, Wolpaw JR, Reinkensmeyer DJ. Controlling pre-movement sensorimotor rhythm can improve finger extension after stroke. *Journal of neural engineering*. 2018; 15 (5): 056026. DOI: 10.1088/1741-2552/aad724.
8. Friedrich J, Verrel J, Kleimaker M, Münchau A, Beste C, Bäumer T. Neurophysiological correlates of perception-action binding in the somatosensory system. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 14794. DOI: 10.1038/s41598-020-71779-0.
9. Котов СВ, Турбина ЛГ, Бобров ПД, Фролов АА, Павлова ОГ, Курганская МЕ, и др. Применение комплекса «интерфейс «мозг-компьютер» и экзоскелет» и техники воображения движения для реабилитации после инсульта. *Альманах клинической медицины*. 2015; (39): 15–21. DOI: 10.18786/2072-0505-2015-39-15-21. Russian.
10. Королева ЕС, Алифорова ВМ, Латыпова АВ, Чебан СВ, Отт ВА, Бразовский КС, и др. Принципы и опыт применения роботизированных реабилитационных технологий у пациентов после инсульта. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 223–33. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-223-233. Russian.
11. Di Pino G, Pellegrino G, Assenza G, Capone F, Ferreri F, Formica D, et al. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. *Nat Rev Neurol*. 2014; 10 (10): 597–608. DOI: 10.1038/nrneurol.2014.162.
12. Nahmani M, Turrigiano GG. Adult cortical plasticity following injury: recapitulation of critical period mechanisms? *Neuroscience*. 2014; 283: 4–16. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.029.
13. Bertani R, Melegari C, De Cola MC, Bramanti A, Bramanti P, Calabrò RS. Effects of robot-assisted upper limb rehabilitation in stroke patients: a systematic review with meta-analysis. *Neurol Sci*. 2017; 38 (9): 1561–9. DOI: 0.1007/s10072-017-2995-5.
14. Chivukula S, Jafari M, Aflalo T, Yong NA, Pouratian N. Cognition in Sensorimotor Control: Interfacing With the Posterior Parietal Cortex. *Front Neurosci*. 2019; 13: 140. DOI: 10.3389/fnins.2019.00140.
15. Frolov A, Husek D, Bobrov PD, Korshakov A, Chernikova L, Konovalov R, Mokienko O. Sources of EEG activity most relevant to performance of brain-computer interface based on motor imagery. *Neural Network World*. 2012; 22 (1): 21–37. DOI: 10.14311/Nnw.2012.22.002.

16. Frolov AA, Mokienko O, Lyukmanov R, Biryukova E, Kotov S, Turbina L, et al. Post-stroke Rehabilitation Training with a Motor-Imagery-Based Brain-Computer Interface (BCI)-Controlled Hand Exoskeleton: A Randomized Controlled Multicenter Trial. *Front Neurosci.* 2017; 11: 400. DOI: 10.3389/fnins.2017.00400.
17. Yoshimura N, Tsuda H, Aquino D, Takagi A, Ogata Y, Koike Y, et al. Age-Related Decline of Sensorimotor Integration Influences Resting-State Functional Brain Connectivity. *Brain sciences.* 2020; 10 (12): 966.
18. Tanji J, Shima K. Role for supplementary motor area cells in planning several movements ahead. *Nature.* 1994; 371 (6496): 413–6. DOI: 0.1038/371413a0.
19. Mazurek KA, Richardson D, Abraham N, Foxe JJ, Freedman EG. Utilizing High-Density Electroencephalography and Motion Capture Technology to Characterize Sensorimotor Integration While Performing Complex Actions. *IEEE transactions on neural systems and rehabilitation engineering: a publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.* 2020; 28 (1): 287–96. DOI: 10.1109/TNSRE.2019.2941574.
20. Gassert R, Dietz V. Rehabilitation robots for the treatment of sensorimotor deficits: a neurophysiological perspective. *Neuroeng Rehabil.* 2018; 15 (1): 46. DOI: 10.1186/s12984-018-0383-x.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ВЛИЯНИЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОРТОТОПИЧЕСКУЮ PDX-МОДЕЛЬ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПИЩЕВОДА ЧЕЛОВЕКА

А. А. Киблицкая , А. С. Гончарова, А. Е. Анисимов, А. В. Снежко, С. Н. Димитриади, А. А. Маслов, Ю. А. Геворкян, Е. Н. Колесников


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

Аденокарцинома пищевода развивается, как правило, в нижней части органа. Продолжительность жизни и выживаемость при данном заболевании зависят от стадии патологического процесса и состояния здоровья пациента. Наиболее успешный метод для лечения аденокарциномы пищевода — химиолучевая терапия. Проблема подбора оптимальных доз облучения для получения максимального эффекта по сей день актуальна. Целью исследования было изучить эффективные дозы и оценить противоопухолевую активность лучевой терапии на ортотопическом PDX аденокарциномы пищевода человека. Исследование провели на самках мышей линии Balb/c nude ($n = 25$). Ортотопическую трансплантацию осуществляли путем имплантации образцов опухоли пациента в шейный отдел пищевода иммунодефицитной мыши. Лучевое воздействие на ортотопические ксенографты исследовали в 3 этапа с кратностью облучения 1 раз в дозах 4, 6, 8 и 10 Гр. По результатам гистологического анализа ксенографты 1-й генерации воспроизводили основные морфологические характеристики опухоли пациента. Оценка динамики роста объемов опухолевых узлов экспериментальных животных позволяет сделать вывод, что у животных, облученных в однократной дозе 6, 8 или 10 Гр, средние значения объемов опухолевых узлов статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от значений в контрольной группе после каждой из трех процедур лучевого воздействия. По расчетам показателя торможения роста опухоли при суммарной дозе 18 Гр наблюдали значительное подавление роста опухоли. Дальнейшее повышение дозы лучевого воздействия было неэффективно. Установили, что снижение объемов опухолевых узлов в ксенографтах коррелирует с увеличением разовой дозы, при этом суммарная доза более 18 Гр пагубно влияет на систему кроветворения и биохимические показатели крови мышей.

Ключевые слова: аденокарцинома пищевода, ортотопический ксенографт, лучевая терапия, PDX-модель, иммунодефицитная мышь

Вклад авторов: А. А. Киблицкая — обработка материала, написание текста, техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций; А. С. Гончарова, А. А. Маслов — концепция и дизайн исследования, подготовка статьи; А. Е. Анисимов — концепция и дизайн исследования, подготовка статьи, сбор, анализ и интерпретация данных, написание текста; А. В. Снежко — научное редактирование, подготовка статьи; С. Н. Димитриади — анализ и интерпретация данных, техническое редактирование; Ю. А. Геворкян — научное редактирование; Е. Н. Колесников — научное редактирование, техническое редактирование

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением требований Хельсинкской декларации; условия содержания животных соответствовали стандартам работы с животными; все хирургические манипуляции в эксперименте были выполнены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием лабораторных животных». От пациентов было получено письменное информированное согласие на передачу биологического материала.

 **Для корреспонденции:** Александра Андреевна Киблицкая
ул. 14-я линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия; kibaleand@gmail.com

Статья получена: 16.09.2021 **Статья принята к печати:** 04.10.2021 **Опубликована онлайн:** 20.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.047

ANTITUMOR EFFECT OF RADIATION THERAPY ON ORTHOTOPIC PDX MODELS OF HUMAN ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA

Kiblitckaya AA , Goncharova AS, Anisimov AE, Snezhko AV, Dimitriadi SN, Maslov AA, Gevorkyan YA, Kolesnikov EN


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

As a rule, esophageal adenocarcinoma develops in the lower esophagus. Life expectancy and survival rates depend on the cancer stage and the general health of the patient. Chemoradiotherapy is the most successful treatment approach to this type of cancer. The choice of optimal radiation doses for achieving the best possible therapeutic effect is still a challenge. The aim of this paper was to study effective radiation doses and assess response of human esophageal adenocarcinoma to radiation using a PDX model. The study was conducted in female Balb/c nude mice ($n = 25$). Fragments of the donor tumor were implanted into the cervical esophagus of immunodeficient mice. Effects of radiation on the obtained orthotopic xenografts were studied after each of 3 irradiation sessions (4, 6, 8, and 10 Gy in each of the experimental groups, respectively). First-passage xenografts reproduced the morphology of the donor tumor. The mean tumor volume differed significantly between the control group and the experimental groups exposed to 6, 8 or 10 Gy ($p \leq 0.01$) after each irradiation session. Tumor growth delay was significant after exposure to the total dose of 18 Gy. The further radiation dose increase was ineffective. The reduction of tumor volume in the xenografts was correlated to the increase in the one-time radiation dose. The total dose over 18 Gy produced a detrimental effect on the hematopoietic system and blood biochemistry of the experimental mice.

Keywords: esophageal adenocarcinoma, orthotopic xenograft, radiotherapy, PDX-model, immunodeficient mouse

Author contribution: Kiblitckaya AA — data processing, manuscript preparation, technical editing, reference list, figures; Goncharova AS, Maslov AA — study concept and design, manuscript preparation; Anisimov AE — study concept and design, manuscript preparation, data acquisition, analysis and interpretation; Snezhko AV — content editing, manuscript preparation; Dimitriadi SN — data analysis and interpretation, technical editing; Gevorkyan YA — content editing; Kolesnikov EN — content and technical editing.

Ethical standards: the study fully complied with the principles of the Declaration of Helsinki; all requirements for animal housing were met; surgical interventions were conducted following the guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals. The donors provided informed consent for their biological samples to be used in the study.

 **Correspondence should be addressed:** Alexandra A. Kiblitckaya
14 Liniya, 63, Rostov-on-Don, 344037, Russia; kibaleand@gmail.com

Received: 16.09.2021 **Accepted:** 04.10.2021 **Published online:** 20.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.047

Рак пищевода (РП) считается одним из наиболее агрессивных злокачественных новообразований и занимает ведущие позиции по заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Пятилетняя выживаемость пациентов после момента постановки диагноза РП составляет примерно 10–15%, что объясняется высокой степенью метастазирования данной нозологии в лимфатические узлы [2]. К факторам риска развития РП относятся: употребление очень горячей или холодной пищи и напитков, курение, злоупотребление алкоголем, вдыхание токсических газов, употребление питьевой воды с содержанием тяжелых металлов, проглатывание едких веществ [3].

РП представлен в основном двумя гистологическими подтипами: плоскоклеточный рак и аденокарцинома пищевода (АП) [4]. В России чаще всего диагностируется плоскоклеточный рак пищевода, реже — аденокарцинома. В последние годы наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости аденокарциномой, которая локализуется преимущественно в дистальной части пищевода и пищеводно-желудочном переходе [5, 6]. Основной особенностью АП в отличие от плоскоклеточной карциномы является раннее метастазирование в регионарные лимфатические узлы и субсерозное распространение с вовлечением сальниковой сумки. Печеночные метастазы наблюдаются редко [7]. Также АП распространяется в подслизистую оболочку грудного отдела пищевода с инвазией в диафрагму, плевру и перикард. Для АП часто характерен экзофитный рост, что значительно затрудняет хирургическое лечение и делает его малоэффективным [8].

На сегодняшний день наиболее удовлетворительным подходом к лечению рака шейного отдела пищевода является химиолучевая терапия. Хирургическое вмешательство при данной локализации опухоли включает в себя экстирпацию органа с формированием фарингогастроанастомоза, что часто приводит к послеоперационным осложнениям и ухудшению состояния больного. Пятилетняя выживаемость пациентов после курса химиолучевого лечения составляет 27% [9]. В схемы терапии рака пищевода может входить как дистанционная лучевая терапия, так и облучение контактным методом (брахитерапия). Лучевую терапию могут назначать до и после операции или комбинировать с химиотерапией. При этом приборная база, а также сама методология проведения лучевой терапии претерпели значительные усовершенствования. Несмотря на это проблема развития радиорезистентности опухолей, включая РП различных гистотипов, остается нерешенной.

Использование высоких доз лучевого воздействия теоретически подразумевает повышение вероятности цитотоксического эффекта. На практике это приводит к интоксикации организма продуктами распада опухоли и нарушению гомеостаза организма. Поэтому вопрос о способах и оптимальных дозах облучения с целью получения максимального противоопухолевого эффекта с наименьшими побочными осложнениями остается актуальным.

Одним из факторов, препятствующих повышению эффективности лечения АП человека, является отсутствие надежных доклинических моделей для трансляционных исследований [10]. Традиционные экспериментальные модели, такие как ксенотрансплантаты клеточных линий, введенные подкожно либо в стенку пищевода иммунодефицитным мышам, не воспроизводят сложной внутриопухолевой гетерогенности биоматериала донора [11], поэтому ксенотрансплантаты, полученные от пациентов

(patient-derived xenograft, PDX), являются перспективными модельными организмами для исследования новых терапевтических стратегий лечения рака [12].

При создании PDX-модели фрагмент опухоли донора имплантируют в организм иммунодефицитной мыши [13]. В трансляционных исследованиях рака используют специальных бестимусных мышей линии Balb/c nude, характерной особенностью которых является мутация в гене Foxp1 [14, 15]. Ослабление иммунитета по причине дефицита Т-лимфоцитов значительно облегчает приживление и метастазирование опухолевых клеток в ксенотрансплантатах после имплантации [16]. Модели PDX сохраняют морфологические характеристики и гетерогенность первичной опухоли донора и вследствие этого чувствительность к лечению может быть спрогнозирована лучше, чем с помощью ксенотрансплантатов клеточных линий [17]. Несмотря на то что строма человека в ксенографте заменяется стромой мыши, PDX хорошо сохраняют внутриопухолевую гетерогенность, в том числе при многократном пассировании [18].

Применение гетеротопических (подкожных) PDX очень распространено в трансляционных исследованиях рака, что объясняется технической простотой исполнения. Тем не менее подкожные ксенотрансплантаты не воспроизводят исходное микроокружение опухоли донора, опухолевые узлы в организме мыши-реципиента инкапсулируются, вследствие чего имеют локальный экспансивный рост и не метастазируют [19].

Ортотопическую PDX-модель АП человека создают путем непосредственной имплантации опухолевого фрагмента донора в стенку дистального отдела пищевода мыши. Ксенографт и действие облучения легко обнаружить при разрастании опухолевого узла, однако создание модели рака этого типа чрезвычайно сложно технически из-за анатомического расположения и размера пищевода мыши [20]. Другим преимуществом этого способа трансплантации является специфическое внутриорганный микроокружение опухоли, что способствует воспроизведению патоморфологических и молекулярных параметров опухоли пациента [21]. Поэтому ортотопические PDX используют в изучении поведения опухоли в отношении различных терапевтических подходов. В ходе нашего эксперимента степень противоопухолевого воздействия лучевой терапии определяли, вычисляя показатель торможения роста опухоли (ТРО) [22].

Цель исследования состояла в изучении эффективных доз и оценки противоопухолевой активности лучевой терапии на ортотопической PDX-модели АП человека, полученной путем ксенотрансплантации фрагмента опухоли донора в шейный отдел пищевода иммунодефицитных мышей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Для создания ортотопических ксенотрансплантатов использовали свежий опухолевый материал от пациента с АП. При создании шестого пассажа PDX-моделей для трансплантации использовали самок мышей линии Balb/c nude ($n = 25$, возраст 6–8 недель, масса тела 21–25 г). На подготовительных этапах исследования использовали 12 самок мышей линии Balb/c nude. Мышей содержали в SPF-виварии при температуре 22–24 °C и относительной влажности воздуха

60%, при световом режиме день–ночь, в искусственно вентилируемых клетках. В конце эксперимента проводили эвтаназию животных в CO₂-камере с последующим отбором опухолевого материала для исследований.

Исследование лучевого воздействия проводили на ортотопических PDX АП человека 6-го пассажа (рис. 1). Облучение начинали проводить при размерах ксенографтов не менее 100 мм³, на 30-е сутки после трансплантации. Животных разделили на 5 групп (контроль, 1, 2, 3 и 4 группа) с различными режимами воздействия, по 5 особей в каждой группе. В первой группе разовая доза облучения мышей составила 4 Гр (суммарная доза 12 Гр), во 2, 3 и 4 группах режимы облучения составили 6 (18), 8 (24) и 10 (30) Гр соответственно. Эксперимент выполняли в течение 7 дней, облучение проводили в 3 приема с кратностью 1 раз. Однократное облучение проводили с использованием аппарата Xstrahl 150 (Xstrahl; UK) с фильтром 1 (Al 0,2) и аппликаторами 1,5 и 2 см.

Измерение размеров опухолевых узлов проводили с помощью штангенциркуля. Расчет объемов опухолевых узлов осуществляли по формуле Шрека для эллипсоида:

$$V = a \times b \times c \times \pi/6,$$

где V — объем опухоли (мм³); a, b, c — максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

Степень торможения роста опухоли рассчитывали с применением показателя TPO по формуле:

$$TPO, \% = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \times 100.$$

Гематологический анализ крови выполняли с помощью ветеринарного анализатора Exigo (BouleMedical; USA). Анализ биохимических показателей проводили на анализаторе VETSCANVS2 (Zoetis; USA).

Статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 10. Количественные переменные приводятся в виде средних величин и стандартных отклонений от среднего $M \pm SD$. Для исследования достоверности различий средних величин для двух независимых выборок использовали критерий Манна–Уитни и критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

Ортотопическая трансплантация образцов опухоли в пищевод иммунодефицитной мыши

Перед хирургическим вмешательством проводили премедикацию животных препаратом на основе ксилазина гидрохлорида в дозе 20 мг/г внутримышечно. Затем через 15 мин мышей наркотизировали внутримышечно препаратом, содержащим в качестве действующих веществ тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид, в дозе 22,57 мг/г.

Образцы опухоли донора перед трансплантацией разделяли на фрагменты объемом примерно 27 мм³, участки некротизированной ткани заранее удаляли. Опухолевый материал трансплантировали через 30 мин после резекции. Непосредственно перед операцией кожу мыши в области рассечения обрабатывали 10% раствором повидон-йода.

Для обеспечения доступа к пищеводу выполняли рассечение кожи шеи от основания правого уха до основания левого уха. Затем тупым способом проводили выделение трахеи и лежащего под ней пищевода. С помощью скальпеля рассекали адвентициально-мышечный слой пищевода. Над выполненным разрезом к стенке пищевода подшивали фрагмент опухоли с использованием лигатуры Пролен 5-0. Далее скорняжным



Рис. 1. Ортотопическая PDX-модель аденокарциномы пищевода человека (6-й пассаж)

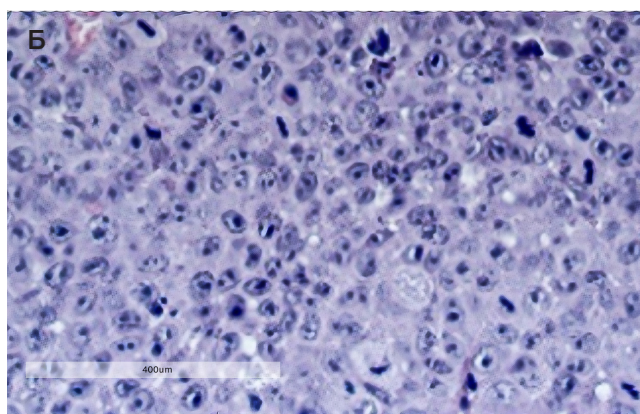
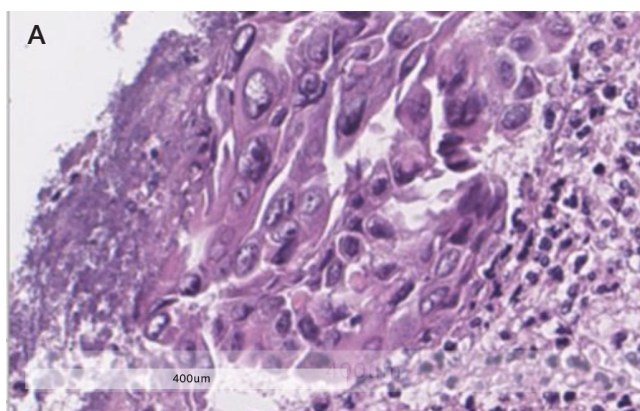


Рис. 2. Гистологические препараты умеренно дифференцированной АП человека. А. Опухоль пациента-донора. Б. Ортотопический ксенографт 1-го пассажа. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Таблица 1. Средние объемы ксенографтов аденокарциномы человека и вес мышей в контрольной и опытных группах

Группа	Показатель	0-е сутки		1-е сутки		5-е сутки		7-е сутки	
		V, мм ³	Вес, г	V, мм ³	Вес, г	V, мм ³	Вес, г	V, мм ³	Вес, г
Контроль	Среднее	86	21	626	22,7	1250,7	22,3	2136,6	22,3
	Стандартное отклонение	2,8	0,5	4,9	0,3	148,5	0,8	74,5	0,8
1 (4) Гр	Среднее	91,1*	21,7	554,8*	23	1052,0*	21,1	1145,9*	21,1
	Стандартное отклонение	2,4	0,6	9	0,4	72,9	1,2	120,7	1
2 (6) Гр	Среднее	88	20,5	235,1*	22,2	249,3*	22,7	248,1*	22,5
	Стандартное отклонение	1,6	0,5	2,7	0,8	2	0,8	1,3	1,2
3 (8) Гр	Среднее	80,9*	22,2	210,8*	23,5	228,9*	23,5	227,8*	23,5
	Стандартное отклонение	2	0,4	5,8	0,4	14	0,5	8,2	0,5
4 (10) Гр	Среднее	89,5	21,5	195,2*	22,7	200,1*	19,7	198,9*	19,8
	Стандартное отклонение	2,8	0,8	6	1,3	3,3	3	4,4	0,9

Примечание: * — статистически значимые различия между показателями животных в контрольной и экспериментальных группах 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр) по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$); * — статистически значимые различия между показателями животных в контрольной и экспериментальных группах 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр) по критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,01$).

швом при помощи лигатуры Пролон 4–0 ушивали операционную рану [23].

После того как опухолевый узел ортотопической модели достигал объема 150–250 мм³, выполняли перевивку ксенографта до 6-го пассажа описанным выше способом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зарегистрировали увеличение степени приживления опухолевого материала у иммунодефицитных мышей с каждым последующим пассажем. При 1, 2 и 3 пассаже наблюдали 55, 70 и 80% приживления соответственно. Начиная с 4-го и до 6-го пассажа у ортотопических ксенографтов приживаемость биоматериала донора достигла 100%.

Гистологическая верификация PDX-моделей АП человека

Опухоль пациента гистологически идентифицировали как умеренно дифференцированную аденокарциному. Наряду с типичными клетками аденокарциномы в препарате

обнаружили атипичные клетки веретенообразной формы с кариопикнозом и кариорексисом клеточного ядра. Гистотип ксенографтов 1-го пассажа в достаточной степени точно повторял основные характеристики опухоли-донора и был представлен также умеренно дифференцированной аденокарциномой, значительная доля клеток которой была типичной формы с дегенеративно измененными ядрами или патологическими митозами (рис. 2).

Влияние лучевого воздействия на ортотопические ксенографты АП человека

Средние объемы ксенографтов и средний вес мышей контрольной и опытных групп представлены в табл. 1. В группе 1 (4 Гр) после первого и третьего сеансов облучения наблюдали статистически значимые отличия показателей ($p \leq 0,01$) средних объемов ксенографтов от показателей животных контрольной группы, не подвергавшейся облучению. При этом в опытных группах с разовой дозой облучения 6, 8 и 10 Гр средние объемы опухолевых узлов мышей статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от аналогичных показателей животных контрольной группы после каждой из трех процедур лучевого воздействия. В

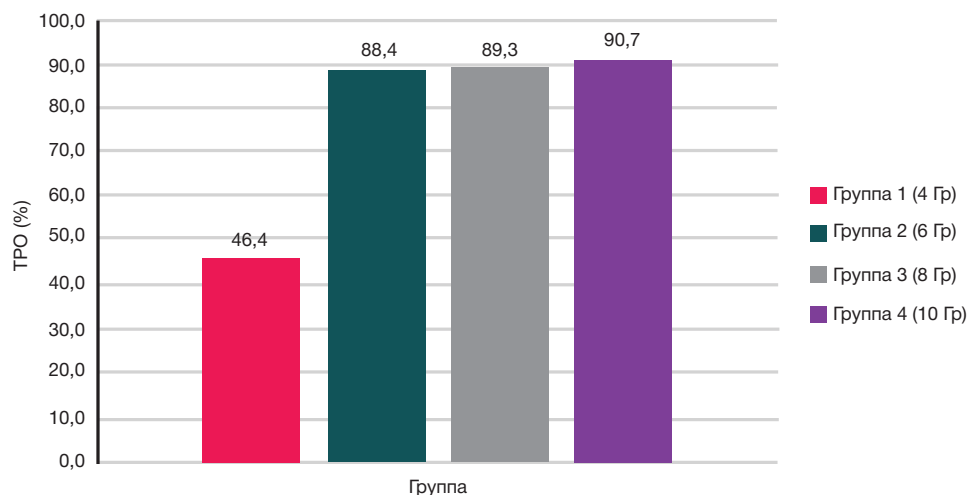


Рис. 3. Показатели ТРО мышей с PDX АП человека для экспериментальных групп с дозами облучения 1 (4 Гр), 2 (6 Гр), 3 (8 Гр) и 4 (10 Гр)

группах с разовой долей излучения в 6, 8 и 10 Гр на 7-е сутки эксперимента зафиксировали остановку роста опухоли до объемов 248,1, 227,8 и 198,9 мм³ соответственно, что существенно отличалось от объема опухолевых узлов у животных контрольной группы.

При оценке динамики веса мышей с имплантированными PDX АП человека достоверных различий во всех группах в течение всего эксперимента не зарегистрировали. Средняя масса тела животных составила от 19,7 ± 3,0 до 23,5 ± 0,5 г. Можно сделать вывод, что исследуемые дозы лучевого воздействия не повлияли на изменение массы тела мышей.

Показатель ТРО на момент окончания эксперимента в четырех опытных группах ортотопических PDX-моделей АП человека составил 46,4, 88,4, 89,3 и 90,7% соответственно (рис. 3). По результатам расчетов можно сделать вывод, что уже при суммарной дозе в 18 Гр наблюдается значительное торможение роста опухоли на моделях у мышей, и дальнейшее повышение дозы лучевого воздействия может быть неэффективным в связи с наносимым негативным воздействием на общее состояние организма животного.

На момент клинического осмотра животных из 4-й группы с суммарно полученной дозой излучения 30 Гр был замечен некроз опухоли с выделениями молочного цвета и изъязвлением поверхности опухолевого узла. При этом опухолевые узлы мышей контрольной группы были значительно крупнее, бордово-синего цвета с ярко выраженной кровеносной сетью, без некротизации ткани и изъязвлений.

С помощью гистологического анализа опухолевого материала ортотопической PDX-модели АП человека после суммарной дозы облучения 30 Гр зарегистрировали трансформацию железистых опухолевых клеток без ороговений, сопровождающуюся значительной некротизацией ткани (около 50% препарата) и очагами патологического митоза. Обнаружили также клетки с карио- и цитоллизом (рис. 4).

Гематологический и биохимический профиль крови ортотопических PDX АП человека после лучевого воздействия

В ходе эксперимента мы исследовали гематологические показатели у мышей всех групп после завершения лучевой терапии (табл. 2).

Среднее содержание гемоглобина в крови животных уменьшалось по мере увеличения дозы радиации, при этом наблюдали статистически значимое отличие показателей животных групп 1–4 от показателей животных контрольной группы ($p < 0,01$). Общее содержание эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов в крови также уменьшилось во всех исследуемых группах. В группах 2, 3 и 4 число лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов статистически

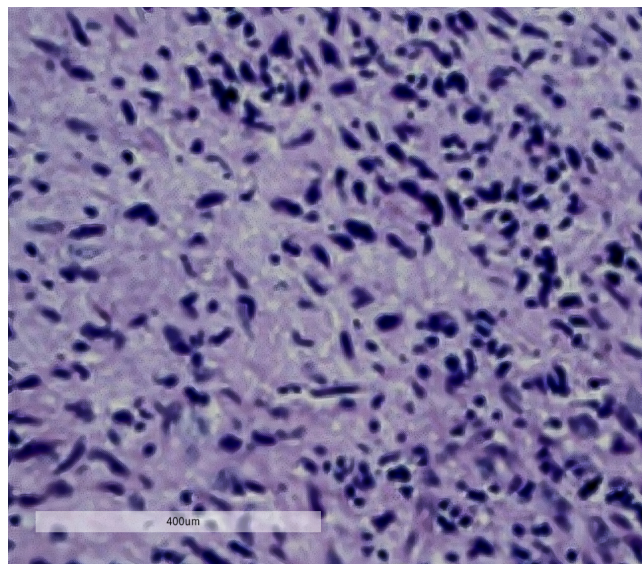


Рис. 4. Гистологический препарат PDX-модели АП человека на иммунодефицитных мышцах линии Balb/cNude после лучевого воздействия в суммарной дозе 30 Гр. Окрашка гематоксилином и эозином (ув. ×400)

значимо отличалось ($p < 0,01$) от аналогичных показателей животных группы контроля. Содержание эритроцитов и лейкоцитов у мышей всех опытных групп статистически значимо отличалось ($p < 0,01$) от контрольных животных.

Также мы провели биохимический анализ крови иммунодефицитных мышей с ксенографтами РП (табл. 3). Концентрация белка в крови мышей 2, 3, 4 групп статистически значимо отличалась от аналогичных показателей животных контрольной группы ($p < 0,01$). После увеличения дозы радиации у животных наблюдали плавное повышение содержания в крови мочевины, креатинина и аланинаминотрансферазы, при этом облучение в дозе 8 и 10 Гр привело к появлению статистически значимых отличий ($p < 0,01$) от показателей группы мышей, не подвергшихся облучению. Данные сдвиги в биохимическом профиле крови животных опытных групп можно объяснить процессами активной некротизации опухолевых узлов под воздействием лучевой терапии. При мониторинге уровня глюкозы в крови животных статистически значимых отличий не выявлено. Содержание щелочной фосфатазы в крови мышей 1, 2, 3, и 4 групп статистически значимо отличалось ($p < 0,01$) от аналогичных показателей животных контрольной группы по мере увеличения дозы радиации. Снижение активности щелочной фосфатазы в данном случае можно объяснить параллельным снижением концентрации гемоглобина в крови опытных групп животных. После воздействия радиации в суммарной дозе 24 Гр изменения жизненно важных параметров крови у экспериментальных животных сопровождались снижением их активности и сутулой позой.

Таблица 2. Значения гематологических показателей крови PDX аденокарциномы пищевода человека на 25-е сутки эксперимента

Группа	Гемоглобин	Тромбоциты	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ⁹ /л
Контроль	118 ± 4,9	481 ± 79	3,7 ± 0,6	1,6 ± 0,4	0,9 ± 0,2	6,8 ± 0,5
1 (4 Гр)	115 ± 4,3*	477 ± 60*	3,3 ± 0,5*	1,4 ± 0,4	0,85 ± 0,2	6,6 ± 0,4
2 (6 Гр)	111 ± 4,4*	474 ± 55*	3,0 ± 0,4*	1,2 ± 0,3*	0,7 ± 0,3	6,0 ± 0,4*
3 (8 Гр)	99 ± 5,8*	470 ± 58*	2,7 ± 0,4*	1,0 ± 0,4*	0,5 ± 0,2*	5,7 ± 0,4*
4 (10 Гр)	93 ± 3,9*	464 ± 52*	2,5 ± 0,3*	0,7 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	5,2 ± 0,3*

Примечание: * — отличается от значений в контрольной группе, $p < 0,01$; критерий Уилкоксона–Манна–Уитни.

Таблица 3. Значения биохимических показателей крови PDX аденокарциномы пищевода человека на 25-е сутки эксперимента

Группа	Белок, мг/дл	Мочевина, мг/дл	Креатинин, мг/дл	Глюкоза, мг/дл	АЛТ, ед./л	ЩФТ, ед./л
Контроль	5,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,05	190 ± 14	51 ± 6,7	65 ± 8,2
1 (4 Гр)	5,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,75 ± 0,1	185 ± 15	53 ± 7	62 ± 4,8*
2 (6 Гр)	5,7 ± 0,5*	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1*	189 ± 10	58 ± 6,5*	63 ± 4*
3 (8 Гр)	6,1 ± 0,4*	0,8 ± 0,1*	1,2 ± 0,2*	192 ± 16	59 ± 8,6*	61 ± 5,5*
4 (10 Гр)	6,3 ± 0,4*	1,1 ± 0,3*	1,3 ± 0,1*	191 ± 12	62 ± 6,7*	55 ± 7,5*

Примечание: * — отличается от значений в контрольной группе, $p < 0,01$; критерий Уилкоксона-Манна-Уитни; АЛТ — аланинаминотрансфераза; ЩФТ — щелочная фосфатаза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особый интерес из ранее опубликованных исследований вызывает работа, в которой изучили противоопухолевый эффект фракционированной лучевой терапии (3×2 Гр) в сочетании с препаратом ТН-302 (50 мг/кг, внутривенное введение) в отношении подкожных ксенографтов клеточных культур плоскоклеточного РП OE21 и АП OE19 [24]. Показана значительная задержка роста опухоли в карциномах OE19 ($p = 0,02$) и OE21 ($p = 0,03$) при комбинированном лечении ТН-302 с лучевой терапией по сравнению только с лучевой терапией. Модели, полученные путем подкожной имплантации раковых клеточных линий, не обладали интратуморальной гетерогенностью клонов клеток, свойственной опухоли человека, по причине чего данные доклинических исследований могут значительно расходиться с результатами последующих клинических испытаний [12].

В другой работе показано, что комбинация PI3K-селективного ингибитора СУН33 и радиационного излучения синергически подавляла рост подкожных ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с плоскоклеточным РП [25]. Несмотря на то, что подкожные ксенографты, созданные с использованием фрагментов человеческой опухоли, сохраняли гетерогенность клеточного состава биоматериала донора, гетеротопический сайт имплантации не позволял имитировать микроокружение опухоли человека, что препятствовало метастазированию и не воспроизводило основные сигнальные пути, задействованные в онкогенезе.

В нашей работе по исследованию эффективных доз радиационного воздействия в качестве объекта впервые была использована ортотопическая пациенто-подобная

модель АП человека как наиболее приближенная к клиническому ответу донорской опухоли [26]. Это позволило нам изучить влияние лучевого воздействия на рост ксенографтов и определить его дозозависимый эффект. В ранее опубликованных исследованиях PDX-модели различных опухолей человека изучали как модели метастазирования и не использовали для оценки лучевого воздействия [27].

ВЫВОДЫ

Средние объемы опухолевых узлов PDX-моделей опытных групп с разовой дозой облучения 6, 8 и 10 Гр статистически значимо отличались ($p \leq 0,01$) от аналогичных показателей группы контроля после каждой из трех процедур лучевого воздействия. При этом показатель ТРО на момент окончания эксперимента в четырех опытных группах ортотопических PDX-моделей АП человека составил 46,4, 88,4, 89,3 и 90,7% соответственно. Несмотря на отсутствие изменений веса мышей на протяжении эксперимента, общий анализ крови и анализ биохимических показателей позволяет сделать вывод о негативном дозозависимом эффекте лучевой терапии на организм животного. Суммарная доза, превышающая 18 Гр, приводила к снижению содержания гемоглобина, количества эритроцитов и лейкоцитов в крови и повышению деградации белковых молекул в процессе некротизации опухоли. Таким образом, для дальнейших исследований лучевой терапии и ее комбинации с различными противоопухолевыми субстанциями в эксперименте *in vivo* на мышинных моделях АП человека применение суммарных доз радиации, превышающих 18 Гр, нецелесообразно с точки зрения вреда, наносимого организму животного.

Литература

- Гладилина И. А., Трякин А. А., Захидова Ф. О., Малихова О. А., Иванов С. М., Кравец О. А. и др. Рак пищевода: эпидемиология, факторы риска и методы диагностики. Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия. 2020; 3 (1): 69–76.
- Ho ALK, Smyth EC. A global perspective on esophageal cancer: two diseases in one. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2020; 5 (6): 521–2. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30047-9.
- Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. New England Journal of Medicine. 2003; 349 (23): 2241–52.
- Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. Oncogene. 2016; 35 (41): 5337–49.
- Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (3): 5–11. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-3-5-11
- Кит О. И. Нейроэндокринные, клинические и морфологические аспекты рака желудка. Новочеркасск: Лик, 2014; 221 с.
- Ishihara R, Oyama T, Abe S, Takahashi H, Ono H, Fujisaki J et al. Risk of metastasis in adenocarcinoma of the esophagus: a multicenter retrospective study in a Japanese population. Journal of gastroenterology. 2017; 52 (7): 800–8. DOI: 10.1007/s00535-016-1275-0.
- Mahoney JL, Condon R. E. Adenocarcinoma of the esophagus. Annals of surgery. 1987; 205 (5): 557.
- Урмонов У. Б., Добродеев А. Ю., Афанасьев С. Г., Августиневич А. В., Черемисина О. В. Современные аспекты лечения рака пищевода. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (4): 78–84. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-78-84.
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for

- translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014; 4: 998–1013. DOI: 10.1158/2159-8290.
11. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* 2014; 74 (9): 2377–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
 12. Sung-Yup Cho. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Laboratory Animal Research.* 2020; 36: 14. DOI: 10.1186/s42826-020-00045-1.
 13. Zhuo J, Su R, Tan W, Lian Z, Lu D, Xu X. The ongoing trends of patient-derived xenograft models in oncology. *Cancer Commun (Lond).* 2020; 40 (11): 559–63. DOI: 10.1002/cac2.12096.
 14. Fernandes DP, Pimentel MML, Santos FAD, Praxedes ÉA, Brito PD, Lima MA, Leis ICNG, Macedo MF, Bezerra MB. Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (4): 3941–48. DOI: 10.1590/0001-3765201820180586.
 15. Жукова Г. В., Шихлярова А. И., Сагакянц А. Б., Протасова Т. П. О расширении вариантов использования мышей BALB/c nude для экспериментального изучения злокачественных опухолей человека in vivo. *Южно-Российский онкологический журнал.* 2020; 1 (2): 28–35.
 16. Szadvari I, Krizanov O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.* 2016; 65 (Suppl 4): S441–53. DOI: 10.33549/physiolres.933526.
 17. Pompili L, Porru M, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35 (1): 189. DOI: 10.1186/s13046-016-0462-4.
 18. Choi YY, Lee JE, Kim H, Sim MH, Kim K.-K., Lee G, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 22172. DOI: 10.1038/srep22172.
 19. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 451–2. DOI: 10.1038/nrc3972.
 20. Tétreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer growth and metastasis.* 2015; 8: 37–46. DOI: 10.4137/CGM.S21218.
 21. Bhargava S, Hotz B, Buhr HJ, Hotz HG. An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24: 31–9. DOI: 10.1007/s00384-008-0584-z.
 22. Ростовцев Н. М., Котляров Н. А. Сравнительный анализ эффективности лучевого и фотодинамического лечения экспериментальной опухоли. *Педиатрический вестник Южного Урала.* 2015; 1: 29–32.
 23. Колесников Е. Н., Кит С. О., Лукбанова Е. А., Гончарова А. С., Максимов А. Ю., авторы. Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации, патентообладатель. Способ ортотопической трансплантации культуры опухолевых клеток пищевода человека в шейный отдел пищевода иммунодефицитных мышей. Патент РФ 2713798. G09B 23/28. Заявка № 2019113616 от 30.04.19.
 24. Spiegelberg L, van Hoof SJ, Biemans R, Lieuwes NG, Marcus D, Niemans R, et al. Evofosfamide sensitizes esophageal carcinomas to radiation without increasing normal tissue toxicity. *Radiother Oncol.* 2019; 141: 247–55. DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.034.
 25. Shi J-J, Xing H, Wang Y-X, Zhang X, Zhan Q-M, Geng M-Y, et al. PI3Kα inhibitors sensitize esophageal squamous cell carcinoma to radiation by abrogating survival signals in tumor cells and tumor microenvironment. *Cancer Letters.* 2019; 459: 145–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.040.
 26. Teicher BA, Andrews PA, editors. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval.* 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004. DOI: 10.1007/978-1-59259-739-0.
 27. Трещалина Е. М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *РБЖ.* 2017; 16 (3): 6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.

References

1. Gladilina IA, Tryakin AA, Zahidova FO, Malihova OA, Ivanov SM, Kravec OA, i dr. Rak pishhevoda: jepidemiologija, faktory riska i metody diagnostiki. *Onkologicheskij zhurnal: luchejavaja diagnostika, luchejavaja terapija.* 2020; 3 (1): 69–76. Russian.
2. Ho ALK, Smyth EC. A global perspective on esophageal cancer: two diseases in one. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology.* 2020; 5 (6): 521–2. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30047-9.
3. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *New England Journal of Medicine.* 2003; 349 (23): 2241–52.
4. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. *Oncogene.* 2016; 35 (41): 5337–49.
5. Aksel EM. Statistika zlokachestvennyh novoobrazovanij zheludочно-kishechnogo trakta. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2017; 16 (3): 5–11. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-3-5-11. Russian.
6. Kit OI. Nejroendokrinnye, klinicheskie i morfologicheskie aspekty raka zheludka. *Novocherkassk: Lik,* 2014; 221 s. Russian.
7. Ishihara R, Oyama T, Abe S, Takahashi H, Ono H, Fujisaki J et al. Risk of metastasis in adenocarcinoma of the esophagus: a multicenter retrospective study in a Japanese population. *Journal of gastroenterology.* 2017; 52 (7): 800–8. DOI: 10.1007/s00535-016-1275-0.
8. Mahoney JL, Condon R. E. Adenocarcinoma of the esophagus. *Annals of surgery.* 1987; 205 (5): 557.
9. Urmonov UB, Dobrodeev AYU, Afanasev SG, Avgustinovich AV, Cheremisina OV. Sovremennye aspekty lechenija raka pishhevoda. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2019; 18 (4): 78–84. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-4-78-84. Russian.
10. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014; 4: 998–1013. DOI: 10.1158/2159-8290.
11. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* 2014; 74 (9): 2377–84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
12. Sung-Yup Cho. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Laboratory Animal Research.* 2020; 36: 14. DOI: 10.1186/s42826-020-00045-1.
13. Zhuo J, Su R, Tan W, Lian Z, Lu D, Xu X. The ongoing trends of patient-derived xenograft models in oncology. *Cancer Commun (Lond).* 2020; 40 (11): 559–63. DOI: 10.1002/cac2.12096.
14. Fernandes DP, Pimentel MML, Santos FAD, Praxedes ÉA, Brito PD, Lima MA, Leis ICNG, Macedo MF, Bezerra MB. Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (4): 3941–48. DOI: 10.1590/0001-3765201820180586.
15. Zhukova GV, Shihlyarova AI, Sagakyanc AB, Protasova TP. O rasshirenii variantov ispol'zovaniya myshej BALB/c nude dlja jeksperimental'nogo izuchenija zlokachestvennyh opuholej cheloveka in vivo. *Juzhno-Rossijskij onkologicheskij zhurnal.* 2020; 1 (2): 28–35. Russian.
16. Szadvari I, Krizanov O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.* 2016; 65 (Suppl 4): S441–53. DOI: 10.33549/physiolres.933526.
17. Pompili L, Porru M, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35 (1): 189. DOI: 10.1186/s13046-016-0462-4.
18. Choi YY, Lee JE, Kim H, Sim MH, Kim K.-K., Lee G, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 22172. DOI: 10.1038/srep22172.
19. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15: 451–2. DOI: 10.1038/nrc3972.

20. Tétreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer growth and metastasis*. 2015; 8: 37–46. DOI: 10.4137/CGM.S21218.
21. Bhargava S, Hotz B, Buhr HJ, Hotz HG. An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009; 24: 31–9. DOI: 10.1007/s00384-008-0584-z.
22. Rostovcev NM, Kotljarov NA. Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti luchevoego i fotodinamicheskogo lechenija jeksperimental'noj opuholi. *Pediatricheskij vestnik Juzhnogo Urala*. 2015; 1: 29–32. Russian.
23. Kolesnikov EN, Kit SO, Lukbanova EA, Goncharova AS, Maksimov AY, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie "Rostovskij nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut" Ministerstva zdravooohranenija Rossijskoj Federacii, patentoobladatel'. Sposob ortotopicheskoy transplantacii kul'tury opuholevyh kletok pishhevoda cheloveka v shejnyj otdel pishhevoda immunodeficitnyh myshej. Patent RF 2713798. G09B 23/28. Zajavka # 2019113616 ot 30.04.19. Russian.
24. Spiegelberg L, van Hoof SJ, Biemans R, Lieuwes NG, Marcus D, Niemans R, et al. Evofosfamide sensitizes esophageal carcinomas to radiation without increasing normal tissue toxicity. *Radiother Oncol*. 2019; 141: 247–55. DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.034.
25. Shi J-J, Xing H, Wang Y-X, Zhang X, Zhan Q-M, Geng M-Y, et al. PI3K α inhibitors sensitize esophageal squamous cell carcinoma to radiation by abrogating survival signals in tumor cells and tumor microenvironment. *Cancer Letters*. 2019; 459: 145–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.040.
26. Teicher BA, Andrews PA, editors. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2004. DOI: 10.1007/978-1-59259-739-0.
27. Treshhalina EM. Immunodeficitnye myshi Balb/c nude i modelirovanie razlichnyh variantov opuholevogo rosta dlja doklinicheskikh issledovanij. *RBZh*. 2017; 16 (3): 6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13. Russian.

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ ЛЮЦИФЕРАЗ ПОЛИХЕТ *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕСТА ИХ ОБИТАНИЯ

К. В. Пуртов¹, В. Н. Петушков¹, Н. С. Родионова¹, Т. В. Чепурных², В. Б. Кожемяко³, Р. И. Загитова², А. С. Щеглов^{2,4} ✉, Р. Х. Зиганшин², А. С. Царькова^{2,4}

¹ Институт биофизики, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук, Россия

² Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

³ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Морские полихеты *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (семейство *Chaetopteridae*) — космополиты, представляющие собой видовой комплекс из отдельных популяций-подвидов. При раздражении черви выпускают светящиеся (460 нм) облака слизи, при этом часто ярко светятся и их параподии. На сегодняшний день по-прежнему не ясно, как именно работает биолюминесцентная система этих полихет. Ранее было выдвинуто предположение, что люцифераза *C. variopedatus* может быть использована для детекции ферроптоза — недавно открытого пути программируемой клеточной гибели, вызванной накоплением ионов двухвалентного железа. Целью исследования было выделить и охарактеризовать люциферазы *C. variopedatus*, а также сравнить люциферазы *C. variopedatus* из разных популяций. При выделении ответственного за биолюминесценцию фермента из замороженных образцов бразильских *C. variopedatus* по усовершенствованной методике были получены две активные люциферазы — L1 и L2. Предположив, что одна из указанных люцифераз определяет свечение слизи, а другая — свечение параподий червей, эту же методику применили к отдельным образцам слизи и параподий живых дальневосточных *C. variopedatus*. Однако их слизь оказалась несветящейся. Показано, что функцию свечения параподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2, так как она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет и в параподиях дальневосточных полихет. Свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида. Набор изоформ люцифераз полихет *C. variopedatus* зависит от места их обитания.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, полихеты, *Chaetopterus variopedatus*, морские черви

Благодарности: профессору Андерсону Оливейра и младшему научному сотруднику Джереми Мирза (Океанографический институт Университета Сан-Паулу) за помощь в сборе биомассы бразильских полихет, а также директору Института Мирового океана Дальневосточного федерального университета Кириллу Винникову за консультации по вопросам систематики *Chaetopterus*.

Вклад авторов: К. В. Пуртов, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова — выделение люциферазы; Т. В. Чепурных — выделение ДНК, проведение ПЦР; В. Б. Кожемяко — сбор и подготовка биомассы для выделения люциферазы; Р. И. Загитова, А. С. Щеглов — исследование свойств люцифераз; Р. Х. Зиганшин — масс-спектрометрический анализ; А. С. Царькова — общее руководство проектом.

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

Статья получена: 28.09.2021 **Статья принята к печати:** 12.10.2021 **Опубликована онлайн:** 26.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.049

SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN THE *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* POLYCHAETE LUCIFERASES DEPENDING ON THE TYPE OF HABITAT

Purtov KV¹, Petushkov VN¹, Rodionova NS¹, Chepurnykh TV², Kozhemyako VB³, Zagitova RI², Shcheglov AS^{2,4} ✉, Ziganshin RH², Tsarkova AS^{2,4}

¹ Institute of Biophysics, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The marine polychaete *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (family *Chaetopteridae*) is a cosmopolitan species complex, consisting of distinct populations/subspecies. The worms release glowing (460 nm) clouds of mucus when disturbed, and their parapodia often glow brightly. Currently, it is still unclear how exactly the bioluminescence system of these polychaetes functions. It has been previously assumed that the *C. variopedatus* luciferase may be used for detection of ferroptosis, the recently explored pathway of programmed cell death, resulting from accumulation of the ferrous ions. This study was aimed to extract and characterize the *C. variopedatus* luciferases, as well as to compare luciferases obtained from *C. variopedatus* of different populations. When extracting the enzyme responsible for bioluminescence from the frozen samples of Brazilian *C. variopedatus* using the improved method, two active luciferases, L1 and L2, were obtained. We assumed that one of the listed above luciferases was responsible for luminescence of the mucus and the other luciferase was responsible for luminescence in parapodia, and used the method for the distinct samples of mucus and parapodia of the living Far Eastern *C. variopedatus*. However, mucus of the latter turned out to be non-glowing. It is shown that luciferase L2 is responsible for luminescence in the parapodia of the *C. variopedatus* polychaete, since this luciferase has been found in the total biomass of Brazilian polychaetes and parapodia of Far Eastern polychaetes. Luminescence of the Brazilian *C. variopedatus* mucus is attributed to the functioning of luciferase L1, which is lacking in the mucus of the Far Eastern subspecies. The range of luciferase isoforms in polychaetes *C. variopedatus* depends on the place of origin.

Keywords: bioluminescence, luciferase, polychaetes, *Chaetopterus variopedatus*, marine worms

Acknowledgements: we would like to thank Anderson Oliveira, Professor, and Jeremy Mirza, junior researcher at the Oceanographic Institute of the University of São Paulo for assistance in collecting the biomass of Brazilian polychaetes, and Kirill Vinnikov, Director at the Institute of Marine Biology, Far Eastern Federal University, for advice on the *Chaetopterus* taxonomy.

Author contribution: Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS — luciferase extraction; Chepurnykh TV — DNA extraction, PCR; Kozhemyako VB — biomass collection and preparation for luciferase extraction; Zagitova RI, Shcheglov AS — studying the properties of luciferases; Ziganshin RH — mass spectrometry; Tsarkova AS — overall project management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandr S. Shcheglov
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; jukart@mail.ru

Received: 28.09.2021 **Accepted:** 12.10.2021 **Published online:** 26.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.049

Chaetopterus variopedatus (Renier) относится к семейству *Chaetopteridae*, одному из наиболее дифференцированных среди морских полихет, ведущих на взрослой стадии развития бентосный образ жизни, за исключением необычного пелагического вида *C. pugaporcinus* (Osborn) [1]. Разные исследователи описывают *C. variopedatus* как видовой комплекс, состоящий из нескольких отдельных популяций-подвидов [2–4]. *C. variopedatus* — космополит, обитает в умеренных и тропических регионах по всему миру. Разные подвиды *C. variopedatus* встречаются в прибрежных районах России, Японии, Австралии, Бразилии, Европы и США [5]. Несколько лет назад филогенетические отношения в семействе *Chaetopteridae* были пересмотрены [1, 6], однако для *C. variopedatus sensu lato* (Hartman) до сих пор нет полной ясности в этом вопросе.

C. variopedatus живет, прячась в построенной самостоятельно погруженной в грунт U-образной пергаментной трубке. У него сегментированное тело с парными конечностями — параподиями. В ответ на агрессивное воздействие извне *C. variopedatus* выпускает облако светящейся голубым светом (с максимумом на 460 нм) слизи [7]. При этом также ярко светятся параподии всех сегментов тела червя. Это явление издавна привлекало внимание любопытных наблюдателей, о чем свидетельствуют многочисленные публикации. Многие исследователи на протяжении последних 70 лет пытались понять биохимические аспекты процесса свечения *C. variopedatus* [8–10]. Однако результаты довольно противоречивы, и на сегодняшний день по-прежнему не ясно, как именно работает биолюминесцентная система этих полихет.

Ранее мы писали, что из биомассы *C. variopedatus*, собранной в проливе Сан-Себастьян побережья Бразилии, за несколько этапов очистки был получен препарат люциферазы, с которым воспроизведена характерная биолюминесцентная реакция *in vitro*. Для этого к препарату добавляли спиртовой экстракт *C. variopedatus*, содержащий основной субстрат (люциферин) и ионы двухвалентного железа [11].

Мы предположили, что люцифераза *C. variopedatus* может быть использована для детекции ферроптоза [12] — недавно открытого пути программируемой клеточной гибели, вызванной накоплением ионов двухвалентного железа [13]. Изучение ферроптоза важно как для фундаментальной науки, так и для прикладных биомедицинских разработок. Показано, что процессы, похожие на ферроптоз, имеют место при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [14]. Кроме того, индукторы ферроптоза представляют собой перспективные противоопухолевые препараты [15].

Таким образом, детальная характеристика и расшифровка биолюминесцентной системы *C. variopedatus* является актуальной научной задачей. Целью исследования было выделить и охарактеризовать люциферазы *C. variopedatus*, а также сравнить люциферазы *C. variopedatus* из разных популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биомассы *C. variopedatus*

Вылов *C. variopedatus* производили в двух местах: проливе Сан-Себастьян побережья Бразилии и бухте Троицы залива Посьета Японского моря. Особей извлекали из домиков и немедленно замораживали в жидком азоте.

Транспортировку замороженных полихет осуществляли на сухом льду, а хранение — при температуре -70°C .

Для получения светящейся слизи червей извлекали из домика, помещали в морскую воду и механически стимулировали в темноте. Светящуюся слизь собирали пипеткой и замораживали в жидком азоте.

Выделение люциферазы

100 г замороженной биомассы *C. variopedatus* гомогенизировали в 900 мл 50 mM Трис-буфера, pH 7,5. Гомогенат обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового гомогенизатора Ultrasonic Disintegrator UD-20 (Techpan; Польша) 5 раз по 2 мин на льду, а затем центрифугировали (25 000 g x 20 мин) при 4°C . К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 500 mM и пропускали через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (Cellulose DEAE-32, Serva; Германия), уравновешенную 500 mM сульфатом аммония. Полученный фильтрат наносили на колонку 25 x 100 мм Phenyl Sepharose CL-4B (Cytiva; США), уравновешенную 500 mM сульфата аммония. Люциферазу элюировали 5 mM Трис-HCl буфером, pH 7,5.

Фракции с люциферазной активностью объединяли и наносили на колонку 16 x 200 мм Sepharose DEAE FF (Cytiva; США), уравновешенную 20 mM Трис-HCl, pH 7,5; промывали этим же буфером и элюировали линейным градиентом. Буфер А — 20 mM Трис-HCl, pH 7,5, буфер Б — 500 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 4 мл/мин, время градиента — 25 мин.

Полученный препарат концентрировали на ячейке 10 кДа (Amicon; Ирландия) и наносили на колонку 26 x 400 мм с сорбентом Sephacryl S200 (Cytiva; США), уравновешенную 200 mM NaCl с 20 mM Трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 1,5 мл/мин. К объединенным фракциям с люциферазной активностью добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 500 mM и наносили полученный раствор на колонку 5 x 90 мм с сорбентом C8 (Cytiva; США). Элюцию проводили линейным градиентом. Буфер А — 500 mM сульфата аммония, 5 mM Трис-HCl, pH 7,5, буфер Б — 5 mM Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 0,5 мл/мин, время градиента — 80 мин.

Полученный препарат люциферазы разводили в два раза дистиллированной водой и наносили на колонку 3 x 50 мм с сорбентом monoQ (Cytiva; США), уравновешенную 20 mM Трис-HCl, pH 7,5, промывали тем же буфером и элюировали линейным градиентом. Буфер А — 20 mM Трис-HCl pH 7,5, буфер Б — 500 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 0,5 мл/мин, время градиента — 80 мин.

Препарат концентрировали на центрифужном фильтре 10 кДа (Amicon; Ирландия) до 200 мкл, затем проводили гель-фильтрацию на колонке 10 x 300 мм Superdex 200 (Cytiva; США), уравновешенной 100 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0,8 мл/мин.

Люциферазу из светящейся слизи (10 мл) выделяли аналогичным образом. Измерение активности люциферазы проводили по ранее разработанному протоколу [11].

Для определения видовой специфичности имеющихся образцов *Chaetopterus* использовали праймеры HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') и LCO1490 (5'-TCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'). Была выделена ДНК каждого из образцов замороженных тканей

C. variopedatus — для этого использовали набор реактивов ExtractDNA Blood & Cells («Евроген»; Россия). После этого с помощью указанных праймеров амплифицировали последовательности фрагмента гена COI длиной 650 п.н., используя в качестве матрицы ДНК каждого из образцов замороженных тканей. Полученные продукты ПЦР были секвенированы по Сенгеру.

Масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских и дальневосточных *C. variopedatus* проводили на масс-спектрометре Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific; США), сопряженном с хроматографом Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific; США), посредством наноэлектроспрейного источника ионизации (Thermo Fisher Scientific; США). При масс-спектрометрическом анализе использовали следующие параметры: разрешение — 140 000, диапазон сканирования — 500–2000 m/z , уровень AGC — 3×10^6 , максимальное время инъекции ионов — 30 мсек. Полученные первичные данные визуализировали при помощи программы XCalibur (Thermo Fisher Scientific; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение анионообменной хроматографии высокого разрешения привело к разделению целевого препарата на две практически гомогенные люциферазы: L1 с временем удержания 21,5 мин и L2 с временем удержания 46 мин (рис. 1). Их нативные молекулярные массы, рассчитанные по результатам гель-фильтрации, составили 70 кДа и 60 кДа соответственно (рис. 2).

В денатурирующих условиях SDS-фореза люцифераза L1 состоит из моносубъединиц, примерно по 18 кДа каждая, а L2 — как минимум из двух разных субъединиц массой около 18 и 15 кДа (рис. 3).

Присутствие в одном животном двух разных люцифераз может свидетельствовать о их различном происхождении или об особенностях функционирования [16, 17]. Хотя люминесценция *C. variopedatus* одноцветная (синяя),

вероятно, каждая из его люцифераз функционирует локально: например, одна определяет свечение пароподий, другая — свечение слизи, выделяемой червем во внешнюю среду.

Для проверки этой гипотезы использовали образец слизи, собранной и отдельно замороженной при ловле бразильских *C. variopedatus*. Хроматографический анализ препарата, очищенного по приведенной выше методике, показал присутствие только одной люциферазы, причем время ее удержания на колонке моноQ (45,5 мин) практически совпало с таковым для L1, выделенной ранее из тотальной биомассы червя (см. рис. 1). Отдельных образцов пароподий бразильских полихет не было, а количества полученных препаратов L1 и L2 оказалось недостаточно для их сиквенса. Поэтому авторы обратились к более близкому источнику таких червей — дальневосточному побережью России.

Полихеты, выловленные в бухте Троицы залива Посыета Японского моря, изначально были определены как *C. variopedatus* по морфологическим признакам и доставлены в лабораторию живыми. Для более точного определения видовой специфичности имеющихся *Chaetopterus* авторы секвенировали фрагмент гена первой субъединицы цитохром С оксидазы (COI) длиной 650 п. н. Анализ последовательностей по базе данных GenBank показал, что фрагменты COI бразильского и дальневосточного образцов с высокой степенью гомологии (более 99%) принадлежат двум разным подвидам: *C. variopedatus* (AM503096.1) и *C. cautus* Marenzeller (LC533809.1) соответственно. В настоящее время они объединены в один видовой комплекс *C. variopedatus* [6].

В процессе сбора дальневосточных полихет выделяемую ими слизь замораживали отдельно. После размораживания в лаборатории не удалось зарегистрировать ее люминесценцию. Порции свежей слизи, полученные в ответ на механическую и химическую стимуляцию живых червей, тоже не светились. Добавка люциферина и двухвалентного железа к образцам слизи также не

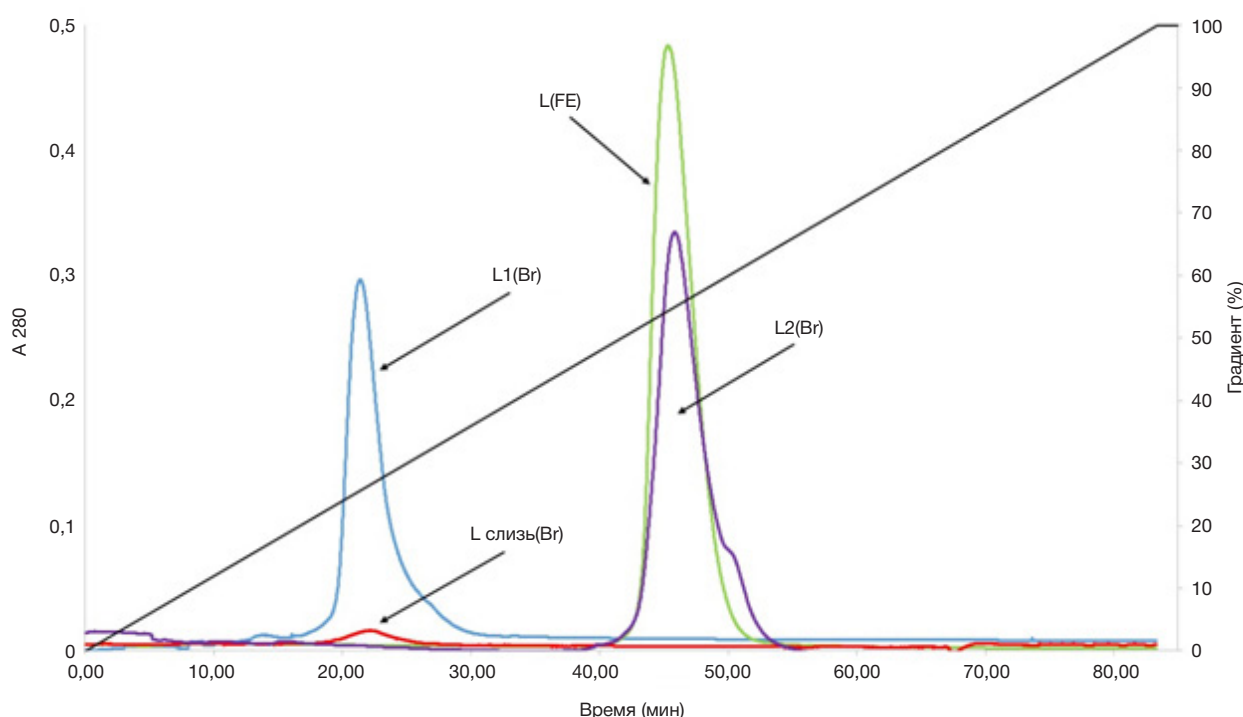


Рис. 1. Время удержания различных люцифераз *C. variopedatus* при хроматографировании на анионообменной колонке моноQ, линейный градиент; Br — бразильские полихеты, FE — дальневосточные полихеты

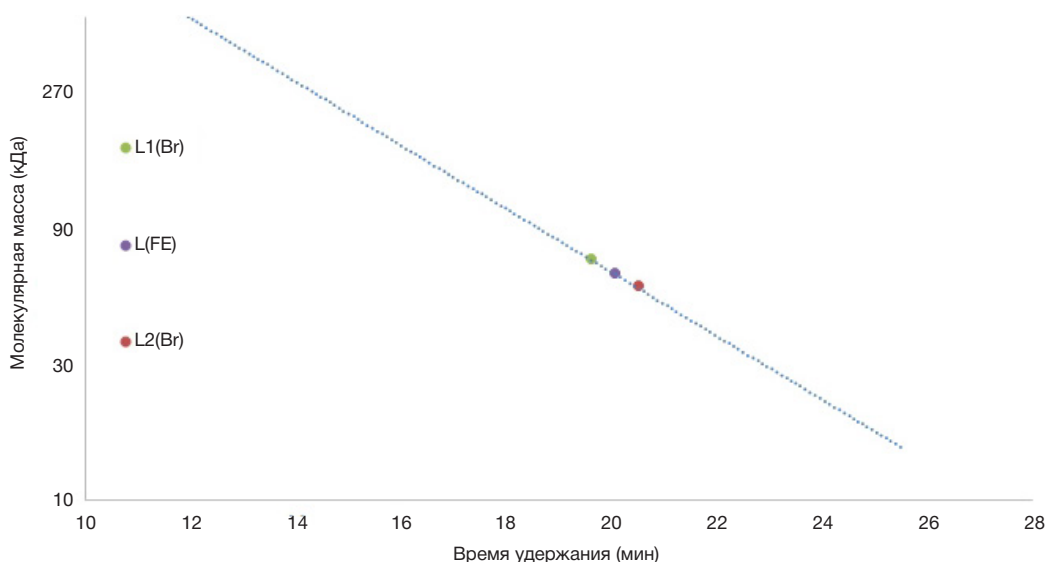


Рис. 2. Определение молекулярных масс различных люцифераз *C. variopedatus* с помощью гель-фильтрации; Br — бразильские полихеты, FE — дальневосточные полихеты

приводила к светоизлучению. Попытки выделить из образцов слизи какую-либо люциферазу по приведенной выше методике успехом не увенчались.

С регистрацией свечения парapoдий дальневосточных полихет проблем не возникло. Из них удалось выделить высокоочищенную люциферазу L(FE) с нативной молекулярной массой 65 кДа (см. рис. 2). Время удержания этой люциферазы на колонке топоQ — 45,5 мин, что практически совпадает с таковым для люциферазы L2 (см. рис. 1). На денатурирующем SDS-форезе видно, что L(FE), как и L2 бразильских полихет, состоит из двух различных субъединиц. Молекулярные массы субъединиц этих белков тоже близки (см. рис. 3).

Проведен масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских и дальневосточных *Chaetopterus*. Результаты, соотношение масса/заряд (m/z), заряд (z) и рассчитанная молекулярная масса (m) представлены в таблице.

Препараты люцифераз L2(Br) и L(FE) существенно более гетерогенны, чем препарат L1(Br), что, по-видимому, объясняется посттрансляционными модификациями и отщеплением концевых аминокислот. Наборы масс,

полученные для L2(Br) и L(FE), практически идентичны, что говорит о сходстве самих ферментов, и значительно отличаются от такового для L1(Br).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биолюминесцентные системы широко применяют в различных биомедицинских технологиях [18, 19]. Одним из важных направлений является люминесцентный биоимиджинг — прижизненная визуализация клеток и внутриклеточных процессов [20]. В случае успешной расшифровки люциферазы *C. variopedatus* предположительно может быть использована для создания сенсора ферроптоза [12]. Мы оптимизировали ранее разработанную [11] методику выделения люциферазы *C. variopedatus*, что позволило получить практически чистый препарат, пригодный для масс-спектрометрического анализа.

Изначально для исследования использовали *C. variopedatus*, выловленных в Бразилии, однако из-за логистических проблем стали использовать *C. variopedatus*, выловленных в Приморском крае России. Интересно, что в отличие от бразильских, дальневосточные *C. variopedatus*

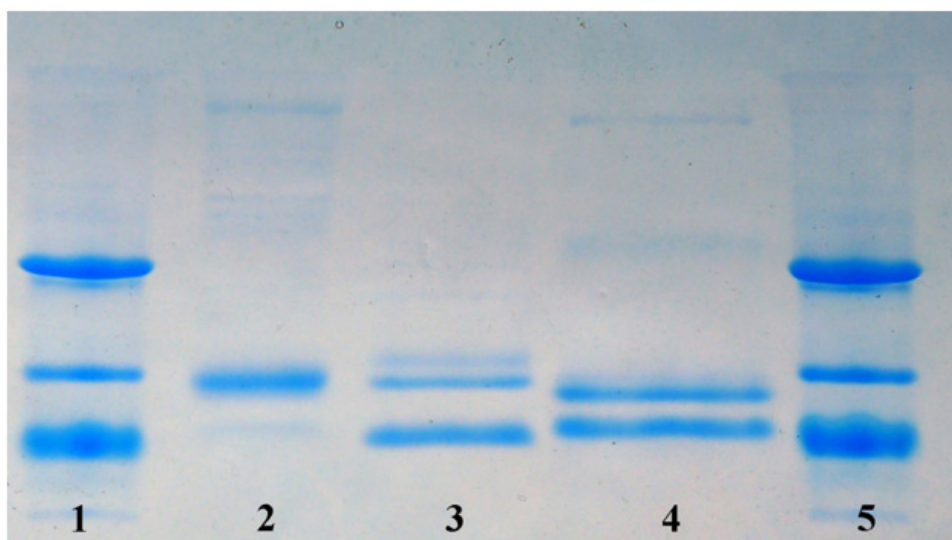


Рис. 3. Денатурирующий электрофорез (15% SDS-ПААГ) препаратов L1 (2) и L2 (3) бразильского и люциферазы дальневосточного *C. variopedatus* (4). Треки 1 и 5 — калибровочная белковая смесь для SDS-ПААГ-фореза: 29 000, 21 000, 12 500, 6500 кДа

Таблица. Масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских (Br) и дальневосточных (FE) *Chaetopterus*

L1(Br)			L2(Br)			L(FE)		
<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>	<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>	<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>
1355,5	12	16253	1352,49	11	14866,39	1352,67	11	14868,37
1364	12	16356	1364,5	11	14998,5	1355,5	12	16254
1374,94	11	15113,34	1365,94	11	15014,34	1364,09	12	16357
1383,58	11	15208,38	1373,31	11	15095,41	1366,13	11	15016,43
			1374,77	11	15111,47	1373,41	11	15096,51
			1383,76	11	15210,36	1374,95	11	15113,45
			1396,93	12	16751,16	1383,85	11	15211,35
			1405,35	12	16852,2	1396,94	12	16751,28
						1404,44	12	16853,28

Примечание: *m/z* — соотношение масса/заряд; *z* — заряд; *m* — молекулярная масса.

не секретируют светящуюся слизь. В бразильских *C. variopedatus* были обнаружены две различных изоформы люциферазы (L1 и L2), тогда как в дальневосточных была обнаружена одна (L). Масс-спектрометрический и хроматографический анализ показал, что L2 и L обладают существенным сходством и отличаются от L1. По-видимому, функцию свечения пароподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2 (L), поскольку она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет и в пароподиях дальневосточных полихет. Свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида.

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы: 1) функцию свечения пароподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2, так как она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет как L2(Br) и в пароподиях дальневосточных полихет как идентичная ей L(FE); 2) свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида; 3) набор изоформ люцифераз полихет *C. variopedatus* зависит от места их обитания.

Литература

- Osborn KJ, Rouse GW, Goffredi SK, Robison BH. Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic polychaete (Annelida, Chaetopteridae). Biol Bull. 2007; 212 (1): 40–54. DOI: 10.2307/25066579.
- Petersen ME. *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (Annelida: Polychaeta: Chaetopteridae): a species complex. What species are being used at MBL? Biol Bull. 1984; 167: 513.
- Petersen ME. Contribution to a revision of *Chaetopterus* Cuvier (Polychaeta: Chaetopteridae): redescription of *C. appendiculatus* Grube and *C. cautus* Marenzeller, with comments on some other species. Bull Mar Sci. 1997; 60: 619.
- Bhaud M. The spreading potential of polychaete larvae does not predict adult distributions; consequences for conditions of recruitment. Hydrobiologia. 1998; 375: 35. DOI: 10.1023/A:1017073409259.
- Mirza JD, Migotto AE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. *Chaetopterus variopedatus* bioluminescence: a review of light emission within a species complex. Photochem Photobiol. 2020; 96: 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
- Moore JM, Nishi E, Rouse GW. Phylogenetic analyses of *Chaetopteridae* (Annelida). Zoologica Scripta. 2017; 46 (5): 596–610. Available from: <https://doi.org/10.1111/zsc.12238>.
- Anctil M. The epithelial luminescent system of *Chaetopterus variopedatus*. Can J Zool. 1979; 57 (6): 1290–310. DOI: 10.1139/Z79-166.
- Shimomura O, Johnson FH, Haneda Y. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system. Bioluminescence in Progress. Princeton University Press; 1966: 495521. Available from: <https://doi.org/10.1515/9781400875689-031>.
- Branchini BR, Behney CE, Southworth TL, Rawat R, Deheyn DD. Chemical analysis of the luminous slime secreted by the marine worm *Chaetopterus* (Annelida, Polychaeta). Photochem Photobiol. 2014; 90 (1): 247–51. DOI: 10.1111/php.12169.
- Shimomura O, Johnson FH. *Chaetopterus* photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. Science. 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
- Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, et al. Luciferin-luciferase system of marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*. Dokl Biochem Biophys. 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.
- Щерлов А. С., Царькова А. С. Перспективы использования биолюминесцентной системы *Chaetopterus variopedatus* для мониторинга ферроптоза в живых организмах. Вестник РГМУ. 2021; (3): 79–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis. 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021; 6 (1): 49. DOI: 10.1038/s41392-020-00428-9.
- Viviani VR, et al. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. J Biochem. 2006; 140 (4): 467–74. DOI: 10.1093/jb/mvj190.
- Arnoldi FG, da Silva Neto AJ, Viviani VR. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in mastinocerini railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae). Photochem Photobiol Sci. 2010; 9 (1): 87–92. DOI: 10.1039/B9PP00078J.
- Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. Expert Opin Drug Discov. 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
- Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. Chem Soc Rev. 2021; 50: 5668–705.

DOI: 10.1039/D0CS01492C.

20. Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image processing for

preclinical bioluminescent imaging. J Appl Bioinform Comput Biol. 2015; 4 (1): pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.

References

1. Osborn KJ, Rouse GW, Goffredi SK, Robison BH. Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic polychaete (Annelida, Chaetopteridae). Biol Bull. 2007; 212 (1): 40–54. DOI: 10.2307/25066579.
2. Petersen ME. *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (Annelida: Polychaeta: Chaetopteridae): a species complex. What species are being used at MBL? Biol Bull. 1984; 167: 513.
3. Petersen ME. Contribution to a revision of *Chaetopterus* Cuvier (Polychaeta: Chaetopteridae): redescription of *C. appendiculatus* Grube and *C. cautus* Marenzeller, with comments on some other species. Bull Mar Sci. 1997; 60: 619.
4. Bhaud M. The spreading potential of polychaete larvae does not predict adult distributions; consequences for conditions of recruitment. Hydrobiologia. 1998; 375: 35. DOI: 10.1023/A:1017073409259.
5. Mirza JD, Migotto AE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. *Chaetopterus variopedatus* bioluminescence: a review of light emission within a species complex. Photochem Photobiol. 2020; 96: 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
6. Moore JM, Nishi E, Rouse GW. Phylogenetic analyses of *Chaetopteridae* (Annelida). Zoologica Scripta. 2017; 46 (5): 596–610. Available from: <https://doi.org/10.1111/zsc.12238>.
7. Ancil M. The epithelial luminescent system of *Chaetopterus variopedatus*. Can J Zool. 1979; 57 (6): 1290–310. DOI: 10.1139/Z79-166.
8. Shimomura O, Johnson FH, Haneda Y. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system. Bioluminescence in Progress. Princeton University Press; 1966: 495521. Available from: <https://doi.org/10.1515/9781400875689-031>.
9. Branchini BR, Behney CE, Southworth TL, Rawat R, Deheyn DD. Chemical analysis of the luminous slime secreted by the marine worm *Chaetopterus* (Annelida, Polychaeta). Photochem Photobiol. 2014; 90 (1): 247–51. DOI: 10.1111/php.12169.
10. Shimomura O, Johnson FH. *Chaetopterus* photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. Science. 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
11. Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, et al. Luciferin-luciferase system of marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*. Dokl Biochem Biophys. 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.
12. Shcheglov AS, Tsarkova AS. The potential of using the bioluminescent system of *Chaetopterus variopedatus* to study ferroptosis in living organisms. Bulletin of RSMU. 2021; (3): 79–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
13. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
14. Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis. 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
15. Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021; 6 (1): 49. DOI: 10.1038/s41392-020-00428-9.
16. Viviani VR, et al. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. J Biochem. 2006; 140 (4): 467–74. DOI: 10.1093/jb/mvj190.
17. Arnoldi FG, da Silva Neto AJ, Viviani VR. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in mastinocerini railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae). Photochem Photobiol Sci. 2010; 9 (1): 87–92. DOI: 10.1039/B9PP00078J.
18. Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. Expert Opin Drug Discov. 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
19. Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. Chem Soc Rev. 2021; 50: 5668–705. DOI: 10.1039/D0CS01492C.
20. Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image processing for preclinical bioluminescent imaging. J Appl Bioinform Comput Biol. 2015; 4 (1): pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.

ПРЕДИКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ В МАЛИГНИЗАЦИИ *H. PYLORI*-АССОЦИИРОВАННОГО ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА

Е. П. Голубинская¹, Т. П. Сатаева¹✉, И. И. Фомочкина¹, А. В. Кубышкин¹, Т. П. Макалиш¹, Н. А. Школяр², А. А. Галышевская¹, Д. В. Варгхесе¹

¹ Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Опухоль-ассоциированные макрофаги способны регулировать пролиферацию опухолевых клеток и влиять на процессы их диссеминации. Целью исследования было оценить предиктивный потенциал иммуногистохимического фенотипирования макрофагальной популяции при ранней малигнизации *H. pylori*-ассоциированного хронического гастрита. Материалом для исследования послужили гастриобиоптаты инфицированных *Helicobacter pylori* пациентов обоего пола в возрасте $48 \pm 7,2$ лет, разделенных на три группы: хронический неатрофический гастрит (ХНГ, $n = 10$), хронический атрофический гастрит (ХАГ, $n = 10$), аденокарцинома желудка G1-G2 (АКЦ, $n = 10$). Макрофагальную популяцию визуализировали с помощью панмакрофагального маркера CD68 и маркера моноцитов/макрофагов 2-го типа CD163. Интенсивность неоваскулогенеза определяли с использованием маркера эндотелия сосудов CD31 путем оценки суммарной площади поперечного сечения сосудов. Установлено, что хронический гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции макрофагов по мере нарастания атрофических и неопластических процессов. По данным иммуногистохимического исследования биоптатов, у группы пациентов с ХНГ соотношение CD163 : CD68 составило $0,67 \pm 0,02$, а суммарная площадь поперечного сечения сосудов была равна $3590,92 \pm 356,27$ мкм². Атрофический гастрит и аденокарцинома характеризуются векторным перераспределением моноцитов/макрофагов во второй функциональный фенотип. Индекс экспрессии CD163 : CD68 в группе с ХАГ составляет $0,81 \pm 0,04$, а в группе с АКЦ — $0,88 \pm 0,03$. Площадь микроциркуляторного русла в группах с ХАГ и АКЦ значительно возрастает, что отражает интенсификацию процессов неоваскулогенеза в опухоли под влиянием моноцитов/макрофагов M2. Усиленная экспрессия CD163 может служить предиктором малигнизации хронического гастрита в комплексе с оценкой степени атрофии и метаплазии эпителия железистого компонента.

Ключевые слова: рак желудка, гастрит, аденокарцинома, опухоль-ассоциированные макрофаги, *Helicobacter pylori*

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания № Ф3ЭГ-2020-0060 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в области научных исследований по теме «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с использованием клеточных и генетических технологий».

Вклад авторов: Е. П. Голубинская — анализ клинических данных, проведение иммуногистохимического исследования, редактирование рукописи; Т. П. Сатаева, И. И. Фомочкина — систематический анализ, написание рукописи; А. В. Кубышкин — статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; Т. П. Макалиш — подготовка материала для морфологического исследования, проведение иммуногистохимического исследования; Н. А. Школяр — сбор и подготовка биоптатов; А. А. Галышевская, Д. В. Варгхесе — обработка морфометрических данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол №15 от 5 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), Стандартами надлежащей клинической практики (GCP) и ФЗ № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Павловна Сатаева
Бульвар Ленина д. 5/7, г. Симферополь, 295006, Россия; tanzcool@mail.ru

Статья получена: 19.08.2021 **Статья принята к печати:** 03.09.2021 **Опубликована онлайн:** 13.09.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.044

PREDICTIVE POTENTIAL OF MACROPHAGE POPULATION PHENOTYPING IN MALIGNIZATION OF *H. PYLORI*-ASSOCIATED CHRONIC GASTRITIS

Golubinskaya EP¹, Sataieva TP¹✉, Fomochkina II¹, Kubyshekin AV¹, Makalish TP¹, Shkolyar NA², Galyshevskaya AA¹, Varghese DV¹

¹ V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Russia

² Sechenov University, Moscow, Russia

Tumor-associated macrophages are able to regulate the tumor cell proliferation and to affect the tumor cell dissemination. The study was aimed to assess the predictive potential of the macrophage population immunohistochemical phenotyping in early malignization of *H. pylori*-associated chronic gastritis. Gastric biopsy samples of male and female patients aged 48 ± 7.2 infected with *Helicobacter pylori* were used as the research material. The patients were divided into three groups: non-atrophic chronic gastritis (NACG, $n = 10$), atrophic chronic gastritis (ACG, $n = 10$), G1/G2 gastric adenocarcinoma (GAC, $n = 10$). The macrophage population was visualized using the CD68 pan-macrophage marker and the type 2 monocyte/macrophage marker CD163. Intensity of neoangiogenesis was defined using the CD31 endothelial marker by assessing the total cross sectional area of blood vessels. It was found that chronic gastritis was accompanied by the dynamic increase in the size of the general macrophage population with the progression of atrophic and metaplastic processes. According to immunohistochemical study of biopsies obtained from patients with NCG, the CD163 : CD68 ratio was 0.67 ± 0.02 , and the total cross sectional area of blood vessels was 3590.92 ± 356.27 μm². Atrophic gastritis and adenocarcinoma were characterized by vector redistribution of monocytes/macrophages into the 2nd functional phenotype. The CD163 : CD68 expression index in the group with ACG was 0.81 ± 0.04 , and in the group with GAC it was 0.88 ± 0.03 . Microvascular area was significantly increased in the groups with ACG and GAC, which reflected tumor neoangiogenesis intensification under the influence of M2 monocytes/macrophages. The increased expression of CD163 can serve as a predictor of chronic gastritis malignization together with evaluation of the glandular epithelium atrophy and metaplasia degree.

Keywords: gastric cancer, gastritis, adenocarcinoma, tumor-associated macrophages, *Helicobacter pylori*

Funding: the study was carried out within the framework of the Government Assignment № FZEG-2020-0060 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the field of scientific research "Algorithms for molecular genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies".

Author contribution: Golubinskaya EP — clinical data analysis, immunohistochemistry, manuscript editing; Sataieva TP, Fomochkina II — systematic analysis, manuscript writing; Kubyshekin AV — statistical analysis, manuscript editing; Makalish TP — sample preparation for morphological assessment, immunohistochemistry; Shkolyar NA — biopsy sample collection and preparation; Galyshevskaya AA, Varghese DV — morphometric data processing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Medical Academy named after S. I. Georgievsky (protocol № 15 dated December 5, 2020); the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki 1964 (revised in 1975 and 1983), Good Clinical Practice (GCP) standards and the Federal Law № 323-FZ "On the Basics of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation" dated November 21, 2011. The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana P. Sataieva
Bulvar Lenina, 5/7, Simferopol, 295006, Russia; tanzcool@mail.ru

Received: 19.08.2021 **Accepted:** 03.09.2021 **Published online:** 13.09.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.044

В настоящее время рак желудка занимает пятое место по заболеваемости и третье по смертности не только в Российской Федерации, но и во всем мире. Значительный рост числа молодых пациентов с данным заболеванием стал поводом для проведения многочисленных исследований, направленных на выявление ранних предикторов канцерогенеза и критических факторов риска малигнизации [1, 2].

Среди патогенных факторов рака желудка инфицирование *Helicobacter pylori* (HP) является основной причиной этого заболевания. Доказано, что у 80% больных раком желудка в анамнезе отмечалось присутствие HP [3, 4]. Нет сомнений, что HP является одним из решающих факторов в каскадном процессе канцерогенеза, инициируя развитие острого гастрита, пролонгацию его в хронический с последующей атрофической, метапластической и диспластической трансформацией, что в конечном счете приводит к развитию аденокарциномы [5].

В последние годы все больше исследований сосредоточено на изменениях в опухолевом микроокружении. Особый интерес вызывает изучение опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) [6]. ОАМ связаны с возникновением опухолей, играя ключевую роль в метастазировании, а также иммунной регуляции новообразований. В настоящее время установлен факт функциональной неоднородности макрофагов. Выделяют макрофаги 1-го типа, инициирующие развитие провоспалительных реакций, и 2-го типа с ремоделирующей направленностью, которые могут стимулировать миграцию и инвазию опухолевых клеток за счет активации неоангиогенеза [7–9].

Известно, что HP способна активно рекрутировать макрофаги, моноциты и дендритные клетки в слизистую оболочку желудка — она заставляет их секретировать провоспалительные цитокины и хемокины, вызывая воспаление и повреждение слизистой оболочки желудка [10, 11]. В ряде исследований сообщали о влиянии HP-инфекции на поляризацию макрофагов за счет стимуляции процессов свободнорадикального окисления. По результатам ряда научных исследований установлено, что под воздействием бактериальных факторов происходит усиленная генерация активных форм кислорода и гипоксией индуцированного фактора-1 α [8, 9]. Кроме того, HP обладает способностью синтезировать большое количество индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), способствуя поляризации макрофагов по фенотипу M2, которые, в отличие от M1, обладают довольно слабой фагоцитарной активностью, что таким образом способствует дальнейшей персистенции возбудителя [12].

В настоящее время эндоскопическое исследование с прицельной биопсией является основным методом диагностики атрофического гастрита и его осложнений. Однако для HP-ассоциированного атрофического гастрита весьма характерен очаговый характер изменений, поэтому для получения правильного морфологического заключения о направленности патологического процесса необходимо обеспечить адекватное получение биоптационного материала, что в условиях амбулаторного звена нередко бывает затруднительно [13]. Вместе с тем, раннее выявление атрофии и последующих предраковых изменений (кишечной метаплазии и дисплазии) является неременным условием профилактики рака желудка. Одним из путей решения этой проблемы может служить иммуногистохимическая верификация морфологических изменений иммунных клеток слизистой оболочки желудка.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы было оценить предиктивный потенциал иммуногистохимического фенотипирования макрофагальной популяции при ранней малигнизации HP-ассоциированного хронического гастрита.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Морфологические исследования проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Молекулярная биология» Медицинской академии им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» при поддержке программы развития КФУ. Материалом для исследования послужили гастробιοпаты пациентов обоего пола в возрасте $49 \pm 7,2$ лет, разделенных на три группы: хронический неатрофический гастрит (ХНГ, $n = 10$), хронический атрофический гастрит (ХАГ, $n = 10$), тубулярная аденокарцинома желудка G1-G2, кишечный тип по Лаурен (АКЦ, $n = 10$). Критерии включения в исследуемые группы: положительный анализ на HP. Критерии исключения: отрицательный анализ на HP или отсутствие анамнестических сведений о выполнении указанного анализа. Согласно анамнестическим данным, все пациенты были HP-положительными. Верификацию HP осуществляли на основании количественного определения иммуноглобулинов класса G (IgG) к HP в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа и быстрого уреазного дыхательного теста.

Контрольную группу составили фрагменты визуально интактной слизистой желудка 10 пациентов, умерших от причин, не связанных с патологией желудочно-кишечного тракта, без гистологических признаков гастрита и не инфицированных HP.

Для проведения морфологического исследования биопсийного и секционного материала фрагменты слизистой желудка фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Проводку и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике, с последующей окраской гематоксилином и эозином [14].

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) проводили на срезах толщиной 3–4 мкм с применением двойного пероксидаза-антипероксидазного метода в соответствии с протоколами компании Thermo Scientific (CША), используя систему визуализации Leica Biosystems (Novocastra; США) и DAB Chromogen (Abcam; Великобритания) с последующим докрасиванием ядер гематоксилином. Макрофагальную популяцию визуализировали с помощью панмакрофагального/моноцитарного маркера CD68 (клон PG-M1, разведение 1:50, DAKO; Дания) и маркера типичных репаративных макрофагов 2 α фенотипа CD163 (клон EPR-19518, разведение 1 : 500, Abcam; Великобритания). Согласно данным метаанализа, именно изучение маркеров CD68 и CD163 более информативно по сравнению с исследованием другого M2 маркера — CD206 [15]. При этом CD163 может экспрессироваться как дополнительный поверхностный маркер моноцитов крови, также способных к фенотипической поляризации. Однако моноциты демонстрируют более низкий уровень экспрессии указанного маркера по сравнению с макрофагами.

Интенсивность неоангиогенеза определяли с использованием маркера эндотелия сосудов CD31 (клон 1A10, Leica Bond; США) путем оценки суммарной площади поперечного сечения сосудов.

Полученный материал анализировали при помощи светового микроскопа CX41 (Olympus; Япония).

Морфометрические исследования проводили с помощью программы Image J (NIH; США) на стандартизованной площади цифрового изображения гистологического среза. Для каждого маркера макрофагов считали клетки с позитивной цитоплазматической реакцией в 10 полях зрения при увеличении 20х/0,50 объектива UPlanFL N (Olympus; Япония) с последующим подсчетом среднего количества клеток в биоптате.

Статистический анализ проводили с применением программы STATISTICA 10.0 для Windows (StatSoft Inc.; США). Для определения нормального распределения использовали коэффициент нормальности Колмогорова–Смирнова. Определяли основные статистические характеристики: среднее (M), ошибку среднего (m). Межгрупповые сравнения морфологических показателей проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с применением критерия Даннета (Q) для сравнения малых по численности выборок с контрольной группой. Межгрупповые различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно данным серологического исследования, в группе больных с ХНГ у 33% обследуемых выявляли титр антител, равный 1 : 5, у 67% — выше 1 : 10. У пациентов с ХАГ титр антител 1 : 5 наблюдался лишь у 10% больных; у 49% обследуемых титр антител был выше 1 : 10, а остальные 41% демонстрировали высокий титр антител — от 1 : 20 до 1 : 80. У 77% пациентов с верифицированной АКЦ титр антител был равен 1 : 20 и выше, а у 23% титр антител составлял от 1 : 5 до 1 : 10.

По данным морфологического исследования, слизистая оболочка желудка в контрольной группе имела типичное строение, представленное выстилкой из цилиндрического эпителия правильной формы, образующего желудочные ямки без признаков гастрита (рис. 1А). В подслизистом слое локализовались единичные резидентные макрофаги как

первого, так и второго фенотипа (рис. 1Б, В). Сосудистый рисунок был четким, умеренно-выраженным. Сосуды были преимущественно представлены капиллярами и венулами (рис. 1Г).

При проведении обзорного окрашивания установлено, что гастробиоптаты пациентов с ХНГ характеризовались различной степенью выраженности лимфо-плазмоцитарной инфильтрации (от слабовыраженной до умеренной), а также формированием единичных гиперплазированных лимфоидных агрегатов в строме, повышенной мукоидизацией покровно-ямочного цилиндрического эпителия и фовеолярной гиперплазией. В некоторых зонах биоптатов определялись очаги гиперплазии кислотопродуцирующих желез фундального типа (рис. 2А).

По данным ИГХ-исследования биоптатов группы пациентов с ХНГ, CD68⁺-клетки были равномерно распределены в собственной пластинке слизистой желудка, около половины из них составляли моноциты/макрофаги 2-го типа. Соотношение CD163 : CD68 составило $0,67 \pm 0,02$ (рис. 2Б, В), значимо превышая значения, полученные для контрольной группы ($p < 0,05$). По мнению авторов, сдвиг индекса соотношений моноцитарно-макрофагальных популяций по сравнению с контрольной группой свидетельствует об инициации каскада противовоспалительных реакций.

Суммарная площадь поперечного сечения сосудов при ХНГ составляла $3590,92 \pm 356,27$ мкм², что свидетельствовало о статистически незначимой интенсификации неоангиогенеза по сравнению с образцами контрольной группы ($p > 0,05$). При этом варианте гастрита показатель сосудистой площади был минимальным по сравнению с группами пациентов с ХАГ и АКЦ (рис. 2Г; табл.).

Биоптаты пациентов с ХАГ также демонстрировали полиморфизм гистологических изменений. Атрофия железистого компонента была обусловлена двумя принципиально разными процессами — фиброзной

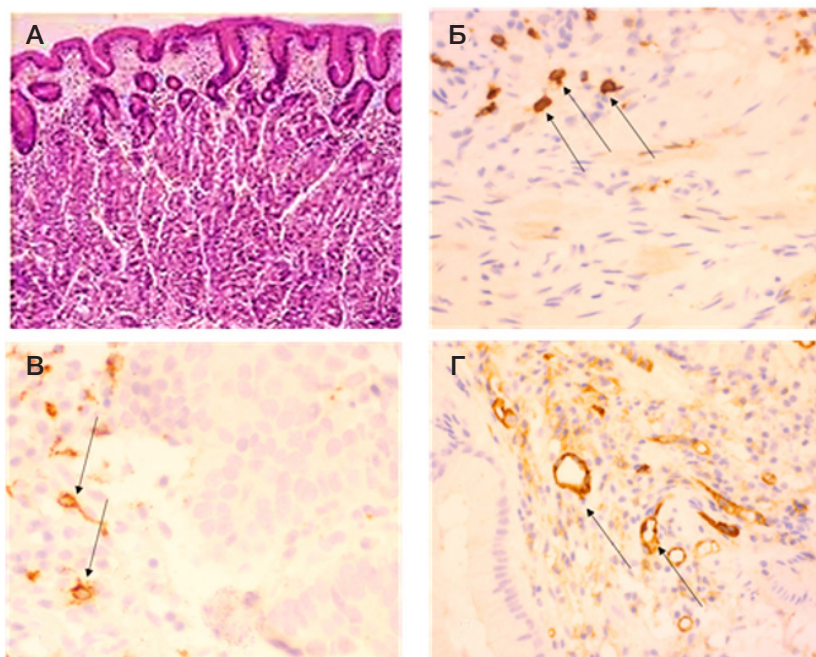


Рис. 1. Строение слизистой оболочки желудка лиц контрольной группы. **А.** Цилиндрический эпителий правильной формы, образующий желудочные ямки, окраска гематоксилином и эозином (×10). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в единичных моноцитах/макрофагах 2-го типа, ИГХ (×40). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68 в общей популяции макрофагов, ИГХ (×40). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии небольших сосудов, ИГХ (×40)

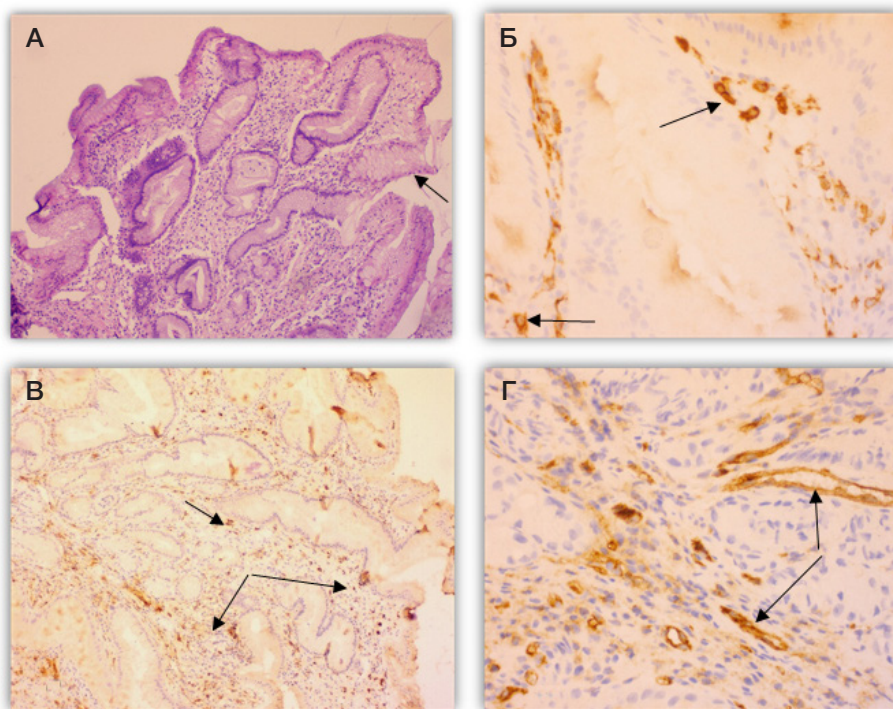


Рис. 2. Хронический неатрофический гастрит. **А.** Умеренно выраженная лимфо-плазмочитарная инфильтрация с примесью единичных лейкоцитов в собственной пластинке слизистой антрального отдела желудка, повышенная мукоидизация покровно-ямочного цилиндрического эпителия, окраска гематоксилином и эозином ($\times 10$). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в моноцитах/макрофагах 2-го типа, ИГХ, ($\times 40$). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68 в общей популяции макрофагов, ИГХ ($\times 10$). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии сосудов, ИГХ ($\times 40$)

трансформацией стромы или кишечной метаплазией (тонко-/толстокишечной либо комбинацией этих типов метаплазии). Атрофический гастрит с фиброзом собственной пластинки слизистой характеризовался выраженной лимфо-плазмочитарной инфильтрацией, зачастую с наличием лимфоидных фолликулов с расширенными герминативными центрами (рис. 3А).

Моноцитарно-макрофагальная популяция так же равномерно распределялась во всей толще биоптатов — как в области фовеолярных зон, так и вблизи лимфоидных скоплений. Большая часть клеток демонстрировала иммунофенотип моноцитов/макрофагов 2-го типа. Соотношение CD163 : CD68 составило $0,81 \pm 0,04$ (рис. 3Б, В). При этом площадь микроциркуляторного русла в биоптатах данной подгруппы значимо возрастала по сравнению с показателями как группы ХНГ, так и контрольной группы (рис. 3Г).

Морфологические и иммуногистохимические изменения в биоптатах пациентов с верифицированной тубулярной

аденокарциномой были максимально показательными с позиции функционального перепрофилирования макрофагальной популяции и интенсивности неоангиогенеза. Среди тубулярных структур с явлениями клеточной и ядерной атипии, а также участков солидного строения определялось наличие десмопластически измененной стромы с умеренным и выраженным густоклеточным воспалительным инфильтратом из лимфоидных клеток, гистиоцитов, нейтрофилов (рис. 4А).

Количество клеток моноцитарно-макрофагальной популяции увеличилось вдвое по сравнению с показателями ХАГ и вчетверо по сравнению с ХНГ. Соотношение экспрессии CD163 : CD68 составило $0,88 \pm 0,03$ (рис. 4Б, В). Площадь микроциркуляторного русла также была максимальной, значимо превышая контрольные значения (рис. 4Г), что могло свидетельствовать об интенсификации процессов неоангиогенеза в опухоли для формирования комфортного микроокружения и способствовало метастатической диссеминации опухолевых клеток [16].

Таблица. Данные ИГХ макрофагального звена и микрососудистого русла у больных хроническим гастритом и аденокарциномой

ИГХ маркер	ХНГ (n = 10)	ХАГ (n = 10)	АКЦ (n = 10)	Контрольная группа (n = 10)
CD 68 Абс., (M \pm m)	$39,9 \pm 3,12^*$ Q = 5,90 (p = 0,00243)	$62,7 \pm 3,39^*$ Q = 21,59 (p = 0,00000)	$132,4 \pm 6,71^*$ Q = 68,99 (p = 0,00000)	$31,1 \pm 4,71$
CD 163 Абс., (M \pm m)	$27,5 \pm 2,83^*$ Q = 8,69 (p = 0,00003)	$50,5 \pm 3,54^*$ Q = 24,17 (p = 0,00000)	$116,7 \pm 10,14^*$ Q = 68,47 (p = 0,00000)	$14,7 \pm 3,15$
CD 31 мкм ² , (M \pm m)	$3590,92 \pm 356,27$ Q = 2,07 (p = 0,48170)	$8647,02 \pm 359,29^*$ Q = 27,95 (p = 0,00000)	$19065,12 \pm 1042,94^*$ Q = 82,37 (p = 0,00000)	$3203,68 \pm 347,21$
CD163 : CD68	$0,67 \pm 0,02^*$ Q = 13,97 (p = 0,00000)	$0,81 \pm 0,04^*$ Q = 23,75 (p = 0,00000)	$0,88 \pm 0,03^*$ Q = 28,64 (p = 0,00000)	$0,47 \pm 0,07$

Примечание: * — значимое различие с контрольной группой, p \leq 0,05.

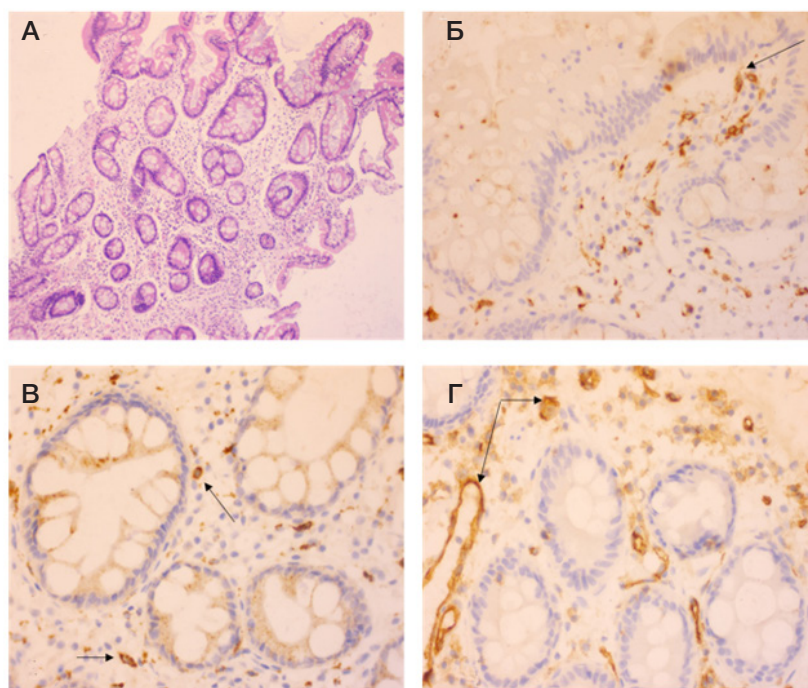


Рис. 3. Умеренно выраженный хронический слабоактивный атрофический метапластический гастрит. **А.** Толстокишечная метаплазия, окраска гематоксилином и эозином (×10). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в моноцитах/макрофагах 2-го типа в собственной пластинке слизистой, ИГХ (×40). **В.** Позитивная цитоплазматическая экспрессия маркера CD68 в макрофагах собственной пластинки слизистой, ИГХ (×40). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии сосудов, ИГХ (×40)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известные на сегодняшний день молекулярные биомаркеры моноцитов/макрофагов демонстрируют довольно широкие диагностические возможности и могут служить предикторами риска малигнизации за счет специфического выявления той или иной субпопуляции иммунных клеток, что позволяет спрогнозировать течение ряда заболеваний. Доказано, что за счет различных

фенотипов макрофаги могут играть двоякую роль в воспалительных процессах в зависимости от сигналов их микроокружения [17].

Хронический *HP*-ассоциированный гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции клеток моноцитарно-макрофагального ряда, поскольку известно, что *HP* активно стимулирует запуск цитокинового каскада, который играет основную роль в реализации хронических воспалительных и деструктивных

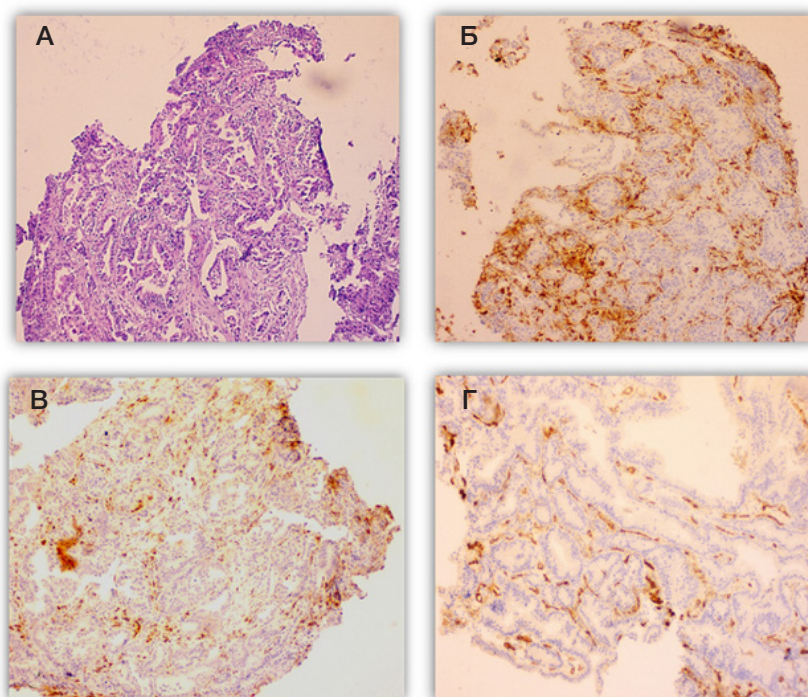


Рис. 4. Аденокарциномы. **А.** Тубулярная аденокарцинома с изъязвлением, окраска гематоксилином и эозином (×10). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163, ИГХ (×100). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68, ИГХ (×100). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31, ИГХ (×200)

процессов в слизистой оболочке желудка [4]. Во время острой воспалительной реакции макрофаги обычно поляризуются по M1 фенотипу интерфероном- γ и микробными продуктами, такими как липополисахарид, и оказывают мощное антимикробное действие за счет выработки бактерицидных компонентов (оксида азота и кислородных радикалов) [9]. Однако данная бактерия способна ингибировать действие активных веществ макрофагов за счет их нейтрализации каталазой и супероксиддисмутазой, что способствует ее выживанию. При этом активные формы кислорода, в избытке вырабатываемые макрофагами, приводят к гибели собственных клеток слизистой оболочки желудка, что увеличивает риск развития атрофии [18].

Согласно данным проведенного исследования, атрофический гастрит сопровождается векторным перераспределением моноцитов/макрофагов во 2-й функциональный тип. Макрофаги M2 индуцируются Т-хелперами 2-го типа или противовоспалительными цитокинами и факторами роста, включая IL4, IL10 [6]. Очевидно, сдвиг поляризации моноцитов/макрофагов в сторону M2 по мере прогрессирования воспаления должен обеспечивать регенерацию тканей и усиливать гуморальный ответ. Однако длительная усиленная выработка факторов патогенности *HP* может приводить к снижению способности макрофагов элиминировать бактериальные антигены, что приводит к длительной персистенции патогена и хронизации воспаления [19, 20]. С другой стороны, хроническое воспаление с персистирующей поляризацией моноцитов/макрофагов M2 ассоциировано с повышенным риском развития рака желудка [1, 13, 21].

Таким образом, в ходе настоящего исследования наблюдалось динамическое увеличение панмакрофагальной популяции, с прогрессирующим перепрофилированием макрофагов во 2-й функциональный тип по мере трансформации хронического неатрофического гастрита в атрофический и пиковыми значениями в биоптатах с аденокарциномой желудка. По нашему мнению, такие изменения связаны с ремоделирующей функциональной активностью альтернативно активированных моноцитов/макрофагов M2 за счет повышенной экспрессии проангиогенных факторов роста, что способствует, с одной стороны, фиброзной трансформации стромы желудка в условиях прогрессирующего хронического воспаления и тканевой гипоксии, а с другой — создает комфортное микроокружение для диспластических и неопластических

изменений эпителия железистого компонента [11, 22]. Кроме того, известно, что определенные популяции M2 макрофагов обладают выраженными опухолевыми функциями, поскольку участвуют в локальной иммуносупрессии иммунокомпетентных клеток, приводя к ускользанию опухолевых клеток из-под иммунного надзора [23].

Многообразие фенотипов моноцитов/макрофагов требует дальнейшего изучения и стандартизации их предикторного потенциала. Для этого необходимо провести исследования на более объемных выборках пациентов, а также оценить другие макрофагальные маркеры, характерные для клеток моноцитарно-макрофагального ряда. В частности, помимо основных поверхностных маркеров CD1 и CD16 моноциты способны экспрессировать дополнительные поверхностные маркеры CD163, CD204, что может быть выявлено путем двойного иммуноокрашивания [24]. Кроме того, несмотря на общепринятое разделение макрофагов на классические и альтернативные, были описаны другие подтипы макрофагов, включая профиброзные M2-подобные макрофаги, которые продуцируют факторы роста, и фибролитические M2-подобные макрофаги, индуцированные ишемией, которые секретируют протеазы [12].

В целом, выявление механизмов функционального программирования ОАМ позволит выявить мишени для терапевтического воздействия и разработать новые основанные на сочетании химиопрепаратов и иммуномодулирующих агентов подходы в лечении онкологических больных, направленные на активацию иммунного ответа на опухоль [13]. Синергическое действие этих модальностей может существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии.

ВЫВОДЫ

Хронический *H. pylori*-ассоциированный гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции макрофагов по мере нарастания атрофических и неопластических процессов. Атрофический гастрит и аденокарцинома сопровождаются векторным перераспределением макрофагов во 2-й функциональный тип. Усиленная экспрессия моноцитарно-макрофагального маркера CD163 может служить одним из предикторов малигнизации хронического гастрита в комплексе с гистологической оценкой степени атрофии и метаплазии эпителия железистого компонента.

Литература

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (2): 69–90.
2. Massarrat S, Stolte M. Development of gastric cancer and its prevention. *Arch Iran Med.* 2014; 17 (7): 514–20.
3. Cover TL. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. *MBio.* 2016; 7: e01869–915.
4. Mentis AA, Dardiotis E. *Helicobacter pylori* eradication for metachronous gastric cancer: an unsuitable methodology impeding broader clinical usage. *Front Oncol.* 2019 Feb 20; 9: 90. DOI: 10.3389/fonc.2019.00090.
5. Mentis AA, Boziki M, Grigoriadis N, Papavassiliou AG. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76: 2477–86.
6. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010; 11: 889.
7. Kim J, Bae J-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm.* 2016; 6058147.
8. Niu Z, Shi Q, Zhang W, et al. Caspase-1 cleaves PPAR (for potentiating the pro-tumor action of TAMs. *Nat Commun.* 2017; 8: 766.
9. Lu Y, Rong J, Lai Y, Tao L, Yuan X, Shu X. The degree of *Helicobacter pylori* infection affects the state of macrophage polarization through crosstalk between ROS and HIF-1 α . *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020: 5281795.
10. Quiding-Järbrink M, Raghavan S, Sundquist M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One.* 2010; 5 (11):

- p.e15018. DOI: 10.1371/journal.pone.0015018.
11. Li W, Zhang X, Wu F, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and Emt in gastric cancer. *Cell Death & Disease*. 2019; 10 (12): 918. DOI: 10.1038/s41419-019-2131-y.
 12. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (6): 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801.
 13. Song JH, Kim SG, Jin EH, Lim JH, Yang SY. Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy. *Gut Liver*. 2017; 11: 612–19.
 14. Янин В. Л., Бондаренко О. М., Сазонова Н. А. Методы исследования в цитологии и гистологии. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015; 65 с.
 15. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer*. 2019 Jul 23; 10 (19): 4463–72. DOI: 10.7150/jca.33914.
 16. Kloepper J, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 4476–81.
 17. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79 (1): 541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
 18. Wang YH, Lv ZF, Zhong Y, Liu DS, Chen SP, Xie Y. The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. *Helicobacter*. 2017; 22 (1). DOI: 10.1111/hel.12324.
 19. Ihrig M, Whary MT, Dangler CA, Fox JG. Gastric helicobacter infection induces a Th2 phenotype but does not elevate serum cholesterol in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 2005; 73: 1664–70.
 20. Kaparakis M, Waldock AK, Price JD, Pedersen JS, van Rooijen N, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2008; 76: 2235–9.
 21. Liu LP, Sheng XP, Shuai TK, Zhao YX, Li B, Li YM. *Helicobacter pylori* promotes invasion and metastasis of gastric cancer by enhancing heparanase expression. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (40): 4565–77. DOI: 10.3748/wjg.v24.i40.4565.
 22. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G, et al. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J*. 2017; 32: 969–78.
 23. Cortese N, Donadon M, Rigamonti A, Marchesi F. Macrophages at the crossroads of anticancer strategies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Jun 1; 24: 1271–83.
 24. Kzyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43 (2): 66–77. DOI: 10.1159/000444943.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61 (2): 69–90.
2. Massarrat S, Stolte M. Development of gastric cancer and its prevention. *Arch Iran Med*. 2014; 17 (7): 514–20.
3. Cover TL. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. *MBio*. 2016; 7: e01869–915.
4. Mentis AA, Dardiotis E. *Helicobacter pylori* eradication for metachronous gastric cancer: an unsuitable methodology impeding broader clinical usage. *Front Oncol*. 2019 Feb 20; 9: 90. DOI: 10.3389/fonc.2019.00090.
5. Mentis AA, Boziki M, Grigoriadis N, Papavassiliou AG. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76: 2477–86.
6. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; 11: 889.
7. Kim J, Bae J-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016; 6058147.
8. Niu Z, Shi Q, Zhang W, et al. Caspase-1 cleaves PPAR (for potentiating the pro-tumor action of TAMs. *Nat Commun*. 2017; 8: 766.
9. Lu Y, Rong J, Lai Y, Tao L, Yuan X, Shu X. The degree of *Helicobacter pylori* infection affects the state of macrophage polarization through crosstalk between ROS and HIF-1 α . *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020: 5281795.
10. Quiding-Järbrink M, Raghavan S, Sundquist M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One*. 2010; 5 (11): p.e15018. DOI: 10.1371/journal.pone.0015018.
11. Li W, Zhang X, Wu F, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and Emt in gastric cancer. *Cell Death & Disease*. 2019; 10 (12): 918. DOI: 10.1038/s41419-019-2131-y.
12. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (6): 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801.
13. Song JH, Kim SG, Jin EH, Lim JH, Yang SY. Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy. *Gut Liver*. 2017; 11: 612–19.
14. Janin VL, Bondarenko OM, Sazonova NA. Методы исследования в цитологии и гистологии. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015; 65 с. Russian.
15. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer*. 2019 Jul 23; 10 (19): 4463–72. DOI: 10.7150/jca.33914.
16. Kloepper J, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 4476–81.
17. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79 (1): 541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
18. Wang YH, Lv ZF, Zhong Y, Liu DS, Chen SP, Xie Y. The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. *Helicobacter*. 2017; 22 (1). DOI: 10.1111/hel.12324.
19. Ihrig M, Whary MT, Dangler CA, Fox JG. Gastric helicobacter infection induces a Th2 phenotype but does not elevate serum cholesterol in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 2005; 73: 1664–70.
20. Kaparakis M, Waldock AK, Price JD, Pedersen JS, van Rooijen N, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2008; 76: 2235–9.
21. Liu LP, Sheng XP, Shuai TK, Zhao YX, Li B, Li YM. *Helicobacter pylori* promotes invasion and metastasis of gastric cancer by enhancing heparanase expression. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (40): 4565–77. DOI: 10.3748/wjg.v24.i40.4565.
22. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G, et al. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J*. 2017; 32: 969–78.
23. Cortese N, Donadon M, Rigamonti A, Marchesi F. Macrophages at the crossroads of anticancer strategies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Jun 1; 24: 1271–83.
24. Kzyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43 (2): 66–77. DOI: 10.1159/000444943.

МИКРОБИОТА ЭЯКУЛЯТА У ПАЦИЕНТОВ С НОРМОЗООСПЕРМИЕЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

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

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

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

⁴ Институт математики и механики имени Н. Н. Красовского, Екатеринбург, Россия

⁵ Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

Оценка микробиоты эякулята осложнена из-за отсутствия четких критериев для интерпретации микробиологических тестов. Целью работы было определить устойчивые варианты микробиоты, исследованной методом ПЦР-РВ, в образцах эякулята с нормозооспермией. В исследование включили 227 проб эякулята, отвечающих критериям нормозооспермии. В 107 (41,7%) образцах фиксировали наличие суммарной бактериальной ДНК и хотя бы одной из исследованных групп микроорганизмов в значениях не менее 10^3 ГЭ/мл. В данных образцах выделили четыре устойчивых кластера микробиоты, характеризующихся преобладанием определенной группы микроорганизмов: облигатных анаэробов (кластер 1; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 81,1%), *Lactobacillus spp.* (кластер 2; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 64,3%) грамположительных факультативных анаэробов (кластер 3; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 92,5%), *Enterobacteriaceae/Enterococcus* (кластер 4; доля преобладающих микроорганизмов в центроиде — 80,8%). Кластеры ранжированы по частоте встречаемости: кластер 1 (43 (40,2%)), кластер 3 (27 (25,2%)), кластер 2 (22 (20,6%)), кластер 4 (15 (14,0%)).

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

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

Вклад авторов: Е. С. Ворошилина — планирование эксперимента, проведение ПЦР-РВ, анализ данных, написание статьи; Д. Л. Зорников — анализ литературы, анализ данных, написание статьи; А. В. Иванов — статистическая обработка, кластерный анализ, написание статьи; Д. Г. Почерников — отбор пациентов, написание статьи; Е. А. Паначева — отбор пациентов, выполнение спермограмм и ПЦР-РВ, анализ литературы, анализ данных, написание статьи.

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

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина
ул. Репина, д. 3, г. Екатеринбург, 620028, Россия; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 16.09.2021 **Статья принята к печати:** 06.10.2021 **Опубликована онлайн:** 28.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.048

MICROBIOTA OF SEMEN SAMPLES WITH NORMOZOOSPERMIA: ANALYSIS OF REAL-TIME PCR DATA

Voroshilina ES^{1,2}✉, Zornikov DL¹, Ivanov AV^{3,4}, Pochernikov DG⁵, Panacheva EA^{1,2}

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

³ Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

⁴ Institute of Mathematics and Mechanics, Yekaterinburg, Russia

⁵ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia

The analysis of semen microbiota is difficult due to the lack of established criteria for interpretation of microbiological tests. The aim of the study was to determine the stable clusters of semen microbiota analyzed by real-time PCR in samples with normozoospermia. Semen samples of 227 men with normal spermograms were included in the study. The quantity of total bacterial DNA and at least one group of microorganisms was more than 10^3 GE/ml in 107 (41.7%) samples. Four stable microbiota clusters with the prevalence of a specific microorganism group were distinguished in these samples: obligate anaerobes (OA) cluster (proportion in the centroid — 81.1%); *Lactobacillus spp.* cluster (proportion in the centroid — 64.3%); gram-positive facultative anaerobes (GPFA) cluster (proportion in the centroid — 92.5%); *Enterobacteriaceae/Enterococcus* (EE) cluster (proportion in the centroid — 80.8%). The clusters were ranked by frequency of occurrence: OA cluster was the most prevalent (43 (40.2%) of 107), second-most frequent were GPFA-cluster (27 (25.2%)) and *Lactobacillus*-cluster (22 (20.6%)). EE-dominated cluster was found in 15 (14.0%) cases.

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

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

Author contribution: Voroshilina ES — organization of the study, data analysis, writing the article; Zornikov DL — data analysis, writing the article; Ivanov AV — statistical processing, data analysis, writing the article; Pochernikov DG — patient selection, writing the article; Panacheva EA — literature review, data analysis, patient selection, conducting semen analyses and PCR tests, writing the article.

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

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Voroshilina
Repina, 3, Yekaterinburg, 620014, Russia; voroshilina@gmail.com

Received: 16.09.2021 **Accepted:** 06.10.2021 **Published online:** 28.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.048

Микробиота эякулята остается малоисследованной частью микробиома человека, несмотря на серьезный интерес к данному биоматериалу в контексте борьбы с бесплодием и возможности современных молекулярных технологий [1]. Мужской фактор является причиной бесплодия у половины пар [2], однако причина infertilityности у мужчин часто остается неустановленной [3]. Наличием инфекции удается объяснить до 6–10% случаев мужского бесплодия [4]. Было показано, что некоторые бактерии могут оказывать прямое повреждающее действие на сперматозоиды, снижая их подвижность и жизнеспособность [5].

Использование молекулярно-генетических методов, прежде всего NGS, позволило установить присутствие сложных бактериальных сообществ не только в эякуляте пациентов с инфекционно-воспалительными процессами, но и у здоровых мужчин с нормозооспермией [1, 6–10]. Часть обнаруживаемых микроорганизмов (МО) являлись трудно- или некультивируемыми (включая облигатно анаэробных бактерий) [8, 10, 11], чем можно объяснить получение большего количества положительных образцов, чем при использовании культурального исследования. Однако обнаружение МО в семенной жидкости пациентов с нормозооспермией заставило отказаться от представлений о бактериоспермии как маркере исключительно патологического состояния [6, 7, 9]. Вместо этого были выдвинуты осторожные предположения о наличии взаимосвязи состава микробиоты эякулята и отклонений в спермограмме [6, 9].

Результаты немногочисленных исследований микробиоты эякулята от пациентов с нормозооспермией были получены на ограниченном числе образцов, что не позволило сформулировать четкие представления о норме для данного биологического материала [1]. Кроме того, использованный в этих исследованиях метод NGS-секвенирования имеет ряд объективных недостатков, препятствующих его внедрению в практическое здравоохранение: высокую стоимость и трудоемкость, сложность стандартизации процедуры и интерпретации полученных результатов.

С практической точки зрения более перспективен для рутинного исследования микробиоты эякулята другой молекулярно-генетический метод — ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ). Появление зарегистрированного теста для оценки микробиоты урогенитального тракта у мужчин открыло новые возможности для выявления в эякуляте широкого спектра патогенных и условно-патогенных МО, включая трудно и некультивируемые бактерии, а также *Lactobacillus spp.* [12, 13], которые традиционно считают обитателями женского репродуктивного тракта. Доступность этого инструмента ставит вопрос о корректной интерпретации полученных с его помощью результатов. Присутствие множества групп бактерий в различных комбинациях и количествах потребовало обращения к методам математического моделирования для выявления закономерностей формирования микробиоты эякулята. Применение кластерного анализа позволило свести все многообразие выявленных сочетаний МО к четырем устойчивым типам микробных сообществ, отличающихся преобладанием разных групп бактерий [12]. Для понимания клинической значимости обнаружения различных вариантов микробиоты необходим анализ частоты их выявления и особенностей микробного состава в образцах, соответствующих критериям нормозооспермии и имеющих признаки патологии.

Целью исследования стало определение устойчивых вариантов микробиоты, исследованной методом ПЦР-РВ, в образцах эякулята с нормозооспермией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы обследованных пациентов

В исследование включили 227 образцов эякулята с нормозооспермией, полученные от мужчин (возраст — 20–59, средний возраст — $33 \pm 4,7$ года), которые в период с января 2019 г. по март 2020 г. обратились в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург, $n = 142$) и в урологическую клинику Ивановской государственной медицинской академии (г. Иваново, $n = 85$) для прегравидарной подготовки.

Критерии включения пациентов в исследование: отсутствие приема антибактериальных и гормональных препаратов в течение последних четырех недель, нормозооспермия по результатам исследования спермограмм.

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

У всех пациентов были получены образцы эякулята в соответствии с ниже описанными правилами, проведена оценка параметров спермограммы и состава микробиоты эякулята.

Техника получения эякулята

Подготовку пациентов и отбор материала проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по сбору эякулята для микробиологических исследований (пункт 2.2.4 Руководства ВОЗ). Обязательным условием было половое воздержание в течение 2–5 дней. Сбор эякулята осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер после предварительного мочеиспускания и туалета наружных половых органов [14].

Оценка параметров спермограммы

Анализ эякулята проводили после 30–60-минутного разжижения материала, подсчет количества (концентрации) и подвижности сперматозоидов — с помощью сперманализатора Biola SCA («Биола»; Россия). Морфологию сперматозоидов оценивали в окрашенных препаратах при увеличении микроскопа $\times 1000$ с помощью диагностического набора «Spermastain» (Ferti Pro; Бельгия).

Полученные данные интерпретировали в соответствии с критериями ВОЗ [14].

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор ПРОБА-НК-ПЛУС («ДНК-Технология»; Россия). Образцы эякулята подвергали предварительной обработке по следующей методике: 1,0 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1,0 мл транспортной среды («Транспортная среда с муколитиком»; «ИнтерЛабСервис», Россия), встряхивали

на приборе «Vortex» до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13 000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге Mini-Spin (Eppendorf; Германия). После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК.

Оценка микробиоты эякулята

Исследование проводили с использованием набора реагентов «Андрофлор» в детектирующем амплификаторе ДТпрайм (все производства «ДНК-Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения проводили автоматический расчет количества общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл и каждого из условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в представленном образце (выражали в геном-эквивалентах на мл (ГЭ/мл)). Спектр МО, определяемых набором, представлен следующими группами: грамположительные факультативно-анаэробные МО (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp.); грамотрицательные факультативно-анаэробные МО (*Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp. / *Burkholderia* spp.); группа *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus* spp.; облигатно-анаэробные микроорганизмы (*Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp., *Atopobium cluster*); микоплазмы (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma* spp.); группа *Lactobacillus* spp.; грибы рода *Candida*.

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

Статистические методы

Анализ структурных особенностей микробиоты эякулята проводили с использованием модели кластеризации MSSC, минимизирующей сумму по всем кластерам внутрикластерных сумм квадратов расстояний от элементов кластеров до их центроидов [15]. Решение задачи кластеризации проводили с использованием алгоритма *k-means++* [16], реализованного в библиотеке машинного обучения *scikit-learn*. Выбор оптимальной кластеризации проводили на основе внутренних оценок качества кластеризации: индекса силуэта [17] и индекса Дэвиса–Болдина [18].

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

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

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

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

Для оптимальной кластеризации исследовали устойчивость кластеров к изменению размера выборки. С этой целью кластеризовали случайные подвыборки объемом от 1 до 100% от исходной выборки и рассчитывали индекс устойчивости кластеров по следующей формуле:

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

где $1_{\{true\}}: \{true, false\} \rightarrow \{0, 1\}$ — индикаторная функция логического аргумента; $A(x)$, $A'(x)$ — метка кластера наблюдения x , полученного в результате кластеризации на основе исходного набора данных и подвыборки, соответственно; $k = \{1, 2, 3, 4\}$, $l = \{1, 2, 3, 4\}$ — метки кластеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальная ДНК (ОБМ) отсутствовала или определена в количестве менее 10^3 ГЭ/мл в 81 (35,7%) образце эякулята. В 39 (17,1%) образцах ОБМ составила более 10^3 ГЭ/мл, однако число всех определяемых групп МО было ниже установленного порога.

В 107 (47,1%) из 227 образцах ОБМ составляла не менее 10^3 ГЭ/мл (медиана — $10^{3,8}$, межквартильный размах — $10^{3,5}$ – $10^{4,4}$ ГЭ/мл) и одновременно выявлено от 1 до 14 групп МО в надпороговых значениях. Частота встречаемости отдельных групп МО в надпороговых значениях представлена в табл. 1.

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

Кластерный анализ микробиоты эякулята

Для проведения кластерного анализа отобрали 107 проб, отвечающие следующим критериям: ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл, как минимум одна группа МО не менее 10^3 ГЭ/мл.

Определение оптимального количества кластеров в исследуемом наборе данных проводили на основе значений индексов силуэта и Дэвиса–Болдина (табл. 2). Наилучшему качеству кластеризации соответствуют наибольшее значение индекса силуэта и наименьшее значение индекса Дэвиса–Болдина. В соответствии с полученными значениями индексов оптимальным было выделение 4, 9 или 10 кластеров. Однако при проверке устойчивости кластеры, полученные в результате 9- и 10-кластеризации, демонстрировали меньшую устойчивость в сравнении с таковыми, полученными в результате 4-кластеризации.

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп МО в надпороговых значениях ($n = 227$)*

Группы микроорганизмов	n	%
<i>Corynebacterium spp.</i>	39	17,2
<i>Streptococcus spp.</i>	30	13,2
<i>Bacteroides spp.</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> / <i>Prevotella spp.</i>	28	12,3
<i>Peptostreptococcus spp.</i> / <i>Parvimonas spp.</i>	28	12,3
<i>Lactobacillus spp.</i>	26	11,5
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	24	10,6
<i>Eubacterium spp.</i>	22	9,7
<i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i>	22	9,7
<i>Ureaplasma parvum</i>	20	8,8
<i>Atopobium cluster</i>	18	7,9
<i>Gardnerella vaginalis</i>	17	7,5
<i>Staphylococcus spp.</i>	17	7,5
<i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i>	13	5,7
<i>Haemophilus spp.</i>	12	5,3
<i>Anaerococcus spp.</i>	10	4,4
<i>Mycoplasma hominis</i>	10	4,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia spp.</i> / <i>Burkholderia spp.</i>	8	3,5
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	8	3,5

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

На основании этого было принято решение выделять 4 основных кластера микробиоты эякулята.

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

Кластер 1 — вариант с преобладанием ОА. СОБМ составила $10^{4,3}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество всех ОА было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{4,2}$ ГЭ/мл (рис. 1А). Доля ОА в центроиде достигала 81,1% относительно СОБМ. Выделить преобладающую группу ОА из числа определяемых с помощью теста не удалось: как правило, в образцах присутствовало сразу несколько групп ОА одновременно. Данный вариант микробиоты определили в 43 (40,2%) из 107 образцов.

Кластер 2 — вариант с преобладанием *Lactobacillus spp.*, выявили в 22 (20,6%) из 107 образцов. СОБМ составила $10^{4,0}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество *Lactobacillus spp.* было ниже количества СОБМ и в центроиде и составило $10^{3,5}$ ГЭ/мл (рис. 1Б). Доля *Lactobacillus spp.* в центроиде — 64,3% относительно СОБМ. Одновременно с *Lactobacillus spp.* присутствовали представители ОА, ГПФА и ГОФА.

Кластер 3 — вариант с преобладанием ГПФА. СОБМ составила $10^{3,7}$ ГЭ/мл в центроиде. В образцах, отнесенных к данному кластеру, абсолютное количество ГПФА было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{3,7}$ ГЭ/мл (рис. 1В). Доля ГПФА в центроиде достигала 92,5% относительно СОБМ. Данный кластер у пациентов с нормозооспермией чаще формировался вокруг *Corynebacterium spp.* и *Streptococcus spp.* Этот вариант микробиоты эякулята идентифицировали в 27 (25,2%) из 107 образцов.

Кластер 4 — вариант с преобладанием группы ЕЕ. СОБМ составила $10^{4,2}$ ГЭ/мл в центроиде. Абсолютное количество всех ЕЕ было сопоставимо с СОБМ и составило в центроиде $10^{4,1}$ ГЭ/мл (рис. 1Г). Доля ЕЕ в центроиде — 80,8% относительно СОБМ. Данный вариант микробиоты эякулята определили в 15 (14,0%) из 107 образцов.

Анализ устойчивости микробных кластеров

Для исследования устойчивости выделенных кластеров генерировали подвыборки объемом 1–100% от исходной выборки (1000 случайных подвыборок без возврата на каждое значение объема).

Таблица 2. Значения показателей качества кластеризации при разном числе кластеров

Число кластеров	Индекс силуэта	Индекс Дэвиса–Болдина
2	0,19	1,68
3	0,25	1,73
4	0,32	1,30
5	0,30	1,42
6	0,32	1,34
7	0,32	1,27
8	0,32	1,28
9	0,34	1,17
10	0,34	1,24

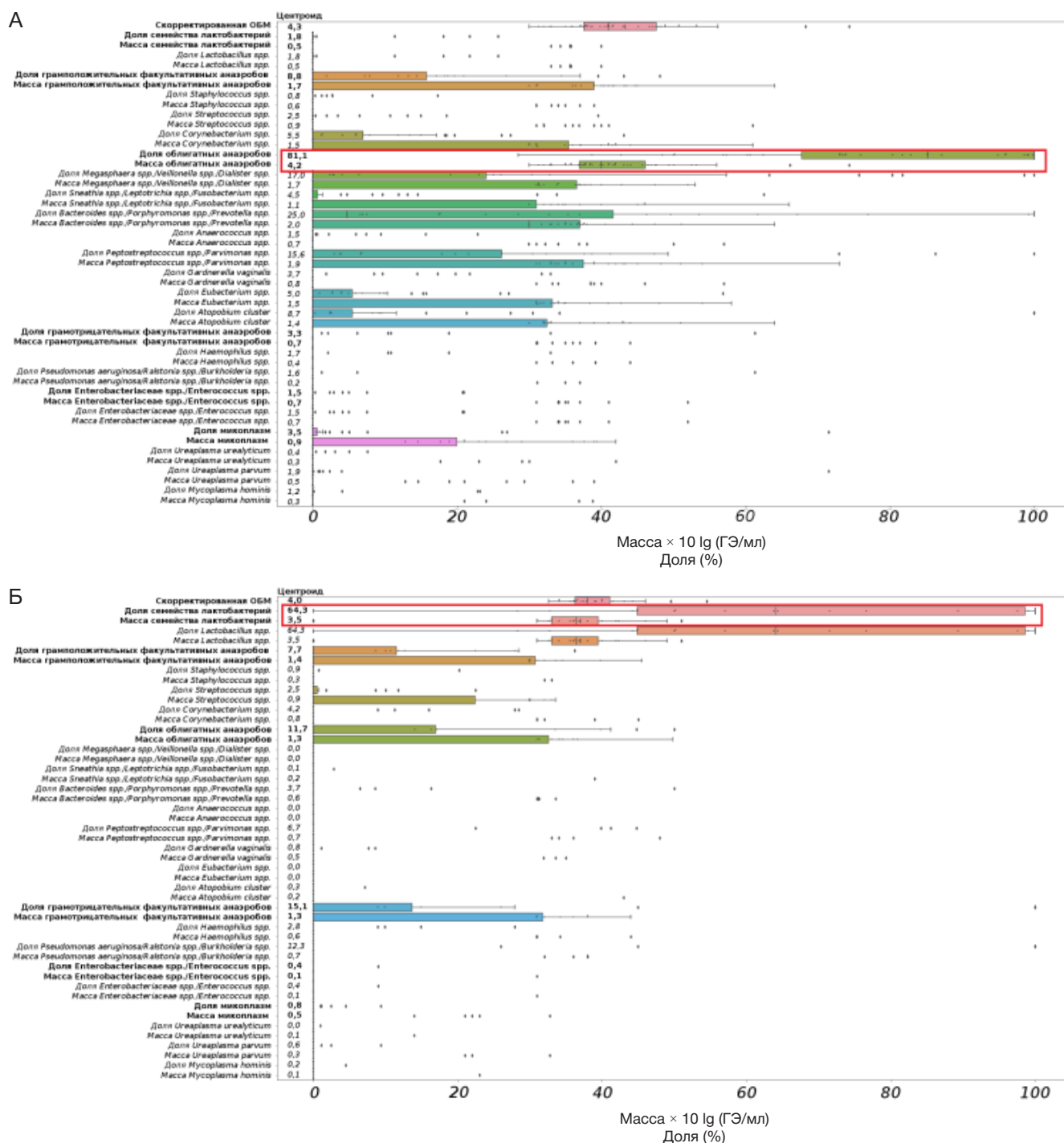


Рис. 1. Результаты кластерного анализа микробиоты эякулята, исследованного методом ПЦР-РВ ($n = 107$). По оси ординат представлены значения признаков в центриде. Красными прямоугольниками обведены диаграммы размаха преобладающих групп микроорганизмов. Для кластера 1 ($n = 43$) характерно преобладание облигатных анаэробов (**А**), для кластера 2 ($n = 22$) — *Lactobacillus* spp. (**Б**), для кластера 3 ($n = 27$) — грамположительных факультативных анаэробов (**В**), для кластера 4 ($n = 15$) — *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. (**Г**).

На рис. 2 представлены графики устойчивости кластеров, полученных на основе 4-кластеризации микробиоты образцов эякулята, соответствовавших критериям нормозооспермии. Наиболее устойчивыми оказались кластеры с преобладанием ГПФА (кластер 3; рис. 2В) и преобладанием ЕЕ (кластер 4; рис. 2Г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования микробную ДНК в надпороговых значениях (не менее 10^3 ГЭ/мл) обнаружили в 146 (64,3%) из 227 образцов эякулята, отвечающих

критериям нормозооспермии. В 81 (35,7%) образце бактериальная ДНК отсутствовала или определялась в количестве менее 10^3 ГЭ/мл и вполне могла быть китомной ДНК (микробной ДНК, присутствующей в наборах реагентов) [19]. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, отмечавших присутствие МО в эякуляте мужчин с нормальными показателями спермограммы [1, 6–8, 20]. В 107 (47,1%) пробах с ОБМ не менее 10^3 ГЭ/мл обнаружили до 14 групп МО в надпороговых значениях, что тоже согласуется с ранее полученными данными о наличии в семенной жидкости здоровых мужчин полимикробных ассоциаций [1, 8, 20].

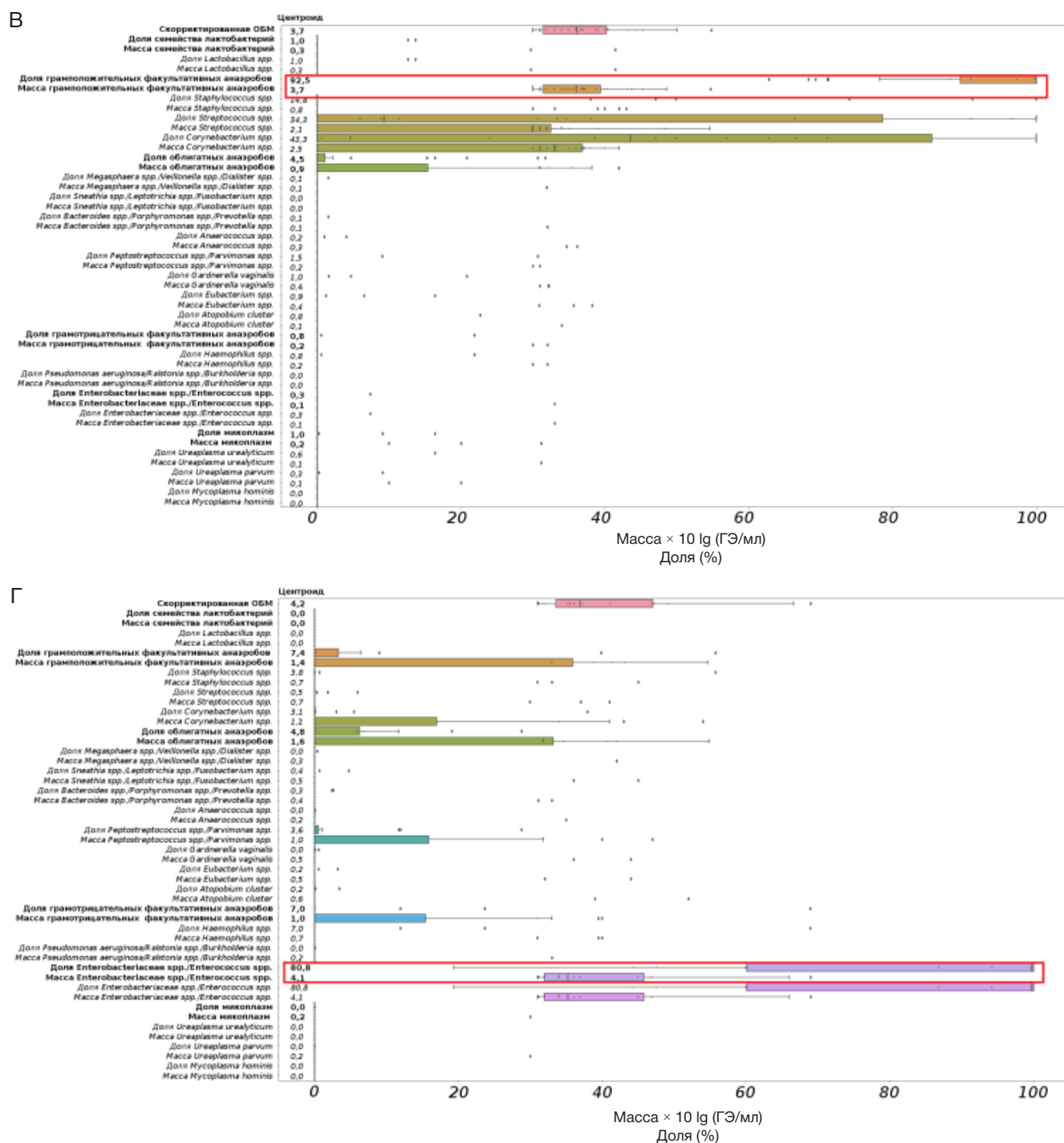


Рис. 1. (продолжение)

Бактерии рода *Corynebacterium* идентифицировали в 17,2% исследованных образцов — чаще, чем остальные группы МО. *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.*, *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* присутствовали в 10,6–13,2% проб. Остальные исследованные группы МО были обнаружены в 3,5–9,7% проб. Одновременное выявление множества групп МО в различных сочетаниях делает невозможным интерпретацию полученных результатов без применения дополнительного математического анализа.

Положительные образцы в зависимости от преобладающей группы МО были сгруппированы в четыре кластера, аналогичные полученным при исследовании

всех типов эякулята [21]: варианты с преобладанием ОА, *Lactobacillus spp.*, ГПФА, ЕЕ. При этом последние два кластера более устойчивы, чем первые два. Примечательно, что выделенные исключительно математически кластеры образованы МО со схожими физиологическими свойствами. В частности три из четырех выделенных кластеров (с преобладанием ОА, ГПФА, ЕЕ) сформированы филогенетически гетерогенными МО с одинаковой потребностью в кислороде, что также было отмечено в других исследованиях [1]. По всей видимости, данный феномен обусловлен наличием различных экологических ниш для колонизирующих эякулят МО, что неудивительно, поскольку эякулят представляет собой смесь биоматериалов из разных отделов урогенитального тракта [6].

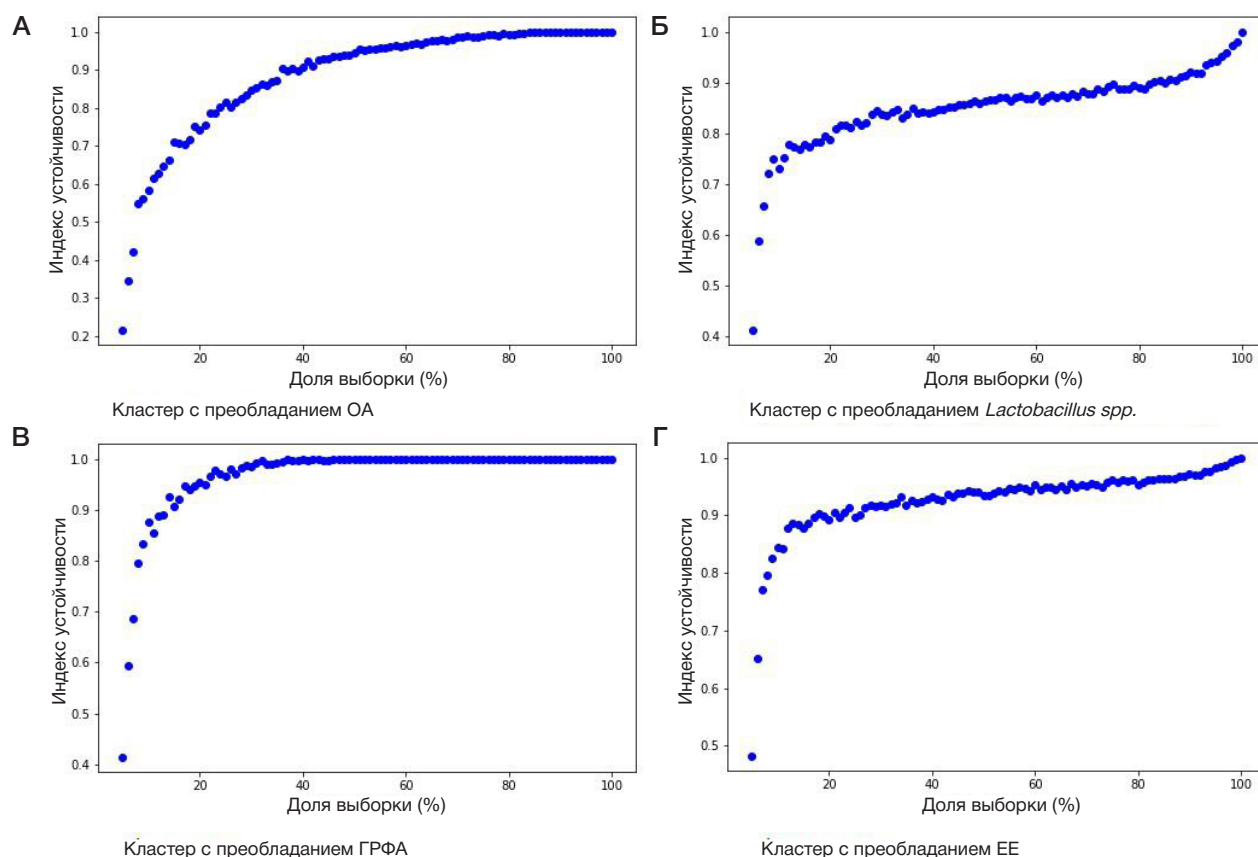


Рис. 2. Результаты исследования устойчивости кластера 1 (А), кластера 2 (Б), кластера 3 (В), кластера 4 (Г). Синим показан индекс устойчивости кластера на множестве объема f ; EE — *Enterobacteriaceae* spp./*Enterococcus* spp., ГПФА — грамположительные факультативные анаэробы, ОА — облигатные анаэробы

Большинство положительных проб (40,2%) было отнесено к кластеру с преобладанием ОА; их доля в центроиде достигала 81,1% от всех выявляемых МО. Микробиота в этих образцах отличалась значительной гетерогенностью в пределах группы ОА без доминирования какого-либо вида. Подобный кластер, состоящий из облигатно анаэробных бактерий, был выделен в работе авторов, исследовавших микробиоту эякулята методом NGS-секвенирования [1]. Стоит отметить, что при использовании рутинного культурального исследования образцов эякулята с преобладанием ОА последние как преобладающая группа МО были идентифицированы только в 15% случаев [12].

Четверть образцов (25,2%) были отнесены к кластеру с преобладанием ГПФА. Именно этот вариант микробиоты ранее описывали как характерный для урогенитального тракта клинически здоровых мужчин [4]. В том числе в сперме мужчин без признаков инфекций, передающихся половым путем, культуральным методом обнаруживали бактерии родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Corynebacterium* (отнесенные к группе ГПФА) [22]. Однако факт выделения ГПФА из эякулята не всегда означает, что данная группа МО преобладает в данном биоматериале [12]. Применение современных молекулярно-генетических технологий позволяет также выявить трудно культивируемые и некультивируемые МО, что уточняет представление о вкладе данной группы МО в формирование микробиоты эякулята.

Несколько меньшее число проб эякулята (20,6%) было отнесено к кластеру с преобладанием *Lactobacillus* spp. Роль бактерий рода *Lactobacillus*, основных представителей нормальной микробиоты женского репродуктивного тракта, в составе микробиоты эякулята не настолько

очевидна. Одни авторы отмечают наличие лактобацилл в образцах эякулята при нормозооспермии и ассоциируют это с мужской фертильностью [8, 9]. Другие исследователи полагают, что повышенные количества *Lactobacillus* spp. в сперме являются маркером гормональных нарушений и основанием для дальнейшего расширенного обследования мужчины [23].

Кластер с преобладанием EE был самым малочисленным в исследованном нами пуле образцов; наличие данной микробиоты отметили только в 14,0% случаев. Представителей EE, в основном *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis*, принято считать частой причиной воспалительной патологии урогенитального тракта у мужчин [24]. Возможно, это обусловлено высокой частотой их выявления при культуральном исследовании. Например, при параллельном изучении образцов эякулята культуральным методом и методом ПЦР-РВ было показано, что почти в половине случаев, когда энтеробактерии и энтерококки культуральным методом определялись как преобладающие, с помощью ПЦР-РВ выявлялись другие преобладающие МО. Чаще всего это были ОА, что, по всей видимости, обусловлено сниженной способностью выделять анаэробов при культивировании *in vitro* [12]. Вклад *E. coli* и *E. faecalis*, как и других представителей группы EE, в нарушение фертильности и качества сперматозоидов окончательно не определен и требует дальнейшего изучения.

Настоящее исследование в очередной раз демонстрирует частое присутствие МО в образцах эякулята, отвечающих критериям нормозооспермии. Примечательно, что в большинстве исследованных проб микробиота была преимущественно представлена облигатно анаэробными бактериями, а не грамположительными факультативными

анаэробами, которые обнаруживали при культуральном исследовании [22].

ВЫВОДЫ

В половине случаев образцы эякулята, соответствующие критериям нормозооспермии, содержали микробиоту в надпороговых значениях. Выделенные микроорганизмы были сгруппированы с помощью кластерного анализа в четыре устойчивых типа по критерию преобладания определенной группы микроорганизмов: облигатных анаэробов, *Lactobacillus spp.*, грамположительных факультативных анаэробов, *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* Кластеры ранжированы по частоте встречаемости: вариант с преобладанием облигатных анаэробов, грамположительных факультативных

анаэробов, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.* (определены в 40,2, 25,2, 20,6%, и 14,0% положительных образцов соответственно). По всей видимости, использование молекулярно-генетических методов приведет к переосмыслению представлений о составе микробиоты, определяемой в данном биоматериале при нормозооспермии. Вопрос ассоциации определенных вариантов микробиоты эякулята с воспалительной патологией репродуктивного тракта и нарушениями фертильности остается открытым. Не исключено, что существуют информативные микробиологические маркеры, ассоциированные с данными состояниями. Исследование микробного состава патологических образцов эякулята является следующим необходимым шагом для поиска таковых диагностических маркеров.

Литература

- Baud D, Pattaroni C, Vulliemmoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019; 10: 234. Published 2019 Feb 12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan Italy 2021. Available from: <https://uroweb.org/guideline/urological-infections/>.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40 (2): 72–5. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2007.00825.x.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114 (19): 339–46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
- Baud D, Vulliemmoz N, Ammerdorffer A, Gyger J, Greub G, Castella V, et al. Waddlia chondrophila, a Chlamydia-related bacterium, has a negative impact on human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2018; 33 (1): 3–10. DOI: 10.1093/humrep/dex342.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
- Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
- Mäandar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–6. DOI: 10.1111/iju.13286.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
- Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
- Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril.* 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
- Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Паначева Е. А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2019; 1: 44–9. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.009.
- Почерников Д. Г., Витвицкая Ю. Г., Болдырева М. Н., Галкина И. С. Информативность биоматериала для исследования микробиоты урогенитального тракта мужчин методом ПЦР-ПВ (пилотное исследование). *Экспериментальная и клиническая урология.* 2019; 2: 128–133. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132.
- WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
- Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR).* 1999; 31 (3): 264–323.
- Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007); p. 1027–35. DOI: 10.1145/1283383.1283494.
- Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987; 20: 53–65.
- Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.* PAMI-1. 1979; 2: 224–7.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (8): 851–3.
- Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 6876. DOI: 10.1038/s41598-020-63787-x.
- Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Иванов А. В., Почерников Д. Г., Паначева Е. А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-ПВ. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2020; 5: 66–73. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.064.
- Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl.* 2009; 32 (5): 462–7. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
- Почерников Д. Г., Постовойтенко Н. Т., Гетьман В. В., Галкина И. С. Диагностическая значимость выявления *Lactobacillus spp.* в эякуляте. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2020; 3: 42–48. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.039.
- Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50 (12): 1641–52. DOI: 10.1086/652861.

References

- Baud D, Pattaroni C, Vulliemmoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019;10:234. Published 2019 Feb 12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
- EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan Italy 2021. Available from: <https://uroweb.org/guideline/urological-infections/>.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40 (2): 72–5. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2007.00825.x.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114 (19): 339–46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
- Baud D, Vulliemmoz N, Ammerdorffer A, Gyger J, Greub G, Castella V, et al. Waddlia chondrophila, a Chlamydia-related bacterium, has a negative impact on human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2018; 33 (1): 3–10. DOI: 10.1093/humrep/dex342.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril.* 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
- Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (7): e1004262. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004262.
- Māndar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol.* 2017; 24 (3): 211–6. DOI: 10.1111/iju.13286.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110152. DOI: 10.1371/journal.pone.0110152.
- Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Pam Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18 (1): 3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
- Kiessling AA, Desmarais BM, Yin HZ, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril.* 2008; 90 (5): 1744–56. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
- Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. Evaluation of the ejaculate microbiota by real-time PCR and culture-based technique. *Bulletin of RSMU.* 2019; 1: 41–6. DOI: 10.24075/brsmu.2019.009.
- Pochernikov DG, Vitvickaya YuG, Boldyreva MN, Galkina IS. Informativnost' biomateriala dlja issledovanija mikrobioty urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR-RV (pilotnoe issledovanie). *Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija.* 2019; 2: 128–133. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-128-132. Russian.
- WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
- Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data clustering: a review. *ACM computing surveys (CSUR).* 1999; 31 (3): 264–323.
- Arthur D, Vassilvitskii S. K-means++: the advantages of careful seeding. In: Hal Gabow, editor. *Proceedings of the Eighteenth Annual ACM-SIAM Symposium on Discrete Algorithms (Proceedings in Applied Mathematics)* 18th ed. Society for Industrial and Applied Mathematics (3 January 2007); p. 1027–35. DOI: 10.1145/1283383.1283494.
- Rousseeuw PJ. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987; 20: 53–65.
- Davies DL, Bouldin DW. A Cluster Separation Measure. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.* PAMI-1. 1979; 2: 224–7.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol.* 2018; 3 (8): 851–3.
- Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, et al. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep.* 2020;10 (1): 6876. DOI: 10.1038/s41598-020-63787-x.
- Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernikov DG, Panacheva EA. Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data. *Bulletin of RSMU.* 2020; 5: 62–70. DOI: 10.24075/brsmu.2020.064.
- Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl.* 2009; 32 (5): 462–7. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.
- Pochernikov DG, Postovoytenko NT, Getman VV, Galkina IS. Diagnostic significance of Lactobacillus spp. identification in ejaculate. *Bulletin of RSMU.* 2020; 3: 38–45. DOI: 10.24075/brsmu.2020.039.
- Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50 (12): 1641–52. DOI: 10.1086/652861.

ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ «СПУТНИК V», ИЗМЕНЧИВОСТИ RBD-ДОМЕНА S-БЕЛКА SARS-COV-2 И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ СВОЙСТВ СЫВОРОТКИ

Л. В. Колобухина^{1,3}, О. А. Бургасова^{1,2,3}, И. С. Кружкова^{1,3}, В. В. Бакалин², Л. В. Генералова², А. В. Шагаев³, Д. А. Огаркова¹, М. А. Никифорова¹, Д. В. Васина¹, В. А. Гушин^{1,4}, С. В. Сметанина³

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ Инфекционная клиническая больница № 1, Москва, Россия

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

Показатель смертности от COVID-19 сохраняется достаточно высоким. Актуально изучение особенностей течения COVID-19 у вакцинированных пациентов, заболевших в разные сроки после прививки, по сравнению с невакцинированными. Целью работы было оценить клинико-иммунологические особенности течения COVID-19, проанализировать данные гуморального иммунитета (вируснейтрализующей активности, ВНА) и изменчивости RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 в группах пациентов, ранее вакцинированных «Спутником V», и у невакцинированных. В исследование включили 251 пациента с верифицированным диагнозом COVID-19, из них 116 были ранее вакцинированы одним или двумя компонентами препарата «Спутник V» и 135 невакцинированных (группа сравнения). Преобладали лица старше 50 лет (82,8%). Пациенты, получившие оба компонента вакцины, перенесли COVID-19 в легкой и среднетяжелой форме (92,1%). В группе невакцинированных пациентов 11 человек лечили в условиях ОРИТ, 10 из них умерли. Вирусная нагрузка была достоверно ниже у вакцинированных пациентов. Мутации SARS-CoV-2, включая S477N, S477N+A522S, E484K и E484K+S494P, были выявлены у пациентов как вакцинированных, так и невакцинированных. По результатам анализа нейтрализующей активности сывороток не обнаружена достоверная разница уровня ВНА против различных вариантов мутаций SARS-CoV-2. Полученные данные свидетельствуют, что отсутствие вакцинации является отягчающим фактором и увеличивает риск тяжелого течения и смерти пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: вакцина, «Спутник V», вакцинация, COVID-19, пациенты

Благодарности: заместителю главного врача по медицинской части ИКБ № 1 Н. А. Антип и заместителю главного врача по санитарно-эпидемиологическим вопросам ИКБ № 1 М. В. Базаровой — за организацию и поддержку процесса исследования.

Вклад авторов: Л. В. Колобухина — инициатор исследования, дизайн, подготовка рукописи, руководство клинической частью; О. А. Бургасова — анализ источников, подготовка и правка статьи, обработка результатов клинической части; И. С. Кружкова — клинические наблюдения, анализ источников, обработка результатов; В. В. Бакалин — клинические наблюдения, обработка клинических и лабораторных данных; Л. В. Генералова — обработка клинических данных; А. В. Шагаев — мониторинг заболевших лиц после вакцинации; Д. А. Огаркова — статистический анализ; М. А. Никифорова — координация вирусологических исследований, выделение вируса и ВНА; Д. В. Васина — обработка данных ИФА, координация иммунологической части исследования; В. А. Гушин — концепция исследования, руководство молекулярно-биологическим и вирусологическим направлениями исследований; С. В. Сметанина — общее руководство клинической частью исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы (протокол № 11/А от 16 ноября 2020 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Васильевна Колобухина
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; lkolobuchina@yandex.ru

Статья получена: 29.09.2021 **Статья принята к печати:** 13.10.2021 **Опубликована онлайн:** 17.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.046

ASSESSMENT OF COVID-19 CLINICAL COURSE IN PATIENTS VACCINATED WITH SPITNIK V, SARS-COV-2 S PROTEIN RBD DOMAIN VARIATION AND SERUM VIRUS NEUTRALIZING ACTIVITY

Kolobukhina LV^{1,3}, Burgasova OA^{1,2,3}, Kruzhkova IS^{1,3}, Bakalin VV², Generalova LV², Shagaev AV³, Ogarkova DA¹, Nikiforova MA¹, Vasina DV¹, Gushchin VA^{1,4}, Smetanina SV³

¹ Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³ Infectious Clinical Hospital № 1, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The COVID-19-associated mortality remains high. Studying the features of the COVID-19 course in vaccinated patients, who have got ill on different dates after vaccination, compared to unvaccinated individuals is relevant. The study was aimed to assess clinical and immunological features of the COVID-19 course, as well as to assess humoral immunity (virus neutralizing activity, VNA) and SARS-CoV-2 S protein RBD domain variation in the groups of patients, previously vaccinated with Sputnik V, and unvaccinated patients. A total of 251 patients with confirmed diagnosis of COVID-19 were enrolled, of them 116 individuals were previously vaccinated with one or two Sputnik V vaccine components, and 135 patients were not vaccinated (comparison group). Individuals over 50 years of age prevailed (82.8%). The patients, who received two vaccine components, had mild to moderate COVID-19 (92.1%). In the group of unvaccinated patients, 11 individuals received treatment in the ICU, 10 of them died. The viral load was significantly lower in vaccinated patients. Mutations of SARS-CoV-2, such as S477N, S477N+A522S, E484K and E484K+S494P, were identified both in vaccinated and unvaccinated patients. Assessment of the neutralizing activity of sera revealed no significant differences in VNA against different variants of SARS-CoV-2 mutations. The data obtained demonstrate that the lack of vaccination is an aggravating factor and is capable of increasing the risk of severe course and death in patients with COVID-19.

Keywords: vaccine, Sputnik V, vaccination, COVID-19, patients

Acknowledgments: we would like to thank Antipyat NA, Deputy Chief Physician for Medical Affairs, and Bazarova MV, PhD, Deputy Chief Physician for Sanitary and Epidemiological Issues, Infectious Clinical Hospital № 1, for the study management and support.

Author contributions: Kolobukhina LV — study proponent, design, manuscript writing, clinical research management; Burgasova OA — literature analysis, manuscript writing and editing, clinical research data processing; Kruzhkova IS — clinical observation, literature analysis, processing of the results; Bakalin VV — clinical observation, clinical and laboratory data processing; Generalova LV — clinical data processing; Shagaev AV — monitoring of infected individuals after vaccination; Ogarkova DA — statistical analysis; Nikiforova MA — coordination of virological studies, virus isolation and VNA; Vasina DV — ELISA data processing, coordination of immunological studies; Gushchin VA — study concept, molecular biological and virological research management; Smetanina SV — clinical research general management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Moscow Infectious Clinical Hospital (protocol № 11/A dated November 16, 2020). The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila V. Kolobukhina
Gamaleya St. 18, Moscow, 123098, Russia; lkolobuchina@yandex.ru

Received: 29.09.2021 **Accepted:** 13.10.2021 **Published online:** 17.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.046

Пандемия COVID-19, объявленная Всемирной организацией здравоохранения в 2020 г., охватила все страны мира. В большинстве случаев (80%) COVID-19 протекает субклинически и не требует госпитализации. Многие факторы, ассоциированные с тяжелым течением заболевания, хорошо изучены, однако сохраняется достаточно высокий показатель смертности от COVID-19, особенно у невакцинированных лиц старших возрастных групп [1].

История медицины свидетельствует о том, что остановить пандемию возможно при успешном проведении вакцинации и создании иммунной прослойки населения не менее 70–80%. Кроме того, вакцинация позволяет снизить риск тяжелого течения и смертности [2].

В настоящее время для всех основных вакцинных препаратов от COVID-19 достигнут убедительный уровень защиты от заболевания (более 90%) и тяжелого течения [3]. В странах, лидирующих в программе всеобщей иммунизации, отмечается тенденция к снижению заболеваемости и смертности [4]. Официальная статистика свидетельствует о снижении уровня заболеваемости и смертности от COVID-19 в странах, лидирующих в охвате населения прививками (50 доз вакцины на 100 человек), таких как Израиль, Объединенные Арабские Эмираты, США и Соединенное Королевство [5].

Результаты эффективности вакцин в рамках пострегистрационных исследований подтверждают данные, полученные в ходе клинических исследований по безопасности и эффективности вакцинных препаратов [6, 7].

В Российской Федерации (РФ) разработана, испытана и внедрена в практику вакцина «Спутник V», формирующая высокие титры нейтрализующих антител и комплексный клеточный иммунный ответ [8]. Принцип действия вакцины основан на использовании двух аденовирусных векторов серотипов Ad26 и Ad5, неспособных к репликации в организме человека, но способных доставлять ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. Как показали результаты третьей фазы клинических испытаний, проводимых в России, защитная эффективность вакцины «Спутник V» составила 91,6% [3]. Однако клиническая практика во многих странах мира подтверждает возможность риска развития заболевания COVID-19 после вакцинации даже двумя компонентами вакцин [9]. Важность этой проблемы и необходимость мониторинга случаев заболевания COVID-19 в популяции вакцинированных лиц подчеркивают наличие мутаций вируса SARS-CoV-2, их возможную клиническую значимость, а также риск появления новых штаммов, потенциально способных уходить от иммунной защиты.

Целью настоящего исследования было изучить особенности клинического течения COVID-19 в группах пациентов, ранее вакцинированных «Спутником V», по сравнению с невакцинированными.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включили 251 пациента с подтвержденной новой коронавирусной инфекцией. Критерий включения: детекция РНК SARS-CoV-2 в ПЦР. Критерий исключения: отсутствие РНК SARS-CoV-2 в биоматериале.

С целью оценки особенностей течения COVID-19 у пациентов, ранее вакцинированных препаратом «Спутник V», на первом этапе работы были сформированы

случайным способом две группы пациентов ($n = 251$) находящихся в ИКБ № 1 г. Москвы в период с декабря 2020 по апрель 2021 г. Из них 116 пациентов были госпитализированы в различные сроки после вакцинации «Спутником V»; группу сравнения составили 135 больных, ранее не вакцинированных. Степень тяжести течения болезни оценивали согласно шкале NEWS [10] в день госпитализации и в день включения пациента в исследование (госпитальные дни).

Группу вакцинированных пациентов разделили на три подгруппы в зависимости от сроков введения компонентов вакцины и даты заболевания. В первую подгруппу включили 46 человек, заболевших после введения первого компонента вакцины с первого по седьмой день, во вторую — 32 пациента, заболевших после введения первого компонента вакцины с восьмого по 14-й день включительно. В третью подгруппу включили 38 пациентов, заболевших в период с первого по 132-й день, после введения обоих компонентов вакцины «Спутник V». Мужчины — 121 человек (48,3%), женщины — 130 (51,7%) (табл. 1). Преобладали лица старше 50 лет (82,8%; $n = 208$), от 30 до 50 лет было 17,1% ($n = 43$) пациентов.

Алгоритм этиологического подтверждения COVID-19 включал исследование назального смыва на наличие РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, сыворотки крови для определения антител против SARS-CoV-2 методом ИФА и протективных антител методом РН.

Методика определения вирусной нагрузки

Образцы носоглоточных мазков исследовали с помощью набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» («НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи»; Россия). Лабораторную дифференциальную диагностику COVID-19 с другими респираторными инфекциями проводили с помощью метода ОТ-ПЦР.

Относительное количество РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью калибровочной прямой, для построения которой при каждой постановке анализа тестировали калибровочные стандарты. Последние представляли собой рекомбинантные конструкции, содержащие амплифицируемый фрагмент генома SARS-CoV-2 с известной концентрацией. Так как сравнение количества фрагментов было относительным, то РНК-фрагменты не использовали. Стадию обратной транскрипции контролировали прохождением ПЦР по внутреннему РНК-контролю, предусмотренному системой.

Выявление РНК/ДНК вирусов гриппа и ОРВИ проводили с помощью набора реагентов АмплиСенс «Influenza viruses A/B», АмплиСенс «Influenza virus A/H1-swine-FL», АмплиСенс «Influenza virus A-тип-FL», АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» («ЦНИИЭ Роспотребнадзора»; Россия), согласно рекомендациям производителя, на приборах для ПЦР в режиме реального времени Rotor Gene 6000 (Corbett Research; Австралия) и ДТ-96 («ДНК-Технология»; Россия).

Оценка количества антител IgG к RBD SARS-CoV-2

Для определения IgG-антител к рецепторсвязывающему домену (RBD) белка шипа S1 SARS-CoV-2 использовали рекомбинантный антиген RBD № 8COV1 (HyTest; Россия). В лунки 96-луночных ИФА-планшетов Costar High Binding (Corning; США) вносили по 100 мкл раствора RBD в фосфатно-солевом буфере PBS (Amresco; США) в

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Параметры	Всего пациентов $n = 251$				
	Невакцинированные $n = 135$	Вакцинированные			
		1 подгруппа $n = 46$	2 подгруппа $n = 32$	3 подгруппа $n = 38$	
		Сроки заболевания после вакцинации			
		1–7 дней от V1	8–14 дней от V1	1–132 дней от V1+V2	
Мужчины	61 (45,20%)	29 (63,0%)	10 (31,3%)	21 (55,3%)	0,039* (χ^2 -критерий Пирсона)
Женщины	74 (54,80%)	17 (37,0%)	22 (68,8%)	17 (44,7%)	
Соотношение мужчины : женщины	01 : 01,0	01 : 01,0	01 : 02,0	01 : 01,0	
Средний возраст (лет) M \pm SE (min-max)	64,9 \pm 1,2 (30–89)	64,5 \pm 2,1 (31–84)	68,9 \pm 2,1 (46–89)	67,7 \pm 1,9 (37–90)	0,335 (F-критерий Пирсона)
Возраст, лет 30–50	28 (20,7%)	8 (17,4%)	3 (9,4%)	4 (10,5%)	0,656 (χ^2 -критерий Пирсона)
51–70	54 (40,00%)	20 (43,5%)	16 (50,0%)	19 (50,0%)	
71–90	53 (39,30%)	18 (39,1%)	13 (40,6%)	15 (39,5%)	
Сроки госпитализации, дни M \pm SE (min-max), Me [Q ₁ –Q ₃]	6,22 \pm 0,20 (1–13) 6 [5–8]	7,5 \pm 0,5 (2–19)	6,5 \pm 0,4 (2–13)	8,3 \pm 0,8 (1–28) 7 [6-10]	0,014* (Критерий Манна– Уитни)
		7,5 [4–9]	6,5 [5–8]		
		7,5 \pm 0,4 (1–28) 7 [5–9]			
Оценка степени тяжести состояния пациентов при госпитализации					
Легкая	52 (38,50%)	17 (36,90%)	13 (40,60%)	19 (50,0%)	0,498 (χ^2 -критерий Пирсона)
		49 (42,2%)			
Среднетяжелая	35 (30,00%)	16 (34,8%)	9 (28,10%)	9 (23,70%)	
		34 (29,3%)			
Тяжелая	48 (35,50%)	13 (28,3%)	10 (31,30%)	10 (26,3%)	
		33 (28,4%)			
Из них переведены в ОРИТ	11	2	2	0	
Летальные исходы в ОРИТ	10	2	0	0	
Продолжительность пребывания в больнице (дни) в зависимости от тяжести: M \pm SE (min-max), Me [Q ₁ –Q ₃]	11,12 \pm 0,6 (4–52) 10 [7–13]	10,35 \pm 0,8 (4–36)	9,0 \pm 1,5 (2–53)	8,03 \pm 0,4 (4–14)	< 0,001* (критерий Манна–Уитни)
		8 [7–12]	8 [6,5–9]	8 [7–9]	
		9,22 \pm 0,5 (2–53) 8[7–9,5]			

Примечание: * — различия между группами статистически значимы ($p < 0,05$).

концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшеты сутки при +4 °C. На следующий день раствор антигена удаляли и блокировали планшеты в течение ночи при +4 °C, инкубируя их с блокирующим буфером S002X (Хема; Россия), содержащим 0,5% казеина.

Исследуемые сыворотки разводили в соотношении 1 : 100 в ИФА-буфере S011 (Хема; Россия), вносили по 100 мкл в лунку и инкубировали 1 ч в термощейкере при температуре +37 °C и перемешивании в режиме 600 об./мин. Затем планшеты трижды отмывали раствором PBS с добавлением 0,1% Твин-20 и вносили в лунки по 100 мкл поликлональных антител козы к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (Novex; США) в разведении 1 : 40 000. После инкубации в течение 1 ч при температуре +37 °C и перемешивании в режиме 600 об./мин планшеты отмывали 6 раз, вносили в лунки по

100 мкл однокомпонентного субстратного буфера R055, содержащего ТМБ («Хема»; Россия), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию, внося в лунки по 100 мкл 10% HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм. При учете результатов определяли граничное значение (ГЗ) оптической плотности (сумма среднего значения оптической плотности отрицательных контролей и экспериментально подобранного коэффициента), а затем для каждого образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП), равный отношению оптической плотности образца к ГЗ.

Интерпретацию результатов проводили по следующим критериям: результат анализа на определение антител класса G считали положительным, если для исследуемого образца КП $\geq 1,1$, отрицательным, если КП $< 0,9$. Результат определения антител класса G считали неопределенным,

Таблица 2. Динамика оценки тяжести течения COVID-19 у вакцинированных и невакцинированных пациентов

Точки оценки тяжести (госпитальные дни)	Пациенты (n = 57)						p
	Вакцинированные n = 22			Невакцинированные n = 35			
	Оценка степени тяжести состояния (NEWS)						
	Легкая	Средняя	Тяжелая	Легкая	Средняя	Тяжелая	
При госпитализации (1 точка)	10 (45,5%)	7 –31,80%	5 –22,70%	13 (37,1%)	10 (28,6%)	12 (34,3%)	0,699 (точный тест Фишера)
Средний госпитальный день 3,5 ± 1,2 (1–7 дней) (2 точка)	15 (68,2%)	5 –22,70%	2 –9,10%	15 (42,8%)	14 (40,0%)	6 –17,20%	0,184 (точный тест Фишера)
Средний госпитальный день 9,2 ± 1,4 (8–12 дней) (3 точка)	22 (100%)	0	0	22 (62,8%)	5 (14,3%)	8 –22,90%	0,002* (точный тест Фишера)
	К 12-му госпитальному дню все пациенты выписаны						

если $0,9 \leq \text{КП} < 1,1$. Для этих значений лабораторную систему валидировали с использованием контрольных сывороток. В качестве положительного контроля использовали ранее охарактеризованные сыворотки реконвалесцентов с подтвержденным диагнозом, в качестве отрицательного — архивные образцы сывороток, собранные в первой половине 2019 г. из коллекции заведомо отрицательных сывороток.

Клетки и вирусы

Клетки VERO E6 (ATCC, CRL-1586) культивировали в полной среде DMEM («ПанЭко»; Россия), дополненной 10% FBS (HyClone; США), 1 × GlutaMAX (Gibco; США) и пенициллин/стрептомицином (100 ME/мл; 100 мкг/мл) («ПанЭко»; Россия). Штаммы SARS-CoV-2 PMVL-4 (GISAID EPI_ISL_470898), PMVL-38 (GISAID EPI_ISL_1710856),

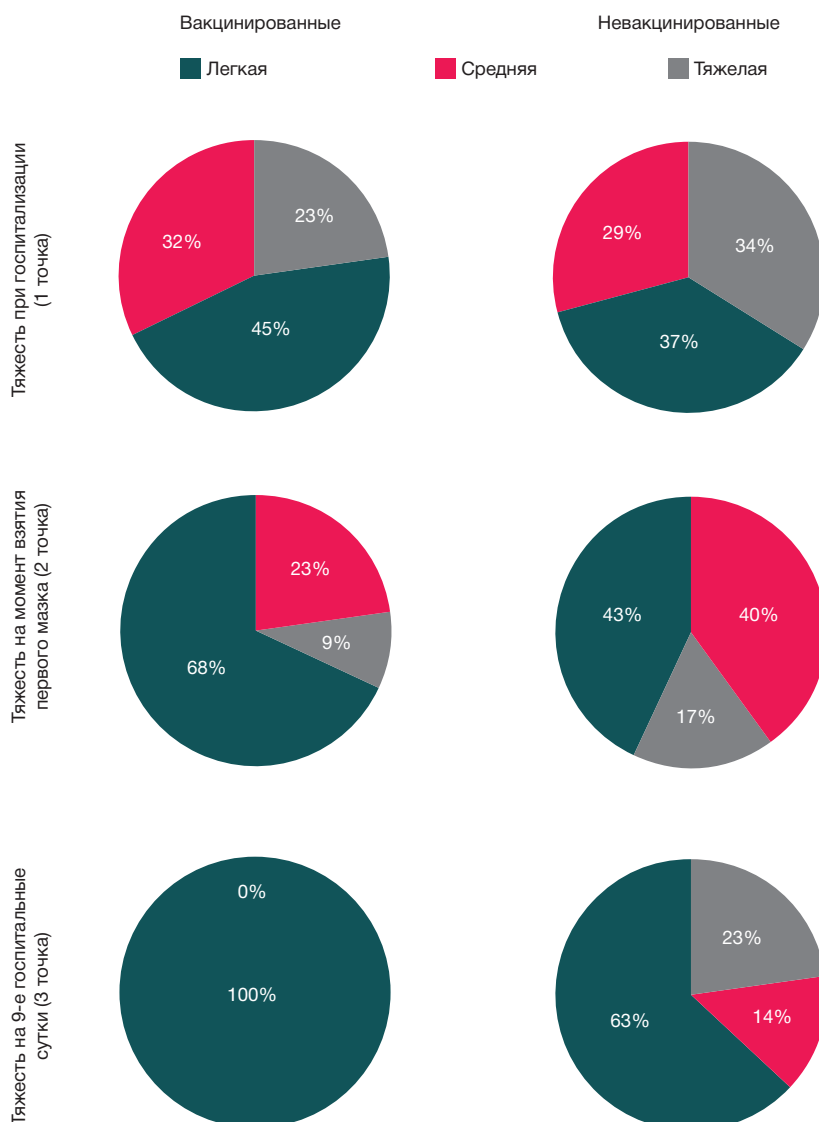


Рис. 1. Распределение пациентов по тяжести состояния в анализируемых точках (госпитальные дни)

Таблица 3. Вирусная нагрузка у вакцинированных и невакцинированных пациентов

Вирусная нагрузка, Ct			
Группы пациентов	N	Me [Q ₁ –Q ₃]	p
Невакцинированные	34	31,45 [27,20–33,72]	0,026* (U-критерий Манна–Уитни)
Полностью вакцинированные	8	34,78 [31,41–36,48]	

Примечание: * — различия показателей статистически значимы из выборки (вакцинированные $n = 22$, невакцинированные $n = 35$) ($p < 0,05$).

PMVL-47 (GISAID EPI_ISL_1710865) были выделены из назофарингеальных смывов. PMVL-38 и PMVL-47 содержат мутации в RBD-домене (S477N и E484K соответственно).

Оценка вирус-нейтрализующих свойств сыворотки пациентов

Клетки VERO E6 высевали в 96-луночные планшеты в количестве $0,2 \times 10^5$ кл./луночку за день до эксперимента. На следующий день 100 TCID₅₀ соответствующего варианта SARS-CoV-2 инкубировали с серийными разведениями сывороток в течение 1 ч при + 37 °C, а затем добавляли в 96-луночные планшеты с клетками Vero E6. Через 72 ч вирус-индуцированный цитопатический эффект (CPE) оценивали с помощью МТТ-теста [11]. Процент ингибирования CPE нормализовали и переводили в процент нейтрализации. NT₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software; США).

Исследование изменчивости вируса в области RBD-домена

Тотальную РНК экстрагировали из мазков пациентов и/или изолятов SARS-CoV-2 с использованием набора РИБО-ПРЕП («ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора»; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию проводили с помощью метода одноэтапной ОТ-ПЦР, для проведения которой использовали реакционную смесь, содержащую (для одной реакции) 10 пмоль каждого праймера, 0,025 мМ каждого dNTP («Евроген»; Россия), 5 мкл 5X буфера (100 мМ Трис-HCl (pH 8,3 при 25 °C), 150 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ), 0,25 мкл ревертазы M-MLV обратный (200 ед.), 0,25 мкл собственной полимеразы Taq (10 ед.) и 10 мкл РНК (около 0,5 мкг). Общий объем одной реакционной смеси составлял 25 мкл. Для амплификации фрагмента RBD SARS-CoV-2 нами были выбраны олигонуклеотиды следующей структуры: прямой праймер 5'-AACTTTAGAGTCCAACCAACAGAA-3' и обратный праймер 5'-TGAAGTTGAAATTGACACATTTG-3'. Олигонуклеотиды позволяют получить фрагмент с 334 по 538 аминокислоты спайк-гликопротеина. Амплификацию проводили на приборе T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad; США). Условия одностадийной реакции ОТ-ПЦР были следующими: 50 °C в течение 60 мин, 95 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 95 °C в течение 15 с, 55 °C в течение 10 с и 72 °C в течение 30 с, далее 72 °C в течение 5 мин. После амплификации часть продукта наносили на агарозный

гель и методом электрофореза оценивали присутствие целевого фрагмента. Далее продукты амплификации очищали от праймеров и нуклеотидов с помощью ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific; США) и измеряли концентрацию с помощью Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific; США) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование полученных фрагментов проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Для анализа структуры полученных последовательностей использовали программу Unipro UGENE v37.0.

Методы статистики

Для статистической обработки и построения графиков использовали программу IBM SPSS Statistics version 26. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка (при $n < 50$) или критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса (при $n > 50$). Уровень значимости определяли как $p = 0,05$. Для сравнения групп при распределении переменных, отличном от нормального, использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующим post hoc анализом с помощью U-критерия Манна–Уитни с поправкой на множественность Бонферрони или с помощью критерия Манна–Уитни (при количестве групп $n = 2$). При анализе таблиц сопряженности использовали χ^2 -критерий или точный тест Фишера. При анализе многопольных таблиц проводили апостериорные попарные сравнения с поправкой на множественность Бенджамини–Хохберга. Для определения влияния факта вакцинации и наличия мутаций на вирусную нагрузку был проведен многофакторный ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ возрастной структуры вакцинированной и невакцинированной групп не выявил статистически значимых различий по возрасту ($p = 0,656$). Средний возраст в группах также не имел статистически значимых различий ($p = 0,335$ (F-критерий Пирсона)).

Достоверной разницы в частоте встречаемости коморбидных состояний у невакцинированных и вакцинированных пациентов с COVID-19 не выявлено: артериальная гипертония — 79,0 и 72,4%, сердечно-сосудистые заболевания — 43,0 и 26,7%, сахарный диабет — 27,0 и 16,4%, ожирение — 47,4 и 39,6% соответственно.

Все включенные в исследование пациенты ($n = 251$) были госпитализированы с 1 по 28 день от появления первых

Таблица 4. Сравнение уровня антител к RBD-белку у пациентов вакцинированных и невакцинированных

Группы пациентов	n	КП RBD	p
		Me [Q ₁ –Q ₃]	
Невакцинированные	17	0,34 [0,22–0,48]	< 0,001* (U-критерий Манна–Уитни)
Полностью вакцинированные	22	7,75 [2,30–10,80]	

Примечание: * — различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$) из выборки (вакцинированные $n = 22$, невакцинированные $n = 35$).

Таблица 5. Частота обнаружения мутаций в RBD-домене в сравниваемых группах

Группы пациентов	Мутации в RBD-домене отсутствуют ($n = 9$)	Наличие мутаций в RBD-домене ($n = 10$)
Невакцинированные ($n = 11$)	8 (72,7%)	3 (27,3%)
Вакцинированные ($n = 8$)	1 (12,5%)	7 (87,5%)

Примечание: * — $p = 0,020$ (точный тест Фишера)

симптомов заболевания. По срокам госпитализации от момента появления первых симптомов у вакцинированных и невакцинированных пациентов имели место статистически значимые различия: пациенты, получившие хотя бы одну дозу вакцины были госпитализированы значительно позже ($p = 0,014$). Медиана суток от начала заболевания до момента госпитализации составила 7,5 дней у вакцинированных и 6 дней — у невакцинированных.

С целью клинической характеристики COVID-19 все пациенты ($n = 251$), согласно оценке тяжести течения болезни на день госпитализации, были разделены следующим образом: в группе вакцинированных ($n = 116$) у 49 (42,2 %) пациентов отмечено легкое течение, у 34 (29,3%) — среднетяжелое и 33 (26,5%) — тяжелое; в группе невакцинированных ($n = 135$) у 52 (38,5%) пациентов — легкое, у 35 (30,0%) — среднетяжелое, у 48 (35,5%) — тяжелое. Следует подчеркнуть, что число пациентов с разной степенью тяжести внутри каждой группы было статистически неразличимо как в группе невакцинированных, так и среди тех, кто получил хотя бы один компонент вакцины ($p = 0,498$).

В процессе лечения у 2 (4,5%) вакцинированных была отмечена тенденция к ухудшению: оба пациента из 1-й подгруппы были переведены в ОРИТ, оба умерли на 17-й и 36-й госпитальные сутки. Важно, что оба пациента заболели в первую неделю (первый и седьмой дни) с момента введения первого компонента вакцины и не могли иметь защитных антител. Два пациента (6,3%) из 2-й подгруппы также нуждались в лечении в условиях ОРИТ, им была проведена неинвазивная респираторная поддержка. Один из них страдал лимфогранулематозом и был переведен в другой стационар на 10-й госпитальный день с обширной гематомой правой ягодицы с затеком в паховую область и забрюшинное пространство малого таза, постгеморрагической анемией. Второй пациент страдал гипертонической болезнью в сочетании с ожирением и находился в ОРИТ в течение 32 дней, выписан из больницы на 56-й день. Обоим пациентам не вводили

второй компонент вакцины. Летальных исходов во 2-й и 3-й подгруппах вакцинированных пациентов не было, в то время как в группе невакцинированных пациентов 11 человек нуждались в лечении в условиях ОРИТ, 10 из них умерли.

Медиана времени, проведенного в стационаре, составила 8 дней у вакцинированных пациентов, включая тех, кому введен один компонент вакцины, у невакцинированных — 10 дней ($p < 0,001$).

Дополнительно, с целью оценки динамики клинического течения болезни, была проведена оценка тяжести пациентов в периоды с первого по седьмой и с восьмого по 12-й госпитальные дни, получивших оба компонента вакцины ($n = 22$) и заболевших спустя 14 дней по сравнению с группой невакцинированных ($n = 35$), заболевших в те же сроки (табл. 2; рис. 1).

Таким образом, показано, что в группах вакцинированных и невакцинированных при госпитализации (первая точка) число пациентов с различной тяжестью не имели статистически значимых различий согласно точному критерию Фишера ($p = 0,699$). В течение первой недели пребывания в стационаре (вторая точка, 1–7 госпитальные дни) также не обнаружены статистически значимые различия ($p = 0,184$). Однако оценка в третьей точке (8–12 госпитальные дни) показала, что 100% вакцинированных имели легкую степень тяжести болезни, в то время как доля легких пациентов в группе невакцинированных была статистически достоверно меньше — 63% ($p = 0,002$) (см. рис. 1). Сравнительный анализ точек по тяжести в анализируемых группах (с помощью критерия Фридмана для связанных выборок) показал, что статистически значимое ($p < 0,001$) снижение тяжести отмечено в группе вакцинированных, в то время как в группе невакцинированных эта тенденция имела пограничную значимость ($p = 0,058$).

Тактику дальнейших исследований определяли поиском критериев оценки тяжести течения болезни с учетом мутаций в RBD-домене, уровня вирусной нагрузки и гуморального ответа у пациентов.

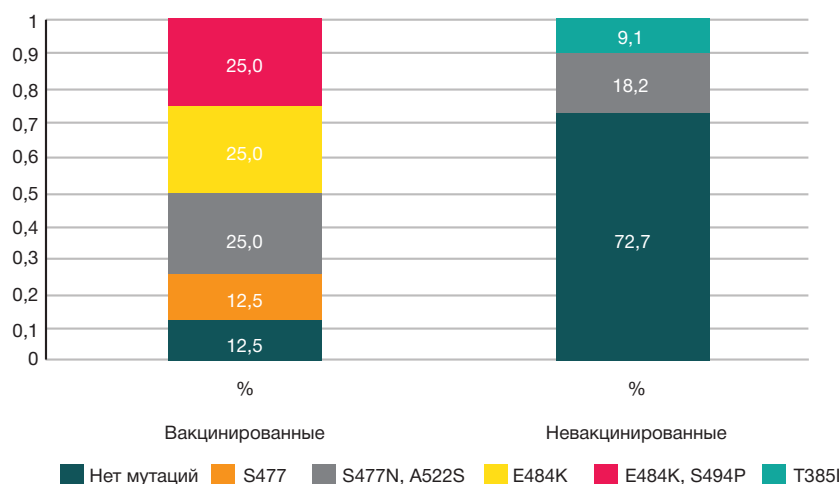


Рис. 2. Соотношение мутаций в RBD-домене вирусов SARS-CoV-2

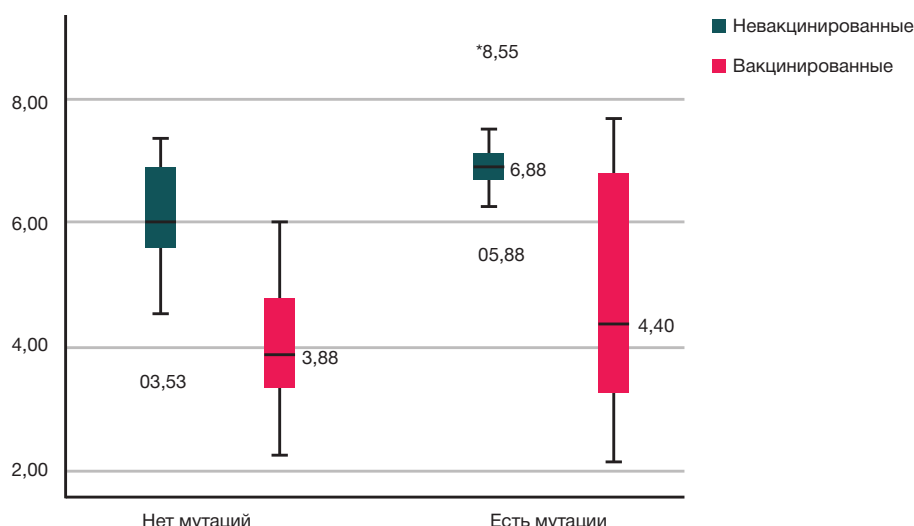


Рис. 3. Сравнительная оценка вирусной нагрузки в биопробах вакцинированных и невакцинированных пациентов, имеющих мутации в RBD-домене

Вирусная нагрузка в группе вакцинированных и невакцинированных была невысокая, но статистически значимая вирусная нагрузка была меньше в группе вакцинированных ($p < 0,05$) (табл. 3).

Оценка гуморального ответа в анализируемых группах показала, что уровень антител IgG был статистически значимо ($p < 0,001$) выше в группе полностью вакцинированных по сравнению с невакцинированными (табл. 4). Необходимы дальнейшие исследования для оценки продолжительности протективного иммунного ответа.

Процесс распространения вируса сопровождается его внедрением в человеческую популяцию, высокой смертностью его хозяев, а также способностью вируса мутировать, выживая в биологической среде.

При выявлении мутаций в RBD-домене SARS-CoV-2 в биопробах пациентов ($n = 19$) показано, что в области RBD-домена вирус мутировал в группе как вакцинированных, так и невакцинированных, но чаще мутации встречались в группе вакцинированных (табл. 5; рис. 2). Наличие мутаций свидетельствует о необходимости мониторинга клинической картины заболевания у вакцинированных и секвенирования вируса с целью быстрой своевременной модернизации средств специфической профилактики.

Анализ вирусной нагрузки в образцах показал, что вакцинация снижает вирусную нагрузку у заболевших. Выявлено, что в случае развития заболевания тенденция к уменьшению вирусной нагрузки в образцах, содержащих вирус с мутациями в RBD-домене, отмечается как у вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. С помощью многофакторного ANOVA установлена статистически значимая зависимость вирусной нагрузки

от наличия или отсутствия вакцинации ($p < 0,001$), вклад в дисперсию составил 39,0%. Зависимость от наличия мутаций так же оказалась значимой ($p = 0,038$), вклад в дисперсию составил 8,0%. Взаимосвязь вакцинации и наличия мутаций оказалась незначимой ($p = 0,650$) (рис. 3).

Для изучения возможного механизма ухода новых вариантов вируса от защиты антител у вакцинированных нами была проведена дифференциальная оценка вируснейтрализующей активности (ВНА) сывороток пациентов, вакцинированных двумя дозами, но заболевших COVID-19. Так как в большинстве образцов были обнаружены мутации в RBD-домене ($n = 6$), включая S477N, S477N+A522S, E484K и E484K+S494P, нами была проведена оценка ВНА для всех данных образцов в отношении исходного варианта вируса с заменой D614G и двух вариантов с мутацией S477N и E484K, имеющих в нашей коллекции вирусных изолятов.

В табл. 6 представлены уровни ВНА к различным вариантам мутаций вируса SARS-CoV-2 в пробах от пациентов ($n = 6$). Процент уровней титра нейтрализации (NT50) рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В дальнейшем была проведена сравнительная оценка уровня ВНА против различных вариантов мутаций SARS-CoV-2. На рис. 4 (верхний ряд) показаны значения p при 95% доверительном интервале (тест Уилкоксона).

Статистически достоверной разницы ВНА сывороток с различными вариантами SARS-CoV-2 обнаружено не было ни при оценке всех сывороток, ни для отдельных сывороток, полученных от пациентов с характерной мутацией.

Таблица 6. Уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к вариантам мутаций SARS-CoV-2

№	Наименование образца	NT ₅₀		
		PMVL-4_D614G	PMVL-38_S477N	PMVL-47_E484K
1	3222_S477N	373,8	452,6	451,9
2	4003_S477N, A522S	186,7	293,5	153,2
3	4310_E484K,S494P	452,3	452,6	451,6
4	573_E484K,S494P	256,2	202,5	452,6
5	4267_E484K	226,5	> 640	> 640
6	4160_E484K	65,52	29,26	320

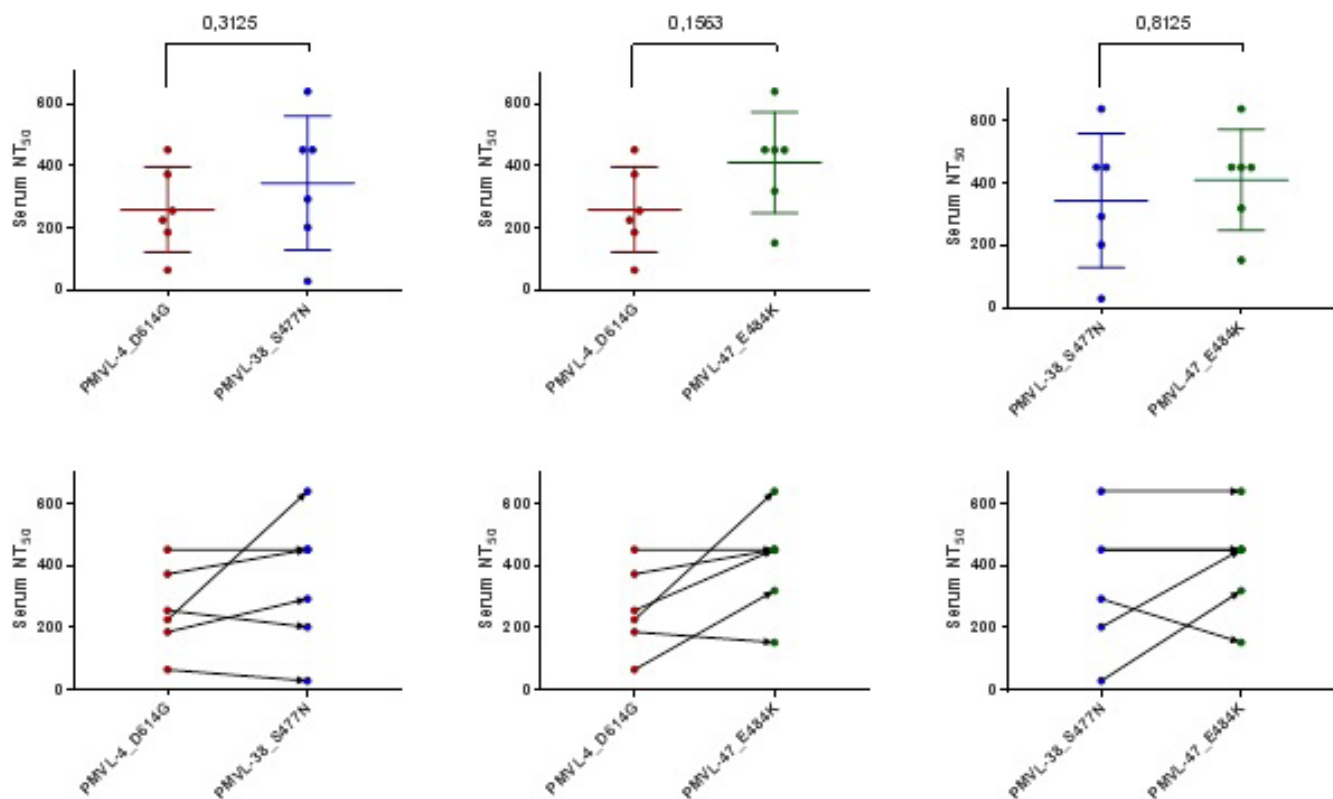


Рис. 4. Сравнительная оценка титров нейтрализующих антител против различных вариантов SARS-CoV-2. * — в верхнем ряду показаны значения p при 95%-м доверительном интервале (тест Уилкоксона)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что вакцина «Спутник V», так же как и любой иммунобиологический препарат, разработанная и успешно применяемая в практике здравоохранения в качестве профилактического средства, не обладает 100%-й эффективностью, особенно в период продолжающейся пандемии. Однако применение вакцинных препаратов в столь нестандартной ситуации позволит сократить число как тяжелых пациентов, так и летальных исходов.

В настоящий момент «Спутник V» успешно применяют более чем в 67 странах мира [12]. На 11.09.2021 в Российской Федерации полностью вакцинировано 39 589 464 человек (27,11%) [13].

В этой связи исследование факторов, приводящих к заболеванию COVID-19 у вакцинированных, а также мониторинг клинического течения заболевания позволят дать практическому здравоохранению и обществу в целом дополнительную информацию по вакцинации.

В настоящем исследовании предпринята попытка анализа клинических и лабораторных показателей у пациентов, вакцинированных «Спутник V» с различным сроком, прошедшим с момента получения первой и второй доз вакцины, по сравнению с группой невакцинированных.

Динамика оценки тяжести течения COVID-19 у полностью вакцинированных и заболевших спустя 14 дней после введения второго компонента и невакцинированных пациентов, заболевших в те же сроки показала, что на 8–12 госпитальные дни 100% вакцинированных пациентов имели легкую степень тяжести болезни. В группе полностью вакцинированных и имеющих протективный иммунитет против SARS-CoV-2 не было пациентов переведенных в ОПИТ и летальных исходов.

Кроме оценки клинической тяжести проводили анализ ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-PB, секвенирование вирусной РНК в области RBD-домена, дифференциальный контроль титров нейтрализующих антител, а также уровень антительного ответа IgG к RBD-домену S-белка.

Показатели вирусной нагрузки в группах наблюдения были различны. Как и следовало ожидать, у полностью вакцинированных пациентов (заболевших спустя 14 дней после второй дозы вакцины) уровень вирусной нагрузки был достоверно ($p = 0,026$) меньше, чем в группе невакцинированных. С высокой вероятностью снижение вирусной нагрузки в группе вакцинированных «Спутником V» делает эту группу менее контагиозной.

Статистически значимый уровень антител IgG к RBD в группе полностью вакцинированных превышал аналогичные значения в группе невакцинированных ($p < 0,001$). Полученные результаты показали, что в течение двух недель после получения бустерной дозы вакцины «Спутника V» сформировался полноценный специфичный иммунный ответ.

Уровень антител IgG (КП 4,72 [1,47–9,88]) в подгруппах не полностью вакцинированных был довольно низким, что может частично объяснять заболевание COVID-19 среди вакцинированных пациентов, включенных в исследование. Кроме того, ряд исследователей указывают, что значительная часть людей не имеют достаточного уровня специфичного ответа на инфекцию, что по всей вероятности обусловлено недостатком созревания В-лимфоцитов [14].

Анализ мутаций вируса в области RBD-домена, проведенный на ограниченном количестве биопроб, показал, что мутации в RBD-домене отмечаются как у вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. Чаще мутации были зарегистрированы в группе вакцинированных, но нельзя забывать, что

сама вакцинация не оказывает влияние на мутации или их частоту, что лежит в основе вакцинопрофилактики.

Дизайн эксперимента не позволил выявить различия в ВНА антител у наблюдаемых пациентов. Статистически достоверной разницы ВНА сывороток с различными вариантами SARS-CoV-2 обнаружено не было ни при оценке всех сывороток, ни для отдельных сывороток, полученных от пациентов с характерной мутацией. Стоит отметить, что средний уровень ВНА к вирусам с мутациями был немного выше по сравнению с уровнем ВНА к вирусу дикого типа. Однако показано существенное снижение нейтрализующей способности антител и сывороток в отношении химерных штаммов SARS-CoV-2 или изогенных вариантов, содержащих мутации [15].

Результаты исследования свидетельствуют о протективных свойствах «Спутника V». Лица, прошедшие вакцинацию в полном объеме, имеют значительно меньшие риски заболевания COVID-19 по сравнению с невакцинированными, особенно в условиях продолжающейся пандемии. Данные, полученные зарубежными исследователями, по оценке вакцинных препаратов согласуются с нашими [2].

Основным ограничением настоящего исследования является небольшая выборка полностью вакцинированных пациентов, не позволяющая в полной мере оценивать влияние редких мутаций вируса на клиническое течение

болезни. Нет полного понимания, в какой степени новые варианты мутаций вируса могут дифференциально приводить к заражению вакцинированных по сравнению с невакцинированными в составе одной и той же популяции. Наше исследование имеет конкретный временной период наблюдения в Московском регионе, для которого характерны и свои региональные мутации штаммов.

ВЫВОДЫ

У пациентов, прошедших вакцинацию обоими компонентами «Спутник V» и заболевших, болезнь протекала в легкой форме (100%), и на 8–12 госпитальные дни они были выписаны из стационара. В группе полностью вакцинированных пациентов не было летальных исходов. Уровень вирусной нагрузки у полностью вакцинированных пациентов был достоверно меньше, чем в группе невакцинированных. Мутации в RBD-домене отмечены в группах как вакцинированных, так и невакцинированных пациентов. Статистически значимо уровень антител IgG к RBD был выше в группе вакцинированных по сравнению с невакцинированными. Продолжительность пандемии, мутации вируса, изменения структуры циркулирующих штаммов, изучение клинической картины вакцинированных и заболевших требуют проведения более детального и объективного анализа.

Литература

1. Колобухина Л. В., Бургасова О. А., Краева Л. А., Гущин В. А., Бурцева Е. И., Кружкова И. С. и др. Клинико-лабораторный профиль пациентов с COVID-19, госпитализированных в инфекционный стационар г. Москвы в период с мая по июль 2020 года. *Инфекционные болезни*. 2021; 19 (2): 5–15.
2. Rzymiski P, Pazgan-Simon M, Krzysztof Simon T, Zarębska-Michaluk D, Szczepańska B, et al. Clinical Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients Who Received at Least One Dose of COVID-19 Vaccine. 2021; 9 (7): 78. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/7/781>.
3. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatullin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*. 2021; 397 (10275): 671.
4. Statistics and Research Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Available from: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
5. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (5): 533–4. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep; 20 (9): e215.
6. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021; 397 (10287): 1819–829. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8.
7. Hodick G, Tene L, Rotem RS, Patalon T, Gazit S, Ben-Tov A, et al. The effectiveness of the TWO-DOSE BNT162b2 vaccine: analysis of real-world data. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab438. DOI: 10.1093/cid/ciab438. Epub ahead of print. PMID: 33999127.
8. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *The Lancet*. 2020; 396 (10255): 887–97.
9. Keehner J, et al. SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Health Care Workers in California. *N Engl J Med*. 2021; 384: 1774–5. DOI: 10.1056/NEJMc2101927.
10. NEWS (or NEWS2) score when assessing possible COVID-19 patients in primary care. Available from: <https://www.cebm.net/covid-19/should-we-use-the-news-or-news2-score-when-assessing-patients-with-possible-covid-19-in-primary-care/>.
11. Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, et al. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 58 (1): e108. DOI: 10.1002/cpmc.108.
12. В каких странах вакцина "Спутник V" одобрена к применению. Доступно по ссылке: <https://sputnik-meedia.ee/infographics/20210607/573214/V-kakikh-stranakh-vaktsina-Sputnik-V-odobrena-k-primeneniyu.html>.
13. Статистика вакцинации от коронавируса (COVID-19) в России. Доступно по ссылке: <https://index.minfin.com.ua/reference/coronavirus/vaccination/russia/>.
14. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med*. 2020; 217 (11): e20201181–e20201181.
15. Diamond M, Chen R, Xie X, Case J, Zhang X, VanBlargan L, et al. SARS-CoV-2 variants show resistance to neutralization by many monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Res Sq*. 2021; 3: 228079. DOI: 10.21203/rs.3.rs-228079/v1. Preprint.

References

1. Kolobukhina LV, Burgasova OA, Kraeva LA, Gushchin VA, Burtseva EI, Kruzhkova IS, et al. Clinical and laboratory profile of patients with COVID-19 hospitalized in an infectious hospital in Moscow in the period from May to July 2020. *Infectious diseases*. 2021; 19 (2): 5–15. Russian.
2. Rzymiski P, Pazgan-Simon M, Krzysztof Simon T, Zarebska-Michaluk D, Szczepańska B, et al. Clinical Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients Who Received at Least One Dose of COVID-19 Vaccine. 2021; 9 (7): 78. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/7/781>.
3. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tikhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*. 2021; 397 (10275): 671.
4. Statistics and Research Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Available from: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
5. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (5): 533–4. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep; 20 (9): e215.
6. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*. 2021; 397 (10287): 1819–829. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00947-8.
7. Hodick G, Tene L, Rotem RS, Patalon T, Gazit S, Ben-Tov A, et al. The effectiveness of the TWO-DOSE BNT162b2 vaccine: analysis of real-world data. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab438. DOI: 10.1093/cid/ciab438. Epub ahead of print. PMID: 33999127.
8. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *The Lancet*. 2020; 396 (10255): 887–97.
9. Keehner J, et al. SARS-CoV-2 Infection after Vaccination in Health Care Workers in California. *N Engl J Med*. 2021; 384: 1774–5. DOI: 10.1056/NEJMc2101927.
10. NEWS (or NEWS2) score when assessing possible COVID-19 patients in primary care. Available from: <https://www.cebm.net/covid-19/should-we-use-the-news-or-news2-score-when-assessing-patients-with-possible-covid-19-in-primary-care/>.
11. Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, et al. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 58 (1): e108. DOI: 10.1002/cpmc.108.
12. V kakih stranah vakcina "Sputnik V" odobrena k primenjenju. Dostupno po ssylke: <https://sputnik-meedia.ee/infographics/20210607/573214/V-kakikh-stranakh-vaktsina-Sputnik-V-odobrena-k-primeneniju.html>. Russian.
13. Statistika vakcinacii ot koronavirusa (COVID-19) v Rossii. Dostupno po ssylke: <https://index.minfin.com.ua/reference/coronavirus/vaccination/russia/>. Russian.
14. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med*. 2020; 217 (11): e20201181–e20201181.
15. Diamond M, Chen R, Xie X, Case J, Zhang X, VanBlargan L, et al. SARS-CoV-2 variants show resistance to neutralization by many monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Res Sq*. 2021; 3: 228079. DOI: 10.21203/rs.3.rs-228079/v1. Preprint.

АНАЛИЗ ПРИЧИН РАННЕЙ НЕОНАТАЛЬНОЙ СМЕРТНОСТИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2020 Г. (ГОД ПАНДЕМИИ COVID-19)

У. Н. Туманова¹, А. И. Щеголев^{1,2} ✉, А. А. Чаусов¹, М. П. Шувалова¹

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

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

В марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила о пандемии COVID-19. Целью работы было провести сравнительный анализ причин и показателей ранней неонатальной смертности в Российской Федерации (РФ) в 2020 и 2019 г. с помощью статистических форм А-05 Росстата за 2019 и 2020 г., составленных на основании записей в медицинских свидетельствах о перинатальной смерти и относящихся к случаям ранней неонатальной смерти. В 2020 г. в РФ зарегистрировано уменьшение абсолютного числа живых новорожденных на 7,6% по сравнению с данными 2019 г. Показатель ранней неонатальной смертности в 2020 г. (1,59‰) снизился на 4,4% по сравнению с показателем 2019 г. (1,67‰). Однако в Южном и Дальневосточном федеральных округах показатели ранней неонатальной смертности повысились на 20,5 и 6,1% соответственно. В целом по РФ наиболее частой причиной ранней неонатальной смертности были заболевания, входящие в группу респираторных нарушений, составившие 37,3 и 40,2% от общего числа умерших новорожденных в 2019 и 2020 г. соответственно. Доля врожденного сепсиса как первоначальной причины смерти составила 43,6 и 46,6% в группе инфекционных заболеваний и 7,3 и 7,9% от всех умерших новорожденных в 2019 и 2020 г. соответственно. Установлено увеличение доли заболеваний, входящих в группу респираторных нарушений, включая врожденную пневмонию и так называемые другие респираторные состояния, а также инфекций, в том числе врожденного сепсиса, что отражает негативное прямое и опосредованное влияние SARS-CoV-2-инфицирования у беременных и у новорожденных.

Ключевые слова: новорожденный, ранняя неонатальная смерть, причина смерти, региональные особенности, COVID-19

Вклад авторов: У. Н. Туманова — дизайн работы, анализ данных Росстата, поиск и анализ данных литературы, написание текста; А. И. Щеголев — анализ и обобщение данных Росстата, анализ данных литературы, редактирование текста; А. А. Чаусов — анализ данных Росстата, статистическая обработка; М. П. Шувалова — анализ данных Росстата, редактирование текста.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Иванович Щеголев
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; ashegolev@oparina4.ru

Статья получена: 15.09.2021 **Статья принята к печати:** 29.09.2021 **Опубликована онлайн:** 05.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.045

ANALYSIS OF CAUSES OF EARLY NEONATAL MORTALITY DURING COVID-19 PANDEMIC IN 2020 IN RUSSIA

Tumanova UN¹, Shchegolev AI^{1,2} ✉, Chaushov AA¹, Shuvalova MP¹

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russia

In March 2020, the World Health Organization declared a COVID-19 pandemic. The aim of this study was to compare the causes of and statistics on neonatal mortality in Russia in 2020 and 2019 using the Rosstat A-5 forms that aggregate data from perinatal death certificates. In 2020, there was a 7.6% reduction in the absolute number of live births relative to 2019. In 2020, the overall early neonatal death rate (1.59‰) fell by 4.4% in comparison with 2019 (1.67‰). However neonatal mortality rates in the Southern and Far Eastern Federal Districts rose by 20.5% and 6.1%, respectively. Respiratory diseases were the most common cause of early neonatal mortality across Russia (37.3% and 40.2% relative to the total number of neonatal deaths in 2019 and 2020, respectively). Congenital sepsis accounted for 43.6% and 46.6% of early neonatal deaths from infectious diseases and for 7.3% and 7.9% of all early neonatal deaths reported in 2019 and 2020, respectively. There was an increase in the proportion of respiratory diseases among neonates, including congenital pneumonia and other respiratory conditions, and infections, including congenital sepsis, which reflects the direct and indirect effects of SARS-CoV-2 infection on pregnant women and neonates.

Keywords: neonate, early neonatal mortality, cause of death, regional features, COVID-19

Author contribution: Tumanova UN — study design, Rosstat data analysis, literature search and analysis, manuscript preparation; Shchegolev AI — Rosstat data analysis and summarization, literature analysis, manuscript editing; Chaushov AA — Rosstat data analysis, statistical analysis; Shuvalova MP — Rosstat data analysis, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandr I. Shchegolev
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; ashegolev@oparina4.ru

Received: 15.09.2021 **Accepted:** 29.09.2021 **Published online:** 05.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.045

В декабре 2019 г. в Китайском городе Ухань были выявлены случаи нового инфекционного заболевания, вызванного новым штаммом коронавируса SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome, coronavirus-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2) и названного COVID-19 (от англ. coronavirus disease 2019) [1]. Отличительной особенностью данного заболевания стал высокий уровень заболеваемости с распространенностью по всему миру, вследствие чего уже 11 марта 2020 г., когда число подтвержденных случаев заболевания превысило 100 000 человек, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о пандемии COVID-19 [2].

К сожалению, все меры, предпринимаемые для предотвращения распространения инфекции, разработки методов лечения заболевших, проведения широкой вакцинации, до настоящего времени так и не позволили контролировать распространение инфекции. Клиническое течение COVID-19 варьирует от бессимптомных до тяжелых форм с летальным исходом, число которых достигло к 1 марта 2020 г. 5–6% в Китае и 15% за пределами Китая [3]. Наиболее часто COVID-19 поражает лиц пожилого возраста, для которых характерно более тяжелое течение заболевания [4]. У детей и особенно новорожденных заболевание диагностировали гораздо реже, и оно носило

Таблица 1. Число новорожденных, умерших в раннем неонатальном периоде, в РФ в 2019 и 2020 г. (абсолютное значение и процент от общего числа таких умерших)

РФ	РФ	МП	ЖП	ГМ	СМ
2019	2475	1377 (55,6)*	1098 (44,4)	1855 (74,9)**	620 (25,1)
2020	2288	1332* (58,2)	956 (41,8)	1696 (74,1)**	592 (25,9)

Примечание: МП — мужской пол, ЖП — женский пол, ГМ — городская местность, СМ — сельская местность; * — $p < 0,01$ по сравнению с женским полом, ** — $p < 0,01$ по сравнению с сельской местностью.

более благоприятный характер [5]. Однако развитие COVID-19 у беременных с поражением плаценты, а также выявление SARS-CoV-2 у новорожденных, несомненно, может отразиться на общей заболеваемости и смертности новорожденных. В этой связи актуальным представляется изучение показателей смертности и причин смерти новорожденных в 2020 г. — году пандемии COVID-19, что возможно путем сравнительного анализа с показателями предыдущего года.

Целью работы было провести сравнительный анализ причин и показателей ранней неонатальной смерти в Российской Федерации (РФ) в 2020 и 2019 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании проводили анализ статистических форм А-05 Росстата за 2019 и 2020 г., составленных на основании записей в медицинских свидетельствах о перинатальной смерти и относящихся к случаям ранней неонатальной смерти. К ранней неонатальной смерти с 1 января 2012 г., согласно нормативным документам, относят случаи смерти детей, родившихся при сроке гестации 22 недели и более с массой тела 500 г и более и умерших в первые 168 ч жизни после рождения.

Основные заболевания (первоначальные причины смерти) объединены в восемь групп: I — родовая травма; II — респираторные нарушения; III — инфекционные заболевания; IV — геморрагические и гематологические расстройства; V — эндокринные, метаболические и другие нарушения, специфичные для перинатального периода; VI — врожденные аномалии; VII — травмы и отравления; VIII — другие причины смерти и случаи с неустановленной причиной смерти.

Таблица 2. Число новорожденных, умерших в раннем неонатальном периоде, в федеральных округах РФ в 2019 и 2020 г. (абсолютное значение и процент от общего числа таких умерших в РФ)

Округ	2019		2020	
	n (%)	пРНС	n (%)	пРНС
РФ	2475	1,67	2288	1,59
ЦФО	480 (19,4)	1,31	435 (19,0)	1,22
СЗФО	216 (8,7)	1,62	167 (7,3)	1,31
ЮФО	244 (9,9)	1,51	286 (12,5)*	1,82
СКФО	343 (13,9)	2,53	315 (13,8)	2,31
ПФО	482 (19,5)	1,72	433 (18,9)	1,61
УФО	215 (8,7)	1,6	188 (8,2)	1,44
СФО	347 (14,0)	1,95	308 (13,5)	1,81
ДФО	148 (6,0)	1,63	156 (6,8)	1,73

Примечание: ЦФО — Центральный федеральный округ, СЗФО — Северо-Западный ФО, ЮФО — Южный ФО, СКФО — Северо-Кавказский ФО, ПФО — Приволжский ФО, УФО — Уральский ФО, СФО — Сибирский ФО, ДФО — Дальневосточный ФО; * — $p < 0,05$ по сравнению с данными 2019 г.

Показатели ранней неонатальной смертности рассчитывали как отношение числа новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни, к общему числу детей, родившихся живыми, умноженное на 1000. Сравнение полученных количественных данных проводили при помощи критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно данным статистических форм А-05 Росстата, в 2019 г. в РФ было зарегистрировано 1 481 074 новорожденных, родившихся живыми, из них в первые 168 ч жизни умерло 2475 (табл. 1). В 2020 г. установлено уменьшение абсолютного числа живых новорожденных на 7,6% по сравнению с данными 2019 г. При этом показатель ранней неонатальной смертности в 2020 г. (1,59%) снизился на 4,4% по сравнению с показателем 2019 г. (1,67%).

Подобное уменьшение отражает тенденцию ежегодного снижения в последние годы. Поэтому для проведения более четкого анализа показателей смертности за один 2020 г. для сравнения нами были взяты показатели также одного, предыдущего 2019 г. Действительно, в 2012 г. после введения ныне действующих критериев рождения (массой 500 г и более при сроке гестации 22 недели и более) в целом по РФ было зарегистрировано 6969 новорожденных, умерших в первые 168 ч после рождения, при этом показатель ранней неонатальной смертности составил 3,66‰ [6]. Для сравнения, в 2010 г., когда на основании нормативных документов раннюю неонатальную смерть трактовали как смерть ребенка, родившегося при сроке гестации 28 недель и более с массой тела 1000 г и более и умершего в первые 168 ч

Таблица 3. Основные заболевания новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни, в федеральных округах РФ в 2019 г. (абсолютное значение и процент от всех умерших в стране/округе)

Округ	Группа основных заболеваний							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
РФ	17 (0,7)	924 (37,3)	413 (16,7)	412 (16,6)	213 (8,6)	434 (17,5)	16 (0,6)	46 (1,9)
ЦФО	2 (0,4)	121 (25,2)	56 (11,7)	84 (17,5)	69 (14,4)	138 (28,8)	0	10 (2,8)
СЗФО	1 (0,5)	98 (45,4)	48 (22,2)	26 (12,0)	12 (5,6)	28 (13,0)	2 (0,9)	1 (0,5)
ЮФО	3 (1,2)	102 (41,8)	47 (19,3)	44 (18,0)	13 (5,3)	27 (11,1)	1 (0,4)	7 (2,9)
СКФО	0	148 (43,1)	50 (14,6)	51 (14,9)	34 (9,9)	59 (17,2)	0	1 (0,3)
ПФО	3 (0,6)	171 (35,5)	79 (16,4)	134 (27,8)	18 (3,7)	68 (14,1)	5 (1,0)	4 (0,8)
УФО	1 (0,5)	75 (34,9)	53 (24,7)	24 (11,2)	9 (4,2)	44 (20,5)	5 (2,3)	4 (1,9)
СФО	5 (1,4)	137 (39,5)	66 (19,0)	25 (7,2)	42 (12,1)	55 (15,8)	3 (0,9)	14 (4,0)
ДФО	2 (1,4)	72 (48,6)	14 (9,5)	24 (16,2)	16 (10,8)	15 (10,1)	0	5 (3,4)

жизни, было зафиксировано 4948 случаев ранней неонатальной смерти (показатель ранней неонатальной смертности — 2,75%) [7]. Соответственно, значения показателя ранней неонатальной смертности в РФ в 2020 г. снизились по сравнению с таковыми значениями в 2010 г. и 2012 г. на 42,2% и 56,6% соответственно.

В 2019 г. новорожденные мальчики, умершие в первые 168 ч жизни, составили 54,7%, а в 2020 г. — 58,2%, девочки соответственно составили 45,3 и 41,8%. Следовательно, в 2020 г. на 6,4% возросла доля умерших новорожденных мальчиков и на 7,7% уменьшилась доля девочек. Больше число случаев ранней неонатальной смерти закономерно было зарегистрировано в городской местности по сравнению с сельской: в 2019 г. их доля составила 74,9%, в 2020 г. — 74,1% (табл. 1).

Общее число умерших в раннем неонатальном периоде отличалось и в различных федеральных округах (ФО) (табл. 2). Больше всего случаев смерти новорожденных и в 2019 и 2020 г. было зарегистрировано в Центральном (19,4 и

19,0% от всех умерших в раннем неонатальном периоде соответственно) и Приволжском ФО (19,4 и 18,9%). Минимальное их число отмечено в Дальневосточном ФО. В целом по РФ в 2020 г. по сравнению с 2019 г. произошло уменьшение числа ранних неонатальных смертей. Однако в Южном и Дальневосточном ФО зарегистрировано увеличение числа новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни, на 17,2% ($p = 0,004$) и 5,4% соответственно. При этом показатели ранней неонатальной смертности в этих округах повысились на 20,5 и 6,1% соответственно.

Несомненно, наиболее важен анализ причин смерти новорожденных (табл. 3, 4). В целом по РФ наиболее часто ранняя неонатальная смертность была вызвана заболеваниями, входящими в группу респираторных нарушений (группу II). В 2019 г. такие случаи составили 37,3% от общего числа умерших. В 2020 г. доля таких умерших повысилась по сравнению с показателями 2019 г. на 7,8% ($p = 0,042$), составив 40,2% от всех умерших. В оба исследованных периода большее число летальных исходов

Таблица 4. Основные заболевания новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни, в федеральных округах РФ в 2020 г. (абсолютное значение и процент от всех умерших в стране/округе)

Округ	Группа основных заболеваний							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
РФ	19 (0,8)	920 (40,2)	388 (17,0)	359 (15,7)	198 (8,7)	354 (15,5)	20 (0,9)	30 (1,3)
ЦФО	3 (0,7)	117 (26,9)	74 (17,0)	80 (18,4)	54 (12,4)	92 (21,1)	7 (1,6)	8 (1,8)
СЗФО	1 (0,6)	73 (43,7)	35 (21,0)	20 (12,0)	9 (5,4)	29 (17,4)	0	0
ЮФО	2 (0,7)	150 (52,4)	30 (10,5)	51 (17,8)	7 (2,4)	39 (13,6)	2 (0,7)	5 (1,7)
СКФО	4 (1,3)	120 (38,1)	57 (18,1)	34 (10,8)	45 (14,3)	51 (16,2)	2 (0,6)	2 (0,6)
ПФО	1 (0,2)	181 (41,8)	71 (16,4)	95 (21,9)	25 (5,8)	53 (12,2)	3 (0,7)	4 (0,9)
УФО	0	76 (40,4)	49 (26,1)	17 (9,0)	13 (6,9)	26 (13,8)	4 (2,1)	3 (1,6)
СФО	6 (1,9)	124 (40,3)	60 (19,5)	41 (13,3)	27 (8,8)	44 (14,3)	1 (0,3)	5 (1,6)
ДФО	2 (1,3)	79 (50,6)	12 (7,7)	21 (13,5)	18 (11,5)	20 (12,8)	1 (0,6)	3 (1,9)

наступило в результате болезни гиалиновых мембран (16,6 и 15,3% от общего числа умерших в 2019 и 2020 г. соответственно). Большую долю составили случаи, где в качестве основного заболевания были зарегистрированы асфиксия при рождении и врожденная пневмония. В 2019 г. асфиксию новорожденного и врожденную пневмонию отмечали соответственно в 212 и 200 наблюдениях, что составило 8,6 и 8,1%. В 2020 г. число случаев с асфиксией при рождении уменьшилось на 9,5%, при этом доля от общего числа умерших новорожденных снизилась лишь на 2,0%. Врожденную пневмонию в 2020 г. выявляли значимо чаще (на 17,0%; $p = 0,011$), доля же ее среди всех умерших в раннем неонатальном периоде возросла на 26,6%. В 2020 г. также возросли число (на 43,4%; $p = 0,003$) и доля (на 54,8%) заболеваний, входящих в подгруппу «другие респираторные состояния новорожденного» (незрелость легких, ателектаз легких, аспирационный синдром и др.).

Второе место среди первоначальных причин смерти в 2019 г. занимали заболевания группы врожденных аномалий (группы VI), зарегистрированные в 434 (17,5% от всех умерших) случаях. В 2020 г. врожденные аномалии отмечали значительно реже: в 354 (15,5%) случаях, в связи с чем они переместились на четвертое место.

Чаще всего в группе врожденных аномалий отмечали так называемые другие виды врожденных аномалий, в состав которых входят, в частности, множественные врожденные пороки развития. В 2019 г. врожденные аномалии стали основным заболеванием в 196 случаях (7,9% от всех умерших), в 2020 г. — в 190 случаях (8,3%). На втором месте по частоте встречаемости в данной группе отмечены пороки сердца, которые в 2019 г. стали первоначальной причиной смерти в 123 случаях (28,3% среди всех смертельных аномалий и 5,0% от всех умерших новорожденных). В 2020 г. пороки сердца возникали значимо реже: в качестве основного заболевания они диагностированы в 87 случаях (24,6% среди всех аномалий и 3,8% от общего числа умерших).

На третьем месте в 2019 г. и втором месте в 2020 г. среди причин ранней неонатальной смерти зарегистрированы инфекционные заболевания (группа III), составившие соответственно 16,7% (413 случаев) и 17,0% (388 случаев). Врожденный сепсис установлен в качестве первоначальной причины смерти в 2019 г. и в 2020 г. практически у одинакового числа (180 и 181) новорожденных. При этом доля его составила 43,6 и 46,6% в группе инфекционных заболеваний и 7,3 и 7,9% от всех умерших новорожденных в 2019 и 2020 г. соответственно. Инфекции новорожденного, специфичные для перинатального периода, в 2019 и 2020 г. отмечены в 232 и 205 случаях соответственно (56,2 и 52,8% в группе инфекционных заболеваний и 9,4 и 9,0% от всех умерших новорожденных соответственно).

Заболевания, входящие в группу геморрагических и гематологических расстройств (группу IV), являлись основным заболеванием в 2019 г. в 412 случаях (16,6% от всех случаев) и занимали четвертое место среди причин ранней неонатальной смерти. В 2020 г. их абсолютное число (359 случаев) и доля (15,7%) среди всех умерших были меньше, хотя стали занимать третье место среди причин смертности новорожденных. Общее число эндокринных, метаболических и других нарушений, специфичных для перинатального периода, составляющих группу V, как основного заболевания уменьшилось с 213 случаев в 2019 г. до 198 случаев в 2020 г., хотя их доля среди всех умерших новорожденных незначительно увеличилась с 8,6

до 8,7% соответственно. Следует также отметить, что в 2020 г. по сравнению с 2019 г. уменьшилось число случаев с неустановленной причиной смерти с 42 (1,7% от всех умерших новорожденных) до 27 (1,2%).

В различных ФО в 2019 и 2020 г. отмечены некоторые различия в частоте первоначальных причин ранней неонатальной смертности (см. табл. 3, 4). Так, частота респираторных нарушений (группа II) как основного заболевания варьировала от 25,2 до 48,6% в 2019 г. и от 26,9 до 52,4% в 2020 г. от всех случаев смерти новорожденных. Реже всего в 2019 и 2020 г. в качестве основного заболевания они отмечены в Центральном ФО (в 25,2 и 26,9% от всех случаев смерти соответственно). Наибольшая их частота в 2019 г. зафиксирована в Дальневосточном ФО (45,4%), а в 2020 г. — в Южном ФО (52,4%). Обращает на себя внимание увеличение в 2020 г. по сравнению с 2019 г. общего числа новорожденных, умерших в результате респираторных нарушений: в Южном ФО — на 47,1% ($p < 0,01$) в Дальневосточном ФО — на 9,7%.

Наибольшая доля инфекционных болезней (группа III) среди всех умерших в оба исследованных периода была выявлена в Уральском ФО (24,7 и 26,1% в 2019 и 2020 г. соответственно). При этом увеличение в 2020 г. по сравнению с 2019 г. числа новорожденных, умерших от инфекционных болезней, зарегистрировано в Центральном ФО (на 32,1%; $p < 0,04$) и Северо-Кавказском ФО (на 14%). В то же время в Южном и Северо-Западном ФО отмечено уменьшение числа таких умерших новорожденных на 36,2 и 27,1% ($p < 0,01$) соответственно.

Доля геморрагических и гематологических расстройств, составляющих группу IV, среди причин ранней неонатальной смерти варьировала от 7,2% (в Сибирском ФО) до 27,8% (в Приволжском ФО) в 2019 г. и от 9,0% (в Уральском ФО) до 21,9% (в Приволжском ФО) в 2020 г. Увеличение числа таких новорожденных в 2020 г. по сравнению с 2019 г. отмечено в Сибирском (на 64%; $p = 0,022$) и Южном (на 15,9%) ФО. Одновременно в Северо-Кавказском и Приволжском ФО их число уменьшилось на 33,3% и 31,7% ($p = 0,042$) соответственно.

Частота врожденных аномалий (группа VI) в структуре ранней неонатальной смертности варьировала от 10,1% (в Дальневосточном ФО) до 28,8% (в Центральном ФО) в 2019 г. и от 12,2% (в Приволжском ФО) до 21,1% (в Центральном ФО) в 2020 г. Увеличение числа новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни от врожденных аномалий в 2020 г. по сравнению с 2019 г., зафиксировано в Южном (на 44,4%) и Дальневосточном (на 33,3%) ФО; уменьшение — в Уральском (на 40,1%) и Центральном (на 33,3%; $p = 0,013$) ФО.

Следовательно, в результате проведенного сравнительного анализа данных Росстата о ранней неонатальной смертности за 2020 и 2019 г. в РФ установлено снижение как общего числа новорожденных, умерших в раннем неонатальном периоде, так и показателя ранней неонатальной смертности. Наряду с этим, отмечены некоторые изменения в структуре причин смертности, а также увеличение числа умерших новорожденных в отдельных ФО. Закономерно, что наиболее актуальным является выяснение роли SARS-CoV-2 в поражении новорожденных и развитии летальных исходов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно рекомендациям ВОЗ и нормативным документам РФ [8], все случаи смерти, связанные с COVID-19, подразделяют на две группы:

- случаи, когда COVID-19 выбирают в качестве первоначальной причины смерти;
- случаи, когда COVID-19 выбирают в качестве иной причины смерти, в том числе, когда COVID-19 имеет существенное значение в развитии основного заболевания и его смертельных осложнений.

Кроме того, ВОЗ ввела в МКБ дополнительные коды для документирования заболеваний и состояний, возникающих при COVID-19, в частности, U07.1 — коронавирусная инфекция COVID-19 с положительным результатом теста на вирус и U07.2 — коронавирусная инфекция COVID-19, вирус не идентифицирован. Соответственно в случаях COVID-19 данные коды указывают и в медицинских свидетельствах о перинатальной смерти, используемых в дальнейшем в таблицах Росстата. Следует повторить, что в качестве первоначальных причин ранней неонатальной смертности используют заболевания, указанные в классах XVI «Отдельные состояния, возникшие в перинатальном периоде» (P00-P96) и XVII «Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения» (Q00-Q99) МКБ-10. В статистических формах А-05 Росстата первоначальные причины ранней неонатальной смертности (основные заболевания) представлены в сгруппированном виде. При этом класс XXII (Коды для особых целей, U00–U85 МКБ), включающий в себя U07 (коронавирусная инфекция COVID-19), входит в группу «Другие причины смерти плода и новорожденного». В связи с этим, на основании анализа статистических форм А-05 Росстата не представляется возможным указать точное число новорожденных, умерших вследствие COVID-19, что связано с особенностями формирования (а точнее с отсутствием) данных Росстата о перинатальной смертности.

Согласно данным Росстата за 2020 г., в целом по РФ вышеуказанную группу «Другие причины смерти плода и новорожденного» составили только три наблюдения: по одному в Центральном, Южном и Северо-Кавказском ФО. В 2019 г. было зарегистрировано четыре случая: два в Южном и по одному в Приволжском и Дальневосточном ФО. Даже если предположить, что все случаи, соответствующие данной группе, относились к COVID-19, хотя это маловероятно, то их доля в 2020 г. составила 0,17% от всех случаев ранней неонатальной смертности. Следовательно, COVID-19 как основное заболевание не привело к увеличению числа гибели новорожденных в первые 168 ч жизни.

Вместе с тем, следует отметить, что любая коморбидная патология в той или иной степени усугубляет течение других заболеваний, важным моментом при определении первоначальной причины смертности и звеньев танатогенеза является выделение основного заболевания, фонового и сопутствующей патологии. Поскольку патогенез и танатогенез COVID-19 окончательно не установлен, то целесообразно привести данные литературы о частоте заболевания новорожденных COVID-19, об основной органопатологии и клинических особенностях COVID-19 у новорожденных, о данных патологоанатомических исследований новорожденных, умерших от COVID-19 или на фоне COVID-19.

Действительно, данные литературы свидетельствуют о случаях выявления SARS-CoV-2 у новорожденных. Подобное заражение возможно в результате внутриутробного трансплацентарного инфицирования, во время родов вследствие воздействия материнской крови и/или влагалищных выделений или уже после родов [9, 10].

Факты внутриутробного трансплацентарного заражения представлены не только в описаниях отдельных случаев, но и в систематических обзорах. Многопрофильной группой экспертов ВОЗ предложена классификационная система для определения вертикальной передачи SARS-CoV-2, позволяющая сравнивать данные различных исследований и оценивать клинические последствия у новорожденных, рожденных от инфицированных матерей [11].

SARSCoV-2 был выявлен у 14,2% беременных женщин в Испании [12] и у 16–20% в Нью-Йорке (США) [13]. В РФ на 1 июля 2020 г. зарегистрировано 4855 случаев заболевания беременных, рожениц и родильниц COVID-19, а на 1 января 2021 г., т. е. за весь 2020 г., — уже 30 609 заболевших.

По мнению ряда исследователей, риску инфицирования SARS-CoV-2 новорожденные подвержены при физиологических родах [14], поскольку ПНК SARS-CoV-2 обнаруживали в мазках из влагалища матери [15]. Данный факт послужил основным поводом для проведения операций кесарева сечения у инфицированных SARS-CoV-2 беременных в начале пандемии. В настоящее время выбор способа родоразрешения, в частности, кесарева сечения, рекомендуется проводить в зависимости от состояния беременной и плода, а не от того, есть ли у беременной COVID-19.

На основании проведенного систематического анализа публикаций, содержащих сведения о 176 инфицированных SARS-CoV-2 новорожденных, установлено, что только в 30% случаев заражение новорожденных происходило внутриутробно, а в 70% — после родов вследствие экзогенного пути преимущественно от окружающих с COVID-19 [16]. Следовательно, большая часть передачи инфекции происходит в результате прямого контакта с инфицированными людьми, включая мать, родственников, медицинских работников, а также при контактировании с различными инфицированными поверхностями, среди которых наиболее долго вирус сохраняется на стальных и пластиковых изделиях [17].

Следует констатировать, что в отличие от взрослого населения заболеваемость COVID-19 новорожденных намного ниже. Однако для стабилизации состояния новорожденных, родившихся у матерей, инфицированных SARS-CoV-2, нередко необходимо применение методов интенсивной терапии [18], что явно указывает на негативную роль инфекции. По данным наиболее представительного систематического обзора, включающего сведения о 176 новорожденных, инфицированных SARS-CoV-2, клинические симптомы обнаруживали у 97 (55,1%) новорожденных [16]. Из них в 52,5% случаев (у 51 новорожденного) отмечали дыхательные нарушения, в 44,3% (у 43) — повышение температуры, в 36,0% (35) — желудочно-кишечные расстройства, в 18,6% (18) — неврологические расстройства, в 10,3% (10) — сердечно-сосудистые нарушения и в 9,2% (9) наблюдали гипотермию, конъюнктивит или кожную сыпь.

Из клинических проявлений COVID-9 у новорожденных отмечают развитие лихорадки, рвоты, диареи, гипотензии, тахикардии, гипогликемии, гипотермии, аспирации мекония, респираторного дистресс-синдрома, гипоксически-ишемической энцефалопатии, а также выявляют врожденные аномалии: дефекты межпредсердной перегородки, открытое овальное окно, гемодинамически значимый открытый артериальный проток, тетраду Фалло [19]. В то же время, по данным многоцентрового исследования, проведенного в Испании,

частота развития врожденных аномалий плодов у беременных, инфицированных SARS-CoV-2, была аналогична таковой у неинфицированных беременных [20].

При этом большинство исследователей указывают на более частое развитие преждевременных родов [21, 22] и внутриутробного дистресса плода у беременных с COVID-19 и [23, 24], что опять может подтверждать негативное влияние COVID-19 на состояние новорожденных. Так, у беременных, инфицированных SARS-CoV-2, частота преждевременных родов составила 11,4% против 7,2% у неинфицированных ($p = 0,054$), а внутриутробного дистресса плода — 14% против 9,1% ($p = 0,036$) [20]. При этом доля новорожденных малого гестационного возраста с тяжелыми заболеваниями была выше у беременных с клиническими проявлениями COVID-19 по сравнению с бессимптомными пациентками: 9,6% против 1% ($p = 0,006$) [24].

По мнению ряда авторов, внутриутробный дистресс плода обусловлен снижением оксигенации крови и развитием системной воспалительной реакции у матери [24]. Важная роль в развитии нарушений роста и развития плода принадлежит и морфо-функциональным нарушениям плаценты. Действительно, практически все исследователи отмечают у беременных с SARS-CoV-2-инфекцией поражения плаценты в виде нарушений материнского и плодного компартментов кровообращения и развития воспалительных реакций [25, 26]. В результате морфометрического и иммуногистохимического исследования плацент рожениц с COVID-19 нами установлено повышение количества синцитиальных узелков, снижение показателей степени васкуляризации и повышение уровня экспрессии VEGF в ворсинах, указывающее на развитие пре- и плацентарной гипоксии [27, 28]. Можно также добавить, что различные поражения плаценты способствуют развитию не только внутриутробной гибели плода, но и ранней неонатальной смерти. При этом поражения плаценты, согласно правилам МКБ-10 кодирования основного заболевания, не могут быть расценены в качестве первоначальной причины смерти, они могут быть расценены в качестве состояний, способствовавших наступлению смерти. Так, согласно данным Росстата по РФ, в 2010 г. поражения плаценты способствовали наступлению ранней неонатальной смерти в 17,2% случаев [7], в 2016 г. — в 22,2% случаев [6].

Несмотря на вышеуказанные клинические проявления COVID-19 у новорожденных, исходы заболевания в подавляющем большинстве случаев расценивают как относительно положительные по сравнению с исходами взрослых и пожилых пациентов. По данным итальянского Национального института здравоохранения, смертность детей в возрасте 0–9 лет по состоянию на 29 марта 2021 г. составляла 0,01% [29]. Согласно систематическому анализу 24 публикаций (9 исследований серии пациентов и 15 описаний отдельных клинических случаев), посвященных изучению влияния COVID-19 на беременных, плод и новорожденных, зафиксирована внутриутробная гибель только четырех плодов, включая одну двойню, и смерть трех новорожденных, в том числе двух близнецов, вызванная COVID-19 [30]. В результате анализа данных литературы, опубликованных до 3 июня 2020 г. и включающих в общей сложности сведения о 920 новорожденных, рожденных SARS-CoV-

2-инфицированными женщинами, были отмечены два (1,3%) случая смерти новорожденных [31]. В обоих случаях была выявлена пневмония при отрицательных результатах SARS-CoV-2. Помимо этого, у двух новорожденных авторы отметили развитие неонатального сепсиса, в том числе у одного из них септического шока. Оба новорожденных были пролечены и выписаны в удовлетворительном состоянии.

В то же время описан случай смерти новорожденного с картиной септического шока через 2 ч после рождения у SARS-CoV-2-инфицированной матери [32]. Имеется также сообщение о смерти недоношенного новорожденного, умершего на девятый день жизни вследствие рефрактерного шока, полиорганной недостаточности и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [33].

Результаты наиболее объемного многонационального ретроспективного когортного исследования, включавшего женщин с одноплодной беременностью и лабораторно подтвержденной SARS-CoV-2-инфекцией, проведенного в 72 центрах 22 стран Европы, Южной Америки, Азии и Австралии, а также США в период с 1 февраля по 30 апреля 2020 г., были представлены рабочей группой по изучению COVID-19 World Association of Perinatal Medicine [34]. В данном отчете указано, что было зарегистрировано 5 / 251 (2,0%) случаев неонатальной смерти, из которых трое родились недоношенными, а два других умерли в результате развития сепсиса. Важно, что только у 1 (0,4%) из 251 родившегося живым новорожденного был зафиксирован положительный результат на SARS-CoV-2 при ПЦР-исследовании мазков из носоглотки. Последнее обстоятельство объясняет, по крайней мере, частично, относительно низкие показатели неонатальной смертности вследствие COVID-19, в том числе в РФ.

ВЫВОДЫ

Согласно данным Росстата, в 2020 г. (году пандемии COVID-19) уменьшились как абсолютное число новорожденных, умерших в первые 168 ч жизни, так и значения показателя ранней неонатальной смертности. В статистических формах А-05 Росстата за 2020 г. отсутствуют сведения о смерти новорожденных от COVID-19. В результате анализа данных Росстата о причинах ранней неонатальной смертности установлено увеличение доли заболеваний, входящих в группу респираторных нарушений, включая врожденную пневмонию и так называемые другие респираторные состояния, а также инфекций, включая врожденный сепсис, что, по нашему мнению, отражает прямое и опосредованное негативное влияние SARS-CoV-2-инфицирования и наличия COVID-19 у беременных и SARS-CoV-2 у новорожденных. Для более полного представления о роли COVID-19 в генезе ранней неонатальной смертности необходимо иметь сведения статистического учета не только о первоначальной причине смерти, но и о других заболеваниях, входящих, в частности, в рубрику комбинированного основного заболевания (сочетанных, конкурирующих). Другим важным моментом для выяснения роли COVID-19 является необходимость клиничко-патологоанатомического анализа каждого летального исхода новорожденного с последующим их обобщением.

Литература

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Wang W, Li X, Yang B, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382 (8): 727–33.
2. Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
3. Baud D, Qi X, Nielsen-Saines K, Musso D, Pomar L, Favre G, et al. Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (7): 773.
4. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*. 2021; 93 (3): 1449–58.
5. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, Ferrari ME, Pusiol A, Nocerino A, et al. SARS-CoV-2 infection in children and newborns: A systematic review. *Eur J Pediatr*. 2020; 179 (7): 1029–46.
6. Туманова У. Н., Шувалова М. П., Щеголев А. И. Хориоамнионит и ранняя неонатальная смертность (по данным Росстата в 2012–2016 годах). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018; (8): 49–53.
7. Щеголев А. И., Павлов К. А., Дубова Е. А., Фролова О. Г. Ранняя неонатальная смертность в Российской Федерации в 2010 г. *Архив патологии*. 2013; (4): 15–19.
8. Методические рекомендации по кодированию и выбору основного состояния в статистике заболеваемости и первоначальной причины в статистике смертности, связанных с COVID-19. 2020; 24 с. Доступно по ссылке: https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/527/original/27052020_MR_STAT_1.pdf.
9. Schwartz DA. An analysis of 38 pregnant women With COVID-19, their newborn infants, and maternal-fetal transmission of SARS-CoV-2: Maternal coronavirus infections and pregnancy outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2020; 144 (7): 799–805.
10. Neef V, Buxmann H, Rabenau HF, Zacharowski K, Raimann FJ. Characterization of neonates born to mothers with SARS-CoV-2 infection: Review and meta-analysis. *Pediatr Neonatol*. 2021; 62 (1): 11–20.
11. WHO COVID-19 LENS (Living Evidence Synthesis) Working Group. Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2. Available from: www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-mother-tochild-transmission-2021.1.
12. Garcia-Basteiro AL, Moncunill G, Tortajada M, Vidal M, Guinovart C, Jiménez A, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among health care workers in a large Spanish reference hospital. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 3500.
13. Sutton D, Fuchs K, D'Alton M, Goffman D. Universal screening for SARS-CoV-2 in women admitted for delivery. *N Engl J Med*. 2020; 382 (22): 2163–4.
14. Ferrazzi E, Frigerio L, Savasi V, Vergani P, Prefumo F, Barresi S, et al. Vaginal delivery in SARS-CoV-2-infected pregnant women in Northern Italy: A retrospective analysis. *BJOG*. 2020; 127 (9): 1116–21.
15. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 3572.
16. Raschetti R, Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Loi B, Benachi A, De Luca D. Synthesis and systematic review of reported neonatal SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5164.
17. Shchegolev AI, Tumanov UN. Persistence of SARS-CoV-2 in deceased patients and safe handling of infected bodies. *Bulletin of RSMU*. 2021; (3): 5–11.
18. Дегтярев Д. Н. Можно ли рассматривать вирус SARS-CoV-2 в качестве возбудителя TORCH-инфекций у новорожденных? *Неонатология: новости, мнения, обучение*. 2021; (1): 5–7.
19. Li X, Sun L, Tao L. Updates in neonatal coronavirus disease 2019: What can we learn from detailed case reports? (Review). *Mol Med Rep*. 2021; 23 (5): 351.
20. Crovetto F, Crispi F, Llubra E, Pascal R, Larroya M, Trilla C, et al. Impact of SARS-CoV-2 infection on pregnancy outcomes: A population-based study. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab104.
21. Yan J, Guo J, Fan C, Juan J, Yu X, Li J, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnant women: a report based on 116 cases. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223 (111): e1–14.
22. Knight M, Bunch K, Vousden N, Morris E, Simpson N, Gale C, et al. UK obstetric surveillance system SARS-CoV-2 infection in Pregnancy Collaborative Group. Characteristics and outcomes of pregnant women admitted to hospital with confirmed SARS-CoV-2 infection in UK: national population based cohort study. *BMJ*. 2020; 369: m2107.
23. Lee DH, Lee J, Kim E, Woo L, Park HY, An J. Emergency cesarean section performed in a patient with confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 — a case report. *Korean J Anesthesiol*. 2020; 73 (4): 347–51.
24. Gracia-Perez-Bonfils A, Martinez-Perez O, Llubra E, Chandrharan E. Fetal heart rate changes on the cardiotocograph trace secondary to maternal COVID-19 infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020; 252: 286–93.
25. Oltean I, Tran J, Lawrence S, Ruschkowski BA, Zeng N, Bardwell C, et al. Impact of SARS-CoV-2 on the clinical outcomes and placental pathology of pregnant women and their infants: A systematic review. *Heliyon*. 2021; 7 (3): e06393.
26. Щеголев А. И., Туманова У. Н., Серов В. Н. Поражения плаценты у беременных с SARS-CoV-2-инфекцией. *Акушерство и гинекология*. 2020; (12): 44–52.
27. Щеголев А. И., Куликова Г. В., Туманова У. Н., Шмаков П. Г., Сухих Г. Т. Морфометрическая характеристика ворсин плаценты рожениц с COVID-19. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 172 (7): 102–7.
28. Shchegolev AI, Kulikova GV, Lyapin VM, Shmakov RG, Sukhikh GT. The number of syncytial knots and vegf expression in placental villi in parturient woman with COVID-19 depends on the disease severity. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 171 (3): 399–403.
29. Italian National Institute of Health. COVID-19: National Update 24 March 2021 (Italian Version). Available from: www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19_24-marzo-2021.pdf.
30. Juan J, Gil MM, Rong Z, Zhang Y, Yang H, Poon LC. Effect of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on maternal, perinatal and neonatal outcome: systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020; 56 (1): 15–27.
31. Bellos I, Pandita A, Panza R. Maternal and perinatal outcomes in pregnant women infected by SARS-CoV-2: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021; 256: 194–204.
32. Li J, Wang Y, Zeng Y, Song T, Pan X, Jia M, et al. Critically ill pregnant patient with COVID-19 and neonatal death within two hours of birth. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020; 150 (1): 126–128.
33. Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9: 51–60.
34. WAPM (World Association of Perinatal Medicine) Working Group on COVID-19. Maternal and perinatal outcomes of pregnant women with SARS-CoV-2 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021; 57 (2): 232–41.

References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Wang W, Li X, Yang B, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382 (8): 727–33.
2. Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
3. Baud D, Qi X, Nielsen-Saines K, Musso D, Pomar L, Favre G, et al. Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20 (7): 773.
4. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*. 2021; 93 (3): 1449–58.

5. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, Ferrari ME, Pusiolo A, Nocerino A, et al. SARS-CoV-2 infection in children and newborns: A systematic review. *Eur J Pediatr*. 2020; 179 (7): 1029–46.
6. Tumanova UN, Shuvalova MP, Shchegolev AI. Horiomnionit i rannijaja neonatal'naja smertnost' (po dannym Rosstata v 2012–2016 godah). *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 2018; (8): 49–53. Russian.
7. Shchegolev AI, Pavlov KA, Dubova EA., Frolova O. G. Rannijaja neonatal'naja smertnost' v Rossijskoj Federacii v 2010 g. *Arhiv patologii*. 2013; (4): 15–19. Russian.
8. Metodicheskie rekomendacii po kodirovaniju i vyboru osnovnogo sostojanija v statistike zabolevaemosti i pervonachal'noj prichiny v statistike smertnosti, svjazannyh s COVID-19. 2020, 24 s. Dostupno po ssylke: https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/527/original/27052020_MR_STAT_1.pdf. Russian.
9. Schwartz DA. An analysis of 38 pregnant women With COVID-19, their newborn infants, and maternal-fetal transmission of SARS-CoV-2: Maternal coronavirus infections and pregnancy outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2020; 144 (7): 799–805.
10. Neef V, Buxmann H, Rabenau HF, Zacharowski K, Raimann FJ. Characterization of neonates born to mothers with SARS-CoV-2 infection: Review and meta-analysis. *Pediatr Neonatol*. 2021; 62 (1): 11–20.
11. WHO COVID-19 LENS (Living Evidence Synthesis) Working Group. Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2. Available from: www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-mother-tochild-transmission-2021.1.
12. Garcia-Basteiro AL, Moncunill G, Tortajada M, Vidal M, Guinovart C, Jiménez A, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among health care workers in a large Spanish reference hospital. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 3500.
13. Sutton D, Fuchs K, D'Alton M, Goffman D. Universal screening for SARS-CoV-2 in women admitted for delivery. *N Engl J Med*. 2020; 382 (22): 2163–4.
14. Ferrazzi E, Frigerio L, Savasi V, Vergani P, Prefumo F, Barresi S, et al. Vaginal delivery in SARS-CoV-2-infected pregnant women in Northern Italy: A retrospective analysis. *BJOG*. 2020; 127 (9): 1116–21.
15. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 3572.
16. Raschetti R, Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Loi B, Benachi A, De Luca D. Synthesis and systematic review of reported neonatal SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5164.
17. Shchegolev AI, Tumanova UN. Persistence of SARS-CoV-2 in deceased patients and safe handling of infected bodies. *Bulletin of RSMU*. 2021; (3): 5–11.
18. Degtyarev DN. Možno li rassmatrivat' virus SARS-CoV-2 v kachestve vzbuditelja TORCH-infekcij u novorozhdennyh? *Neonatologija: novosti, mnenija, obuchenie*. 2021; (1): 5–7. Russian.
19. Li X, Sun L, Tao L. Updates in neonatal coronavirus disease 2019: What can we learn from detailed case reports? (Review). *Mol Med Rep*. 2021; 23 (5): 351.
20. Crovetto F, Crispi F, Llurba E, Pascal R, Larroya M, Trilla C, et al. Impact of SARS-CoV-2 infection on pregnancy outcomes: A population-based study. *Clin Infect Dis*. 2021: ciab104.
21. Yan J, Guo J, Fan C, Juan J, Yu X, Li J, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnant women: a report based on 116 cases. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223 (111): e1–14.
22. Knight M, Bunch K, Vousden N, Morris E, Simpson N, Gale C, et al. UK obstetric surveillance system SARSCoV-2 infection in Pregnancy Collaborative Group. Characteristics and outcomes of pregnant women admitted to hospital with confirmed SARS-CoV-2 infection in UK: national population based cohort study. *BMJ*. 2020; 369: m2107.
23. Lee DH, Lee J, Kim E, Woo L, Park HY, An J. Emergency cesarean section performed in a patient with confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 — a case report. *Korean J Anesthesiol*. 2020; 73 (4): 347–51.
24. Gracia-Perez-Bonfils A, Martinez-Perez O, Llurba E, Chandrarahan E. Fetal heart rate changes on the cardiotocograph trace secondary to maternal COVID-19 infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020; 252: 286–93.
25. Oltean I, Tran J, Lawrence S, Ruschkowski BA, Zeng N, Bardwell C, et al. Impact of SARS-CoV-2 on the clinical outcomes and placental pathology of pregnant women and their infants: A systematic review. *Heliyon*. 2021; 7 (3): e06393.
26. Shchegolev AI, Tumanova UN, Serov VN. Porazhenija placenty u beremennyh s SARS-CoV-2-infekciej. *Akusherstvo i ginekologija*. 2020; (12): 44–52. Russian.
27. Shchegolev AI, Kulikova GV, Tumanova UN, Shmakov RG, Sukhikh GT. Morfometricheskaja harakteristika vorsin placenty rozhenic s COVID-19. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2021; 172 (7): 102–7. Russian.
28. Shchegolev AI, Kulikova GV, Lyapin VM, Shmakov RG, Sukhikh GT. The number of syncytial knots and vegf expres-sion in placental villi in parturient woman with COVID-19 depends on the disease severity. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 171 (3): 399–403.
29. Italian National Institute of Health. COVID-19: National Update 24 March 2021 (Italian Version). Available from: www.epicentro.iss.it/coronavirus/bollettino/Bollettino-sorveglianza-integrata-COVID-19_24-marzo-2021.pdf.
30. Juan J, Gil MM, Rong Z, Zhang Y, Yang H, Poon LC. Effect of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on maternal, perinatal and neonatal outcome: systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020; 56 (1): 15–27.
31. Bellos I, Pandita A, Panza R. Maternal and perinatal outcomes in pregnant women infected by SARS-CoV-2: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021; 256: 194–204.
32. Li J, Wang Y, Zeng Y, Song T, Pan X, Jia M, et al. Critically ill pregnant patient with COVID-19 and neonatal death within two hours of birth. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020; 150 (1): 126–128.
33. Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9: 51–60.
34. WAPM (World Association of Perinatal Medicine) Working Group on COVID-19. Maternal and perinatal outcomes of pregnant women with SARS-CoV-2 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021; 57 (2): 232–41.